

# Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n°1830

## THÈSE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Mention : Sciences, Technologies, Santé**

**Option : Biologie cellulaire et physiopathologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 26 septembre 2011*

*Par Etienne Hébert Chatelain*

*Né le 26 mars 1981 à Montréal, QC, Canada*

### **Impact des phosphorylations sur tyrosine sur le métabolisme mitochondrial**

Régulation et impacts fonctionnels des phosphorylations induites par la Src kinase

#### **Membres du Jury**

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Professeur Dominique Rolin..... | Président  |
| Professeur Agnes Rotig.....     | Rapporteur |
| Professeur Pascal Reynier.....  | Rapporteur |
| Docteur Sebastian Vogt .....    | Examineur  |
| Docteur Jean-Paul DiRago.....   | Examineur  |
| Docteur Thierry Letellier ..... | Directeur  |

# TABLES DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| I. RESUME  | 4  |
| II. INTRODUCTION GENERALE  |    |
| 1. L'ADN mitochondrial   | 5  |
| 1.1. Structure de l'ADN mitochondrial  | 5  |
| 1.2. Transcription et Réplication de l'ADN mitochondrial                         | 6  |
| 1.3. Transmission de l'ADN mitochondrial   | 7  |
| 2. Les protéines mitochondriales   | 9  |
| 2.1. Importation des protéines codées par l'ADN nucléaire dans la mitochondrie   | 9  |
| 2.2. La production des protéines codées par l'ADN mitochondrial                  | 11 |
| 3. Les fonctions mitochondriales   | 12 |
| 3.1. Les oxydations phosphorylantes  | 12 |
| 3.1.1. Le complexe I   | 14 |
| 3.1.2. Le complexe II  | 16 |
| 3.1.3. Le complexe III   | 17 |
| 3.1.4. Le complexe IV  | 18 |
| 3.1.5. Le complexe V   | 19 |
| 3.1.6. Les supercomplexes  | 22 |
| 3.1.7. Le réseau mitochondrial   | 23 |
| 3.2. Le stress oxydant   | 24 |
| 3.2.1. La production des ROS   | 24 |
| 3.2.2. Le système antioxydant  | 27 |
| 3.3. L'apoptose  | 29 |
| 3.4. Le métabolisme mitochondrial dans le cancer                                 | 29 |
| 4. Phosphorylation des protéines mitochondriales                                 | 32 |
| 4.1. Les kinases dans la mitochondrie  | 35 |
| 4.1.1. Les protéines kinases A   | 35 |
| 4.1.2. Les MAP-kinases   | 36 |
| 4.1.3. Les tyrosine-kinases  | 36 |
| 4.1.3.1. La Src kinase   | 37 |
| 4.1.3.1.1. Structure et régulation de la Src kinase                              | 38 |
| 4.1.3.1.2. La Src kinase dans la mitochondrie                                    | 42 |
| 4.1.3.1.3. La Src kinase dans la régulation de la glycolyse                      | 44 |
| 4.2. La phosphorylation des protéines participant aux oxydations phosphorylantes | 44 |
| 4.2.1. Le complexe I   | 45 |
| 4.2.2. Le complexe II  | 45 |
| 4.2.3. Le complexe III   | 46 |
| 4.2.4. Le cytochrome c   | 46 |
| 4.2.5. Le complexe IV  | 46 |
| 4.2.6. Le complexe V   | 47 |
| 4.2.7. Les enzymes du cycle de Krebs   | 48 |
| 5. Objectifs   | 49 |
| III. CHAPITRE 1  |    |
| 1. Introduction  | 50 |
| 2. Article 1   | 52 |
| 3. Conclusion  | 74 |
| IV. CHAPITRE 2   |    |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 1. Introduction                  | 77  |
| 2. Article 2                     | 70  |
| 3. Conclusion                    | 100 |
| V. CONCLUSION GENERALE           | 104 |
| VI. ANNEXE                       | 108 |
| VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 110 |

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1. L'ADN mitochondrial   | 5   |
| Figure 2. Le goulot d'étranglement de l'ADN mitochondrial   | 8   |
| Figure 3. Le système d'importation des protéines dans la mitochondrie                                   | 10  |
| Figure 4. Le système de transport des électrons et les oxydations phosphorylantes                       | 13  |
| Figure 5. Le complexe I   | 15  |
| Figure 6. Le complexe II  | 16  |
| Figure 7. Le mécanisme du complexe III  | 17  |
| Figure 8. Le complexe IV  | 18  |
| Figure 9. L'ATP synthase  | 21  |
| Figure 10. Le réseau mitochondrial  | 23  |
| Figure 11. La production et la dégradation des radicaux libres  | 27  |
| Figure 12. La mitochondrie participe à l'apoptose   | 28  |
| Figure 13. Les voies anaboliques dans la mitochondrie   | 31  |
| Figure 14. Les processus de phosphorylation   | 34  |
| Figure 15. L'activation de la PKA   | 35  |
| Figure 16. La structure des Src kinases   | 38  |
| Figure 17. L'activation de la Src est régulée par les processus de phosphorylation et déphosphorylation | 39  |
| Figure 18. Les différentes conformations des Src actives et inactives                                   | 40  |
| Figure 19. La translocation des kinases vers la mitochondrie  | 43  |
| Figure 20. La régulation de la Src par PTP1B  | 74  |
| Figure 21. Les différentes voies de régulation des OXPHOS par les processus de phosphorylation          | 105 |

## I. RESUME

La mitochondrie participe à plusieurs fonctions cellulaires essentielles. Elle est considérée comme le plus important producteur d'énergie de la cellule, participe aux processus apoptotiques, produit des radicaux libres et est une importante composante des voies de biosynthèse des lipides, protéines et nucléotides. La mitochondrie se doit donc d'être finement régulée pour répondre aux différents besoins des différentes cellules où elle se trouve. La phosphorylation des protéines mitochondriales apparait de plus en plus comme une voie de régulation majeure du métabolisme mitochondrial. Plusieurs études ont effectivement démontré que les phosphorylations au niveau des résidus sérines et thréonines, induites par l'AMPc et les PKA, influencent grandement les capacités des enzymes du système de transport des électrons et, plus globalement, des oxydations phosphorylantes. Après avoir été sous-estimées pendant plusieurs années, les phosphorylations sur résidus tyrosine semblent tout aussi importantes dans la régulation de la respiration mitochondriale et des oxydations phosphorylantes. Néanmoins, on connaît toujours peu l'ensemble des acteurs impliqués dans les processus de phosphorylation. Par exemple, la tyrosine-kinase Src et certaines tyrosine-phosphatases sont spécifiquement présentes dans les mitochondries de cerveau, chez le rat. On ne connaît toutefois pas leur cible ni leur possible impact fonctionnel. Cette thèse avait donc pour but de mieux comprendre comment les phosphorylations sur tyrosine influencent les oxydations phosphorylantes.

Durant le premier volet de cette thèse, nous avons démontré que la tyrosine-phosphatase, PTP1B, peut activer la Src kinase, directement dans les mitochondries entraînant la phosphorylation de plusieurs protéines mitochondriales. Dans le deuxième volet, nous avons montré que la Src kinase peut aussi moduler le métabolisme mitochondrial dans les lignées cancéreuses, et ainsi maintenir certaines fonctions mitochondriales essentielles à ces cellules. Les travaux originaux présentés dans cette thèse permettent donc de mieux comprendre les mécanismes de régulation du métabolisme mitochondrial par les processus de phosphorylation. En effet, nous avons mis en évidence, pour la première fois, une voie de régulation intramitochondriale de la Src kinase qui permet de moduler le métabolisme mitochondrial. Dans la deuxième partie de la cette thèse, nous suggérons aussi l'importance de la Src mitochondriale dans l'élaboration du phénotype prolifératif des cellules cancéreuses. Cette thèse a donc permis de démontrer l'importance des phosphorylations induites par la Src kinase dans la régulation du métabolisme mitochondrial, à la fois dans les tissus sains et les cellules cancéreuses.

## II. INTRODUCTION GENERALE

### 1. L'ADN mitochondrial

#### 1.1. Structure de l'ADN mitochondrial

La mitochondrie possède son propre ADN codant pour quelques sous-unités des complexes enzymatiques formant la chaîne respiratoire. Contrastant avec l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est un ADN circulaire qui possède environ 16,6 kb, peu de séquences intergéniques et aucun intron. L'ADNmt est formé de deux brins; un brin lourd et un brin léger, cette classification étant basée sur leur composition en base G (guanine) et T (thymine). Le brin lourd (H pour *heavy*) code pour 2 ARN ribosomiaux (ARNr), 14 ARN de transfert (ARNt) et 12 polypeptides tandis que le brin léger (L pour *light*) code pour 8 ARNt et un seul polypeptide (voir Taanman, 1999). Les 13 produits protéiques font partie intégrante des complexes du système de transport des électrons. Le système de décodage de l'ADNmt est aussi modifié par rapport à son homologue nucléaire. Des modifications structurelles permettent de diminuer le nombre d'ARNt de 32 dans l'ADN nucléaire à 22 dans l'ADNmt pour traduire les 13 polypeptides mitochondriaux chez l'homme (Anderson *et al.*, 1981).

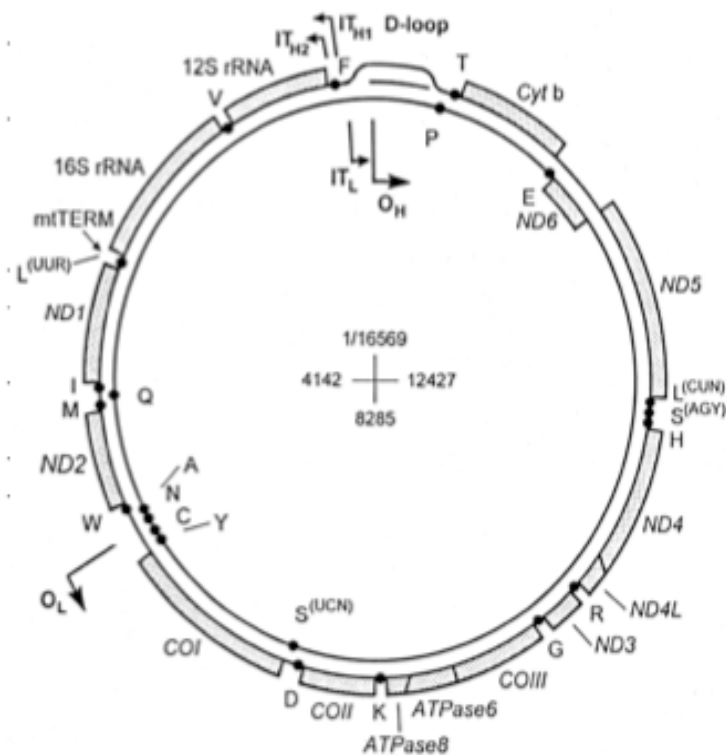


Figure 1. L'ADN mitochondrial. Le cercle extérieur représente le brin H qui contient la majorité des gènes. L'origine de réplication du brin H (O<sub>H</sub>) et du brin L (O<sub>L</sub>) ainsi que la direction de la synthèse d'ADN sont indiquées par les grandes flèches pliées. L'initiation des sites de transcription (IT<sub>L</sub>, IT<sub>H1</sub> et IT<sub>H2</sub>) et la direction de la synthèse de l'ARN sont indiquées par les petites flèches. Le site de liaison de mtTERF est indiqué. Les 22 ARNt sont indiqués par des points et la lettre de l'acide aminé. Les gènes codant pour les 2 ARNr et les 13 protéines sont indiqués par les sections ombragées. ND: sous-unité du complexe I; CO: complexe IV; ATPase: complexe V (Tirée de Taanman, 1999).

Dans la majorité des cellules actives, on trouve une large proportion des molécules d'ADNmt comportant une courte section à trois brins (**Figure 1**). On nomme cette région, la seule non codante de l'ADNmt, la D-Loop (pour *Displacement Loop*), dans laquelle un court brin, complémentaire au brin L, déplace le brin H. Cette région, à l'origine de la transcription et de la réplication de l'ADNmt, est bordée par les gènes codant pour l'ARNt<sup>Phe</sup> et l'ARNt<sup>Pro</sup> (Taanman, 1999).

## 1.2. Transcription et Réplication de l'ADN mitochondrial

Il existe deux sites majeurs pour l'initiation de la transcription de l'ADNmt, tous deux situés dans la D-loop, à moins de 150 paires de bases l'un de l'autre. La transcription du brin H débute au site d'initiation IT<sub>H1</sub> situé à l'intérieur de la région du promoteur du brin H. En fait, à partir de ce site, seuls les ARNr 12S et 16S et l'ARNt<sup>leu</sup> sont transcrits. Un deuxième site existe pour le brin H (IT<sub>H2</sub>) à partir duquel est initiée la transcription complète du brin H. La transcription complète du brin L s'effectue à partir du site IT<sub>L</sub>, situé à l'intérieur de la région du promoteur du brin L, le LSP (Gaspari *et al.*, 2004).

Cette transcription est réalisée par l'entremise de l'ARNmt polymérase, une protéine de 120 kDa, et de quelques cofacteurs essentiels à son activité (Fernandez-Silva *et al.*, 2003). Tout d'abord, le facteur de transcription mitochondriale A (TFAM) se fixe en amont (10 à 40 paires de bases) des sites d'initiation. TFAM, une molécule de 25 kDa, possède deux domaines HMG (pour *High Mobility Group*) qui lui permettent de se lier à l'ADNmt, mais aussi de l'envelopper, l'enrouler et le déplier (Kang et Hamasaki, 2005). Les changements de conformation induits par TFAM semblent donc nécessaires à l'initiation de la transcription de l'ADNmt. De plus, en se situant en amont des sites d'initiation, il assurerait une transcription unidirectionnelle des deux brins par l'ARNmt polymérase (Alam *et al.*, 2003). Ensuite, l'un des deux facteurs de transcription mitochondriale B (TFB1M et TFB2M) forme un hétérodimère avec l'ARNmt polymérase. Bien que ces deux facteurs soient essentiels à l'initiation de la transcription, ils ne semblent pas requis dans l'élongation de cette transcription (Falkenberg *et al.*, 2002; Fernandez-Silva *et al.*, 2003). Enfin, le facteur de terminaison (mtTERF) aide à terminer la transcription du court transcrit (Asin-Cayuela et Gustafsson, 2007).

La réplication de l'ADNmt est liée à la transcription de la région du promoteur du brin L. Le transcrit du LSP sert d'amorce et initie la réplication du brin H dans la *D-loop*.

L'élongation du brin H fille débute à l' $O_H$  et éloigne simultanément les brins H et L parentaux. Cet éloignement mène à l'exposition de l' $O_L$ , ce qui active la réplication, en sens inverse, du brin L. Les deux brins filles résultant sont liés et forme l'ADNmt circulaire double-brin. Plus précisément, l'ARNmt polymérase (et ses cofacteurs) démarre la transcription du brin H et génère le précurseur de l'amorce. Ce dernier reste hybridé avec l'ADNmt en amont de l'origine de réplication du brin H ( $O_H$ ), formant ainsi la R-loop. Cette  $O_H$  est constituée, notamment des CSB (*conserved sequence block*) I, II et III (Gaspari *et al.*, 2004). Ce précurseur est donc coupé, grâce à l'ARNmt endoribonucléase MRP, générant ainsi l'amorce mature de la réplication. Ensuite, l'ADNmt polymérase  $\gamma$  débute la réplication du brin H par extension de l'amorce d'ARN. La synthèse du brin H peut se terminer rapidement, lors de la formation de la D-loop, au niveau du TAS (pour *terminated associated sequence*), ou continuer pour former le brin H fille (Garesse et Vallejo, 2001).

L'élongation de l'ADNmt est effectuée par l'ADNmt polymérase  $\gamma$ , la seule présente dans la mitochondrie, et de quelques cofacteurs, notamment la mtSSB (pour *mitochondrial single stranded binding*) et les hélicases TWINKLE. La mtSSB maintient l'intégrité des sites où elle est présente et augmente l'activité de la polymérase. Les hélicases, quant à elles, déplient les hélices et cassent les ponts hydrogène en amont de la polymérase (Falkenberg *et al.*, 2007).

### **1.3. Transmission de l'ADN mitochondrial**

Les « molécules » d'ADNmt circulaires sont présentes en grand nombre dans une même mitochondrie. Il est donc possible de retrouver dans une même mitochondrie, des ADNmt mutants et des ADNmt normaux. De même, des mitochondries mutantes et non mutantes peuvent coexister dans une même cellule. On appelle ce phénomène l'hétéroplasmie. Durant l'embryogénèse, il y a ségrégation aléatoire des mitochondries dans les cellules et dans les différents tissus (Shoubridge et Wai, 2007). C'est ce phénomène qui explique la spécificité tissulaire des propriétés mitochondriales, voire des pathologies mitochondriales.

La transmission de l'ADNmt ne respecte pas les lois mendéliennes de l'hérédité ; c'est une transmission uniparentale maternelle. En fait, lors du développement des spermatozoïdes, l'ubiquitine serait liée aux mitochondries des spermatozoïdes, ce qui rendrait celles-ci promptes à la protéolyse après la fécondation (Sutovsky, 2003) et qui expliquerait pourquoi les mitochondries paternelles ne seraient pas transmises. De plus, il semblerait qu'il existe un



goulot d'étranglement génétique de l'ADNmt (**Figure 2**) durant la mise en place de la lignée germinale femelle (Shoubridge et Wai, 2007). Ce goulot permettrait d'expliquer pourquoi certaines combinaisons alléliques changent complètement en une seule génération (Koehler *et al.*, 1991). Cependant, cette théorie reste toujours controversée car certaines études tendent à démontrer que la transmission de l'ADNmt répondrait plutôt aux lois du hasard, tout en respectant la transmission uniparentale (Jenuth *et al.*, 1996).

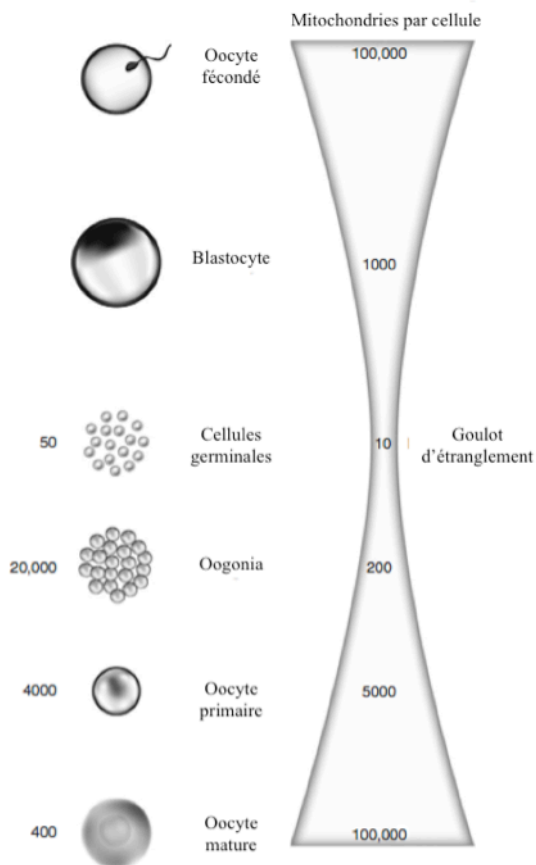


Figure 2. Le goulot d'étranglement de l'ADN mitochondrial. Le nombre de mitochondries varie durant le développement des cellules germinales chez la femelle. On observe une diminution drastique du nombre de mitochondries dans les cellules germinales primordiales, tandis que le développement de l'oocyte mature implique une augmentation importante de ce nombre. Les nombres indiqués à gauche montre la quantité de cellules chez la souris (Modifiée de Shoubridge et Wai, 2007).

Enfin, une récente découverte pourrait aider à notre compréhension de la transmission de l'ADNmt. On a effectivement démontré que l'ADNmt n'est pas présent sous forme d'ADN circulaire libre dans l'organelle mais bien sous forme de nucléoïdes. Dans ces structures, on trouve plusieurs molécules d'ADNmt condensées et associées avec des protéines liant l'ADN et qui sont associées à la réplication et transcription de l'ADNmt, notamment TFAM, l'hélicase TWINKLE, la polymérase  $\gamma$  et la mtssb (Iborra *et al.*, 2004; Chen et Butow, 2005). TFAM y compacte et protège l'ADNmt contre les conditions néfastes (Kang et Hamasaki, 2005), alors que d'autres molécules (ILV<sub>5</sub> et Aco1) donnent à l'ADNmt une conformation

favorable pour le métabolisme et l'expression génique, tout en lui laissant un bon niveau de protection (Chen et Butow, 2005). Les nucléoïdes permettent aussi de lier l'ADNmt aux membranes ce qui pourrait aider dans la ségrégation des mitochondries, bien qu'on ne comprenne toujours pas les mécanismes de ségrégation des nucléoïdes chez les humains. On connaît peu l'importance des nucléoïdes dans les échanges de matériel génétique entre les mitochondries dans les mouvements de fusion et de fission du réseau mitochondrial. Il semblerait cependant que la mobilité des nucléoïdes soit faible et que ceux-ci conservent leur position intramitochondriale peu importe les niveaux de fusion et de fission (Iborra *et al.*, 2004).

## 2. Les protéines mitochondriales

Seule une très faible proportion des protéines présentes dans la mitochondrie sont codées par l'ADNmt et fabriquées par le mitoribosome. La plupart des protéines mitochondriales sont effectivement codées par l'ADN nucléaire, fabriquées par les ribosomes cytoplasmiques et importées dans les mitochondries. La distribution de ces protéines dans les compartiments mitochondriaux appropriés est un processus très complexe. Il existe différentes voies d'importation selon la destination des protéines, c'est-à-dire la matrice mitochondriale, la membrane interne, la membrane externe ou l'espace intermembranaire (**Figure 3**).

### 2.1. Importation des protéines codées par l'ADN nucléaire dans la mitochondrie

Les protéines destinées à la matrice mitochondriale sont synthétisées dans les ribosomes cytoplasmiques et possèdent un signal cible d'une longueur de 10 à 80 acides aminés. Une fois entrée à l'intérieur de la mitochondrie, cette séquence signal est clivée par des peptidases, ce qui génère la forme mature de la protéine (Lithgow, 2000). Certaines protéines peuvent être transférées durant leur traduction alors que certaines protéines ne peuvent être importées dans la mitochondrie qu'après avoir été complètement formées (Neupert et Herrmann, 2007). Cette importation est réalisée par l'entremise de deux complexes; le TOM (pour *translocase outer membrane*), situé dans la membrane externe, et le TIM23 (pour *translocase inner membrane*), situé dans la membrane interne. Le complexe TOM est composé de sept protéines dont une partie (les protéines Tom70, Tom22 et Tom20) agit comme récepteur de surface responsable de la reconnaissance, et une autre partie (les protéines Tom40, Tom7, Tom6 et Tom5) en tant que responsable de la formation du pore. Après avoir franchies le

TOM, les protéines destinées à la matrice mitochondriale sont reconnues par le TIM23 (et plus particulièrement les protéines Tim50, Tim23, Tim21 et Tim17) et sont ensuite activement transférées (par un processus dépendant de l'ATP et du potentiel membranaire) par ses composantes motrices, les protéines Tim44, Tim16 et Tim14 (Chacinska *et al.*, 2002).

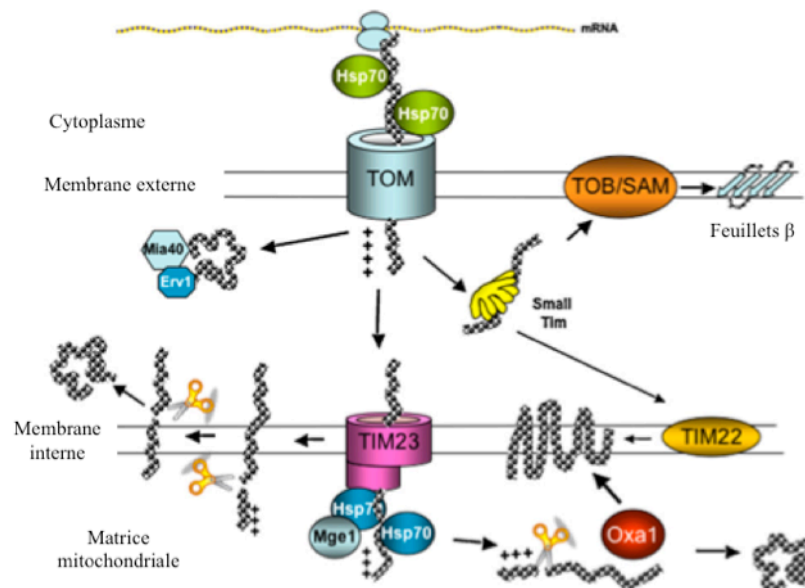


Figure 3. Le système d'importation des protéines dans la mitochondrie. Selon la destination finale des protéines codées par l'ADN nucléaire, différentes voies sont utilisées. Les protéines matricielles sont importées via les complexes TOM et TIM23 (qui est associé à Hsp70 et Mge 1). La séquence de ciblage est ensuite clivée par des protéases mitochondriales pour obtenir la forme mature. Les protéines de la membrane interne sont importées via les complexes TOM et TIM23 mais arrêtent au niveau du TIM23. Elles sont ensuite transférées latéralement dans la membrane et leur séquence de ciblage y est finalement clivée. Certaines protéines de la membrane interne peuvent être importées dans la matrice et ensuite être insérées dans la membrane par Oxa1. Les protéines très hydrophobes de cette membrane peuvent y être importées par TOM et ensuite TIM22 via *small* TIM. Les protéines de l'espace intermembranaire sont transportées par TOM, TIM23 et transférées latéralement dans la membrane interne. Leur séquence de ciblage est ensuite clivée ce qui libère la protéine dans l'espace intermembranaire. Certaines protéines sont directement envoyées dans cet espace via TOM et les chaperones Mia40 et Erv1. Enfin, les protéines de la membrane externe sont transférées par TOM, guidées par *small* TIM jusqu'au complexe TOB/SAM qui les insère dans la membrane (Modifiée de Diaz et Moraes, 2008).

Il existe trois voies pour l'importation des protéines destinées à la membrane interne mitochondriale. Une première voie concerne les protéines contenant plusieurs domaines transmembranaires. Ces protéines sont synthétisées avec une préséquence et sont transférées,

via TOM et TIM23, dans la matrice où cette préséquence est coupée. La protéine est ensuite exportée dans la membrane interne par Oxa1. Les protéines qui ne contiennent qu'un seul domaine transmembranaire sont importées via le TOM et le TIM23. Cependant, ces protéines sont stoppées au niveau du TIM23, transférées latéralement et intégrées à la membrane où la séquence cible est coupée. Enfin, les protéines qui contiennent plusieurs résidus hydrophobes et un nombre égal de domaines transmembranaires sont d'abord transférées par le TOM. Elles sont ensuite interceptées par le petit complexe Tim (formé des protéines Tim12, Tim10 et Tim9) présent dans l'espace transmembranaire, et transférées au complexe TIM22 (formée de protéines membranaires, soit Tim54, Tim22 et Tim18) qui les insère dans la membrane interne grâce à un processus dépendant du potentiel membranaire (Rehling *et al.*, 2003).

Certaines protéines destinées à l'espace intermembranaire peuvent contenir deux signaux permettant à la protéine de voyager par les complexes TOM et TIM23. Une première protéolyse permet leur insertion dans la membrane interne tandis qu'une deuxième protéolyse permet leur insertion dans l'espace intermembranaire. Certaines autres protéines sont transférées par le TOM mais sont ensuite prises en charge par deux protéines, Mia40 et Erv1, qui leur donnent leur conformation finale dans l'espace intermembranaire (Rissler *et al.*, 2005).

Les protéines de la membrane externe sont importées via le TOM et sont ensuite guidées par les petites protéines Tim vers un autre complexe situé dans la membrane externe mitochondriale. Ce complexe, le TOB/SAM, en référence aux feuilletts  $\beta$  souvent présents dans les protéines de la membrane externe, est responsable de l'insertion de ces protéines dans cette membrane (Diaz et Moraes, 2008).

## **2.2. La production des protéines codées par l'ADN mitochondrial**

L'ADNmt code pour 13 sous-unités protéiques du système de transport des électrons; soit sept sous-unités dans le complexe I, une sous-unité dans le complexe III, trois sous-unités dans le complexe IV et, enfin, deux sous-unités dans le complexe V. Ces différentes sous-unités sont formées par le ribosome mitochondrial ou mitoribosome, présent en plusieurs copies dans la matrice mitochondriale. Le mitoribosome possède une petite sous-unité, composée de l'ARNr 12S, codé par l'ADNmt, et de 29 autres sous-unités codées par l'ADN nucléaire, et une sous-unité plus grande, composée de l'ARNr 16S et de 48 autres sous-unités codées par l'ADN nucléaire (O'Brien, 2003). Les ARNm mitochondriaux ne possèdent pas de

séquence leader facilitant le lien avec le mitorobosome ni de structure permettant de diriger le ribosome vers le codon d'initiation (Taanman, 1999; Perez-Martinez *et al.*, 2008). La faible efficacité des voies traductionnelles mitochondriales est d'ailleurs probablement liée à cette absence de site de reconnaissance sur les ARNm mitochondriaux (Cantatore *et al.*, 1987). Les sous-unités fabriquées par les ribosomes cytoplasmiques et importées dans la mitochondrie s'assemblent avec les sous-unités protéiques fabriquées par les mitoribosomes pour former les différents complexes du système de transport des électrons où sont réalisées les oxydations phosphorylantes.

### 3. Les fonctions mitochondriales

#### 3.1. Les oxydations phosphorylantes

Un rôle important des mitochondries consiste à produire l'énergie cellulaire grâce aux processus d'oxydations phosphorylantes (OXPHOS). Pour ce faire, l'oxydation de divers substrats métaboliques (protéines, graisses et sucres) produit ultimement de l'eau, du CO<sub>2</sub> et de l'adénosine triphosphate (ATP). Plus précisément, le catabolisme des acides aminés, des acides gras et des glucides s'effectue au cours des trois étapes de la respiration cellulaire. Au cours de la première étape, l'oxydation des graisses (par la  $\beta$ -oxydation), les glucides (par la glycolyse) et de quelques acides aminés produit de l'acétyl-CoA. Durant la deuxième étape, des équivalents réduits (tels que le NADH et le FADH<sub>2</sub>) sont formés lors du cycle de Krebs. Ces équivalents réduits agissent comme donneurs d'électrons et sont transférés vers le système de transport des électrons (STE) couplé aux OXPHOS (la troisième étape). En fait, les OXPHOS débutent avec l'entrée des électrons dans le STE au niveau des complexes I ou II. Les électrons entrent par le complexe I sous forme de NADH, ou de FADH<sub>2</sub> via le complexe II, et sont transférés à l'ubiquinone. Ensuite, le complexe III transfère les électrons de l'ubiquinone réduit au cytochrome *c*. Le complexe IV complète la séquence en transférant les électrons du cytochrome *c* à l'oxygène. Ce transport des électrons est couplé à une translocation de protons, à travers la membrane mitochondriale interne, vers l'espace intermembranaire, ce qui crée un gradient transmembranaire. Enfin, ce gradient de protons constitue une réserve d'énergie qui est utilisée par le complexe V pour produire l'ATP (**Figure 4**). Chez l'humain, la plus grande partie de l'énergie utilisée par les cellules est

produite via les oxydations phosphorylantes. D'ailleurs, une personne normale produirait environ 65 kg d'ATP quotidiennement (Rich, 2003).

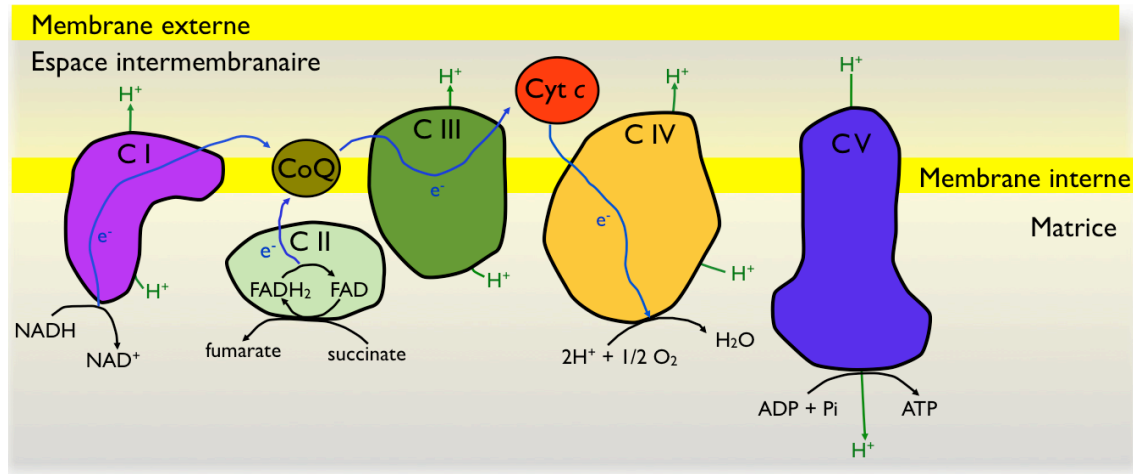


Figure 4. Le système de transport des électrons (STE) et les oxydations phosphorylantes. Les électrons entrent dans le STE par les complexes I ou II, et sont ensuite transférés aux complexes III et IV. Simultanément au passage des électrons dans les complexes I, III et IV, il y a translocation de protons vers l'espace intermembranaire, créant un gradient de protons. Celui-ci est utilisé par le complexe V pour produire l'ATP (CoQ: coenzyme Q; Cyt c : cytochrome c).

Le fonctionnement du système de transport des électrons et des OXPHOS a été proposé pour la première fois par Peter Mitchell, sous le nom de théorie chimio-osmotique (Mitchell, 1961), théorie pour laquelle il a reçu le prix Nobel en 1978. Le système de transport des électrons couple donc le passage des électrons à travers les complexes I, III et IV avec une translocation de protons dans l'espace intermembranaire. Le transfert des électrons est notamment possible grâce aux potentiels rédox qui vont croissant dans le STE : de -0,3V pour le couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (au complexe I) à 0,8V pour  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  (au complexe IV). La translocation de protons crée un potentiel électrochimique de protons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) de part et d'autre de la membrane interne car celle-ci possède une faible perméabilité pour les protons. On appelle ce gradient la force proton-motrice ( $\Delta p$ ), constituée, en fait, d'un gradient de charges ( $\Delta\Psi_m$ ) et d'un gradient chimique ( $\Delta\text{pH}$ ) où  $\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi_m - 59 \Delta\text{pH}$ . Cette énergie potentielle est donc utilisée par l'ATP synthase pour transférer « l'énergie des électrons » dans l'ATP, utilisant 3 protons pour produire un ATP. Le gradient de protons n'est cependant pas seulement essentiel pour la production d'ATP, il est absolument nécessaire à l'importation des protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale (Schleyer

*et al.*, 1982; Geissler *et al.*, 2000). Une dépolarisation trop importante de la mitochondrie peut aussi être associée au largage de facteur apoptotiques dans le cytosol, induisant l'apoptose et la mort cellulaire (Marchetti *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996; Dussmann *et al.*, 2003).

### 3.1.1. Le complexe I

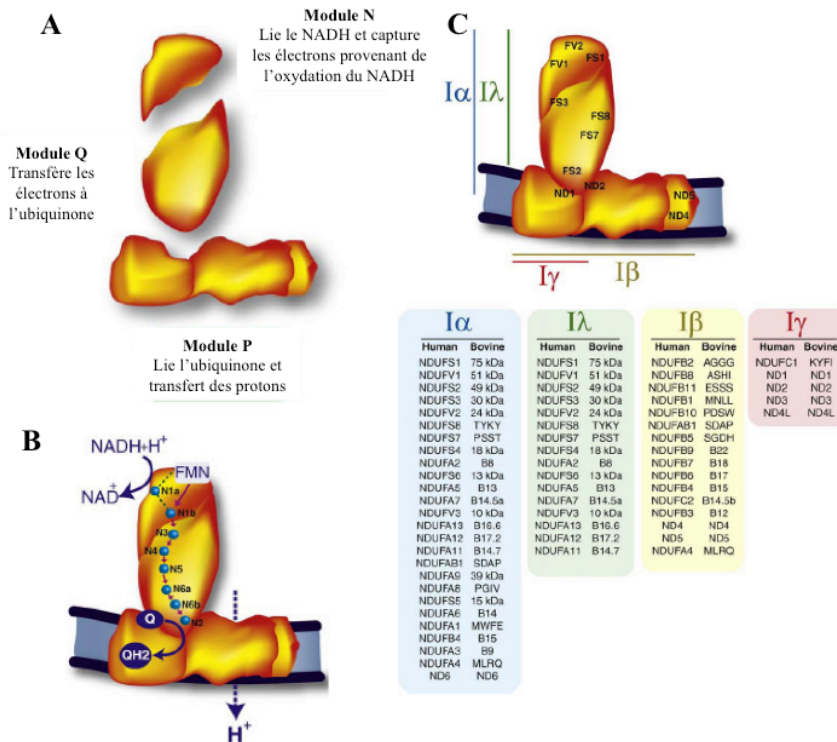


Figure 5. Le complexe I. (A) Le complexe I peut être divisé en trois modules, N, Q et P. (B) L'oxydation du NADH libère des électrons qui sont ensuite transférés aux 7 centres Fer-Soufre. Les électrons sont finalement transférés à l'ubiquinone. Ce processus est couplé à la translocation de protons vers l'espace intermembranaire. (C) Le complexe I peut aussi être subdivisé en 4 sous-complexes: Iα, Iλ, Iβ et Iγ. Les sous-unités formant chacun des sous-complexes sont indiquées (Modifiée de Lazarou *et al.*, 2009).

La NADH-coenzyme Q réductase (EC 1.6.6.3) transporte les électrons du NADH à l'ubiquinone, aussi appelé coenzyme Q (CoQ), tout en transférant quatre protons dans l'espace intermembranaire. Il est possible de scinder ce complexe en trois modules fonctionnels (**Figure 5A**). Premièrement, le module N lie et oxyde le NADH ce qui libère les électrons qui sont alors transférés à l'accepteur primaire d'électrons, une flavine mononucléotide (FMN) liée de façon non covalente, et ensuite aux centres rédox Fer-Soufre (Fe-S). Le module Q reçoit les électrons du module précédent et les transfère à l'ubiquinone (**Figure 5B**). Enfin, le module Q est responsable de la translocation des protons dans l'espace intermembranaire (Lazarou *et al.*, 2009).

Le complexe I est le plus gros complexe du système de transport des électrons avec 45 sous-unités, pour une taille totale d'environ 1000 kDa (Remacle *et al.*, 2008). Chez les mammifères, 14 sous-unités sont considérées comme essentielles à son activité catalytique (Hirst *et al.*, 2003; Remacle *et al.*, 2008). Les autres sous-unités jouent probablement un rôle dans la régulation et l'assemblage de ce complexe (Friedrich *et al.*, 1994). Les 7 sous-unités

ND1 à ND6, ainsi que ND4L sont codées par l'ADNmt. Le complexe I possède une forme en L, avec deux bras perpendiculaires, dont un est hydrophobe et enchâssé dans la membrane interne et l'autre hydrophile, se projetant dans la matrice mitochondriale (Friedrich et Bottcher, 2004). Le complexe I peut être divisé en 4 sous complexes;  $I\alpha$ ,  $I\lambda$ ,  $I\beta$  et  $I\gamma$  (**Figure 5C**). Le sous complexe  $I\alpha$  est constitué par les sous-unités formant le bras périphérique et certaines sous-unités du bras membranaire hydrophobe. Le sous complexe  $I\beta$  est formé par la plupart des sous-unités formant le bras membranaire. Les sous-unités ne se trouvant dans aucun des sous complexes précédents sont situés dans le sous complexe  $I\gamma$ . Le sous complexe  $I\alpha$  peut être dissocié pour former un autre sous complexe, le  $I\lambda$ . Ce dernier représente le bras périphérique hydrophile et contient les 15 sous-unités fournissant les centres Fe-S (Vogel *et al.*, 2007; Lazarou *et al.*, 2009).

Ce complexe semble exister sous deux formes, active (A) ou inactive (D), qui sont caractérisées par des propriétés cinétiques différentes. La forme A est apte à réaliser l'action catalytique (sensible à la roténone) du complexe I tandis que la forme D peut être complètement réduite par le NADH et oxydée par des accepteurs d'électrons artificiels mais ne peut transférer ses électrons à l'ubiquinone (Maklashina *et al.*, 2003). La désactivation (la transition de la forme A à D) se produit lorsque les substrats du complexe sont limitants, que ce soit en présence insuffisante de NADH ou de coenzyme Q (Vinogradov et Grivennikova, 2001). L'activation ou la transition de la forme D à A dépend du pH et de la présence de différents cations bivalents. Enfin, les deux formes diffèrent de part l'accessibilité de leur groupement SH qui peut expliquer les différentes réponses face aux inhibiteurs (Ushakova *et al.*, 2005).

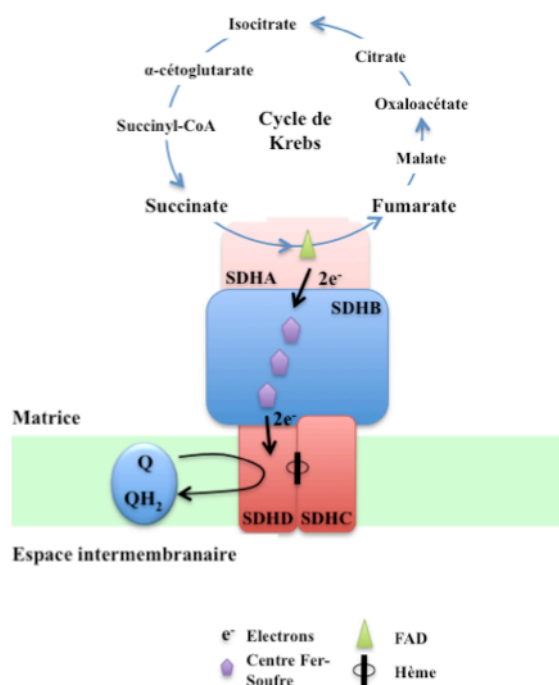
### 3.1.2. Le complexe II

La succinate-coenzyme Q réductase (EC 1.3.5.1) transfère les électrons du succinate à l'ubiquinone. Cet enzyme fait partie du cycle de Krebs tout en étant lié à la membrane interne mitochondriale (**Figure 6**). Ce complexe est composé de quatre sous-unités codées par l'ADN nucléaire. Il peut être divisé en deux parties : une fraction soluble et une fraction hydrophobe qui ancre le complexe à la membrane. La fraction soluble est liée au cofacteur FAD (pour flavine adénine dinucléotide) et à trois centres Fe-S. La fraction membranaire contiendrait le site de fixation de l'ubiquinone (Berry *et al.*, 2000).



Ce complexe ne transfère pas de protons dans l'espace intermembranaire. Le cofacteur FAD accepte les électrons tandis que les centres Fe-S transfère ceux-ci vers le site ubiquinone réductase (Hunte *et al.*, 2003).

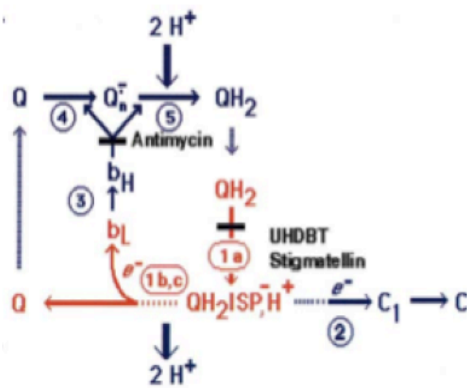
Les complexes I et II constituent les principaux points d'entrée des électrons dans le STE. Néanmoins, il existe d'autres voies d'entrée pour les électrons, telles que la flavoprotéine de transfert des électrons-ubiquinone oxydoréductase et la glycérol-3-phosphate déhydrogénase (Watmough et Frerman, 2010). Toutes ces enzymes réduisent donc l'ubiquinone. Cette molécule joue ainsi un rôle clé dans le STE en liant les différentes voies d'entrée des électrons et les autres complexes du STE. L'ubiquinone (aussi appelé coenzyme Q ou CoQ) peut être présent sous trois formes différentes : (i) la forme réduite (QH<sub>2</sub>), aussi appelée ubiquinol, (ii) la forme oxydée (Q), nommée ubiquinone et (iii) la forme intermédiaire, le radical ubisemiquinone (Q<sup>•</sup>) (Mulkidjanian, 2005).



**Figure 6. Le complexe II.** Le complexe II fait partie de cycle de Krebs. Il accepte les électrons via la FAD située dans la sous-unité SDHA. Les électrons sont ensuite transférés aux centres Fer-Soufre, dans la sous-unité SDHB, et dirigés vers les sous-unités SDHC et SDHD, où ils réduisent l'ubiquinone (Q). Ce complexe relie donc le cycle de Krebs et le système de transport des électrons (Modifiée de Horsefield *et al.*, 2004).

### 3.1.3. Le complexe III

La coenzyme Q-cytochrome *c* réductase (EC 1.10.2.2) qui est aussi appelée complexe cytochrome *bc*<sub>1</sub>, transfère les électrons du CoQ et les donne au cytochrome (cyt) *c*, tout en participant à l'élaboration du gradient de protons. Ce complexe est un dimère formé de deux monomères constitués de 11 sous-unités où seul le cyt *b* est codé par l'ADNmt. Cet enzyme comprend trois sous-unités catalytiques portant des groupes prosthétiques (non polypeptidiques) : le cyt *b* qui possède deux hèmes *b* (*b*<sub>H</sub> ou *b*<sub>562</sub> et *b*<sub>L</sub> ou *b*<sub>566</sub>), le cyt *c*<sub>1</sub> et la protéine Rieske qui contient un centre Fe-S (Berry *et al.*, 2000).



**Figure 7.** Le mécanisme du complexe III. Le transfert des électrons, de l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>) au cytochrome *c*, par le complexe III nécessite 2 cycles, au cours desquels un électron est transféré vers le cytochrome *c* et l'autre électron, vers les cytochromes *b* (voir le texte pour plus de détails). L'oxydation d'un ubiquinol est accompagnée de la translocation de deux protons vers l'espace intermembranaire. Les sites d'action des inhibiteurs du complexe (antimycine, UHDBT et stigmatellin) sont présentés avec des traits (Modifiée de Hunte *et al.*, 2003).

Le mécanisme par lequel les électrons sont transférés spécifiquement de l'ubiquinol (qui transporte deux électrons simultanément) au cyt *c* (qui ne transporte qu'un seul électron à la fois) est nommé le cycle proton moteur Q. Brièvement, lors de la première étape de ce cycle, l'ubiquinol est oxydé; un des électrons est transféré au centre Fe-S de la protéine Rieske et l'autre électron est dirigé vers le cyt *b*<sub>L</sub>. Ensuite, le centre Fe-S réduit « bascule » et approche l'électron du cyt *c*<sub>1</sub>, ce qui permet la réduction du cyt *c*<sub>1</sub> et ensuite du cyt *c*. Simultanément, le cyt *b*<sub>L</sub> réduit transfère son électron au cyt *b*<sub>H</sub>, qui lui réduit un ubiquinone en ubisemiquinone. L'oxydation d'un deuxième ubiquinol permet de réduire cet ubisemiquinone en ubiquinol et donc de recommencer le cycle (**Figure 7**). Il s'agit en fait de diviser en deux l'oxydation de l'ubiquinone car un seul électron peut être transporté par les cytochromes. Enfin, deux protons sont transférés dans l'espace intermembranaire pour chaque ubiquinol oxydé (Hunte *et al.*, 2003).

### 3.1.4. Le complexe IV

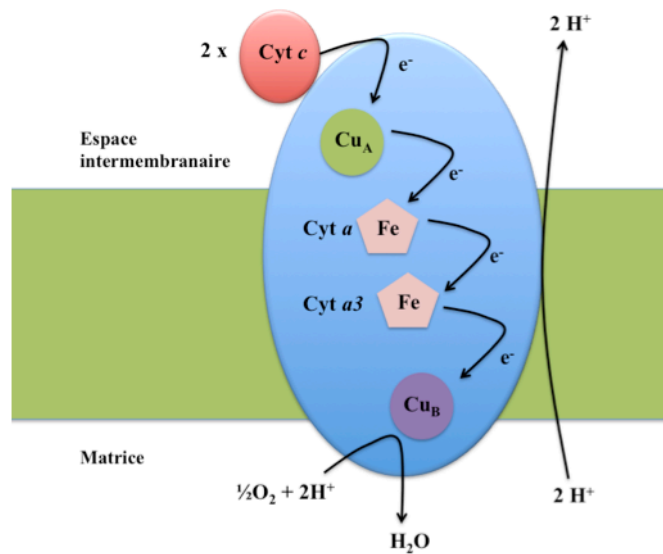


Figure 8. Le complexe IV. Le  $\text{cyt } c$  réduit se fixe sur la sous-unité II et les électrons sont transférés au  $\text{Cu}_A$  et transitent ensuite vers la sous-unité I où ils sont transférés successivement au  $\text{cyt } a$ ,  $\text{cyt } a_3$ , au  $\text{Cu}_B$  et enfin à l'oxygène. Pour chaque électron transféré, un proton est transféré vers l'espace intermembranaire (Modifiée de Branden *et al.*, 2006).

La cytochrome  $c$  oxydase (EC 1.9.3.1), l'enzyme terminale du STE, transfère les électrons du cytochrome  $c$  réduit à l'accepteur final des électrons, l'oxygène, tout en contribuant à la force proton-motrice. Chez les mammifères, la COX est composée de 13 sous-unités dont trois sont codées par l'ADNmt (les sous-unités I, II et III). Ces sous-unités contiennent les cytochromes  $a$  et  $a_3$  ainsi que les ions cuivres  $\text{Cu}_A$  et  $\text{Cu}_B$  (Mills et Ferguson-Miller, 2003). Ces sous-unités assurent la fonction catalytique de l'enzyme alors que les sous-unités codées par l'ADN nucléaire, qui ne sont présentes que chez les eucaryotes, ont des fonctions mal définies. En fait, ces sous-unités pourraient exercer des fonctions régulatrices et/ou structurales: sept sous-unités nucléaires sont membranaires et trois sont périphériques. Elles portent aussi plusieurs sites de fixation pour l'ADP ou l'ATP (Napiwotzki et Kadenbach, 1998).

La réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O nécessite quatre électrons (**Figure 8**). Brièvement, le cyt *c* réduit se fixe sur la sous-unité II où les électrons sont transférés au Cu<sub>A</sub> et transitent ensuite vers la sous-unité I où ils sont transférés successivement au cyt *a*, cyt *a*<sub>3</sub>, au Cu<sub>B</sub> et enfin à l'oxygène (Branden *et al.*, 2006). Des réductions à un seul électron peuvent toutefois se produire, ce qui mène à la formation de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène. Le transfert des électrons à l'oxygène est couplé au passage de quatre protons dans l'espace intermembranaire.

La cytochrome *c* oxydase semble être le seul complexe du STE pour lequel on trouve plusieurs isoformes de certaines sous-unités nucléaires. Différentes isoformes des sous-unités VIa, VIIa et VIII sont exprimées dans les muscles cardiaques et squelettiques ainsi que dans plusieurs tissus non musculaires (Kadenbach *et al.*, 2010). Une isoforme de la sous-unité IV (IV-2) a été identifiée dans les tissus pulmonaires (Huttemann *et al.*, 2001), alors qu'une isoforme de la sous-unité VIb a été observée exclusivement dans les tissus testiculaires (Huttemann *et al.*, 2003a). Une troisième isoforme de la sous-unité VIII dont la fonction reste inconnue a aussi été identifiée (Huttemann *et al.*, 2003b).

Le complexe IV est aussi très intéressant car il pourrait constituer un second mécanisme de contrôle respiratoire, avec la force proton-motrice. Ce mécanisme serait basé sur l'inhibition allostérique (indépendante du potentiel de membranaire mitochondrial) de la COX par fixation d'ATP (Arnold et Kadenbach, 1997). En fait, l'ATP peut se lier au niveau de la sous-unité IV du côté matriciel lorsque le ratio ATP/ADP est élevé. Ce phénomène permettrait donc d'ajuster la production énergétique à la demande physiologique. L'hormone thyroïdienne T2 peut se lier à la sous-unité Va, ce qui a pour effet de lever l'inhibition en empêchant la fixation de l'ATP (Arnold *et al.*, 1998b). Cette inhibition allostérique serait aussi dépendante de la phosphorylation de certaines sous-unités du complexe, notamment aux niveaux de certains résidus sérine et thréonine de la sous-unité I (Helling *et al.*, 2008). Enfin, l'ajout de calcium supprime l'inhibition, probablement parce qu'il cause l'activation de plusieurs phosphatases, et donc, la déphosphorylation des résidus impliqués dans le phénomène (Kadenbach *et al.*, 2010). En bref, B. Kadenbach propose que ce mécanisme, dépendant de l'état de phosphorylation de la COX, constituerait un deuxième mécanisme dans le contrôle respiratoire. Lorsque phosphorylée, la COX se trouverait en état relâché, où le potentiel de membrane mitochondrial et la production de ROS seraient maintenus à des niveaux plus bas grâce à l'inhibition allostérique par l'ATP. Lorsque déphosphorylée, la COX se trouverait dans un état excité, où le potentiel de membrane mitochondrial serait beaucoup

plus élevé, ce qui pourrait mener à une production accrue des ROS et à l'apoptose (Kadenbach *et al.*, 2010).

### 3.1.5. Le complexe V

L'ATP synthase (EC 3.6.1.34) utilise la force proton-motrice afin de produire l'ATP à partir de l'ADP (**Figure 9**). Ainsi, il constitue la dernière étape des OXPHOS. On peut diviser ce complexe en trois; la partie catalytique ( $F_1$ ) se situant du côté matriciel, la partie membranaire constituant le canal ( $F_0$ ), ainsi que les deux bras connecteurs, le périphérique et le central (Arnold *et al.*, 1998a).

Le secteur  $F_1$  constitue le rotor qui catalyse la production d'ATP. Cette partie est constituée de 5 sous-unités :  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , et  $\epsilon$ . Le sous complexe  $F_1$  est capable d'hydrolyser l'ATP mais requiert la présence de  $F_0$  pour synthétiser l'ATP. Le secteur  $F_0$  constitue le stator, qui assure la connexion entre le domaine catalytique et les composantes hydrophobes du complexe, jouant le rôle d'un canal à protons. Ce secteur est formé de 10 sous-unités (Collinson *et al.*, 1994a; Collinson *et al.*, 1994b). L'indice  $o$  indiquerait d'ailleurs que c'est cette partie du complexe qui donne la sensibilité du complexe V à l'oligomycine, un puissant inhibiteur du complexe V et de la respiration mitochondriale (McCarty, 1992). Une petite protéine de 10 kDa peut aussi se lier au secteur  $F_1$  et inhiber l'hydrolyse de l'ATP par ce complexe. Cette protéine, nommée  $IF_1$ , participe à la formation des dimères de l'ATP synthase (Garcia *et al.*, 2006).

Le mécanisme catalytique fait intervenir des changements conformationnels de la partie  $F_1$ , qui porte les sites de fixation des nucléotides, produisant ainsi l'ATP à partir de l'ADP et de l'orthophosphate inorganique ( $P_i$ ). Les protons précédemment transférés par les complexes I, III et IV sont présents en plus grande quantité dans l'espace intermembranaire et tendent donc à vouloir retourner dans la matrice mitochondriale. Comme la membrane interne est imperméable aux protons, ils ne peuvent traverser la bicouche lipidique qu'au niveau des rotors  $F_0$  de l'ATP synthase. Ce flux provoque la rotation de  $F_0$  grâce à la neutralisation par les protons des charges portées par les asparagines, ce qui entraîne des changements de conformation des sous-unités de  $F_1$  (Stock *et al.*, 2000; Nakamoto *et al.*, 2008).

Les sous-unités  $\beta$  de  $F_1$  connaissent trois conformations qui se succèdent: (dans l'ordre) 1-lâche (L), 2-serrée (S) et 3-ouvert (O). Chacune des trois sous-unités  $\beta$  est dans l'une de ces trois positions, qui ont un lien direct avec la fixation (position L), la

transformation (position S) et la libération des réactants de la synthèse de l'ATP (position O). En conformation L, le site catalytique de  $\beta$  a une grande affinité pour l'ADP et le  $P_i$ , ce qui provoque leur fixation. En conformation S, le site actif se resserre sur les substrats et les condense en ATP, pour lequel il a une très grande affinité : l'énergie mécanique de contraction du site actif provoque la formation d'une liaison ester phosphorique entre l'ADP et le  $P_i$  (Stock *et al.*, 2000; Nakamoto *et al.*, 2008). La conformation O, enfin, avec une détente relative du site actif, donc une moindre compatibilité tridimensionnelle avec la molécule d'ATP, permet la libération de celle-ci dans la matrice mitochondriale (Stock *et al.*, 2000; Nakamoto *et al.*, 2008).

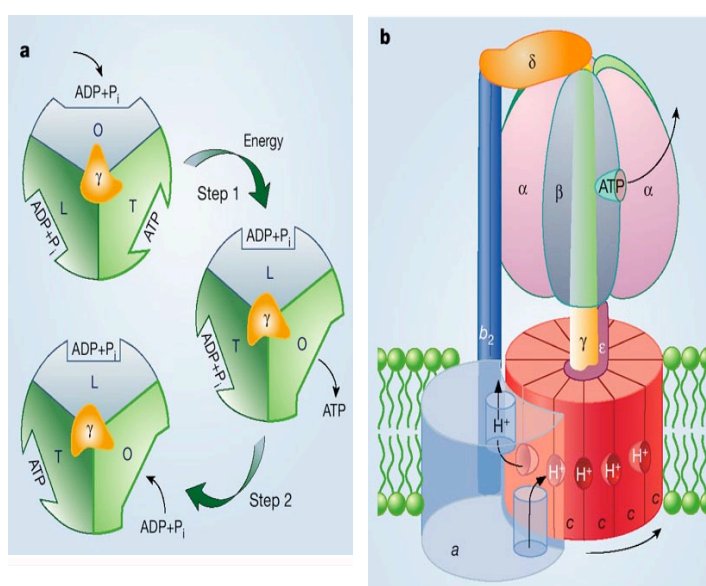


Figure 9. L'ATP synthase. (A) Les sous-unités  $\beta$  possèdent trois conformations: lâche (L), serrée (T) et ouverte (O). Ces différentes conformations permettent respectivement l'entrée des substrats, la fabrication de l'ATP et le relargage de l'ATP. (B) Les différentes sous-unités du complexe V. La translocation des protons se fait au niveau de la sous-unité  $a$  via les sous-unités  $c$  (Modifiée de Cross, 2004).

L'hydrolyse de l'ATP est très exergonique et peut être couplée à de très nombreuses réactions endergoniques au sein de la cellule. La variation d'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) lors de la réaction d'hydrolyse de l'ATP en ADP vaut  $-51,8$  kJ/mole. L'ATP est pour cette raison une molécule riche en énergie chimique (d'hydrolyse), mais qui ne doit pas être considérée comme une réserve énergétique car la demi-vie de l'ATP est d'environ une minute.

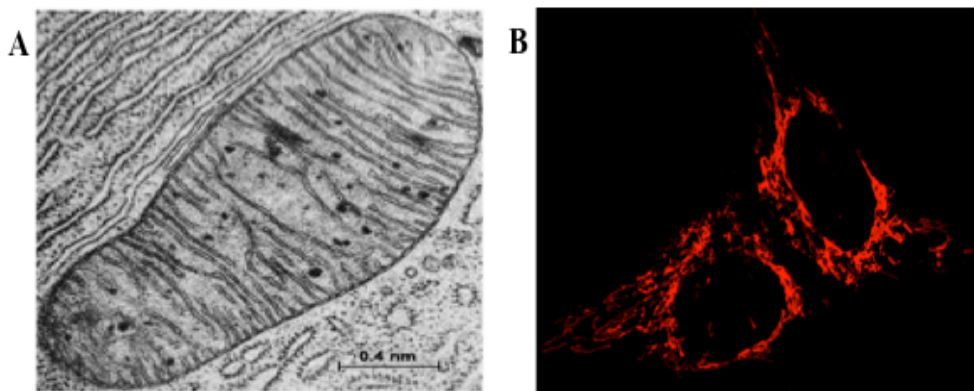
L'exportation de l'ATP hors de la mitochondrie est couplée à l'importation de l'ADP. Ce processus est réalisé par l'entremise des transporteurs des nucléotides adényliques (ANT). L'ANT échange une molécule d'ADP<sup>3-</sup> cytosolique contre une molécule d'ATP<sup>4-</sup> matricielle. Etant donné que ce processus est électrogénique, l'échange ADP-ATP s'accompagne d'une consommation du potentiel de membrane mitochondrial (Trezeguet *et al.*, 2008). L'ANT humain serait présent sous 4 isoformes: l'ANT1 qui est exprimée majoritairement dans les

muscles et le cerveau, l'ANT2 qui est exprimée dans les tissus fortement prolifératifs (tels que les cellules embryonnaires et cancéreuses) et les cellules non différenciées, l'ANT3 qui est exprimée ubiquitairement et l'ANT4 qui est exprimée dans les cellules germinales. L'ANT2 serait faiblement exprimée dans les tissus sains, alors que son expression augmenterait dans les cellules cancéreuses. Alors que les isoformes ANT1 et ANT3 exporteraient l'ATP vers le cytosol, l'ANT2 effectuerait l'opération inverse (Chevrollier *et al.*, 2011).

### 3.1.6. Les supercomplexes

La vision de l'organisation des complexes du STE a quelque peu changé depuis quelques années. En effet, le premier modèle, le modèle *solid-state* de Chance et Williams (Chance et Williams, 1955) qui stipulait que les interactions entre les complexes et la position de ces complexes dans la membrane étaient fixes, a changé graduellement parce les enzymes du STE semblaient fonctionnelles même lorsqu'elles étaient isolées comme des complexes individuels (Hatefi *et al.*, 1962). Plus tard, ce premier modèle a été substitué par le modèle *random collision* proposé par Hackenbrock et al, (Hackenbrock *et al.*, 1986) qui démontrait que les complexes étaient disposés dans la membrane aléatoirement et que leurs interactions étaient dues au hasard. Bien que plusieurs études semblaient appuyer ce dernier modèle (Hochli et Hackenbrock, 1976), le concept d'une organisation figée des complexes ne fut jamais abandonné puisqu'on notait des associations entre certains complexes, notamment le III et le IV (Hatefi *et al.*, 1962; Berry et Trumpower, 1985; Sone *et al.*, 1987; Niebisch et Bott, 2003; Stroh *et al.*, 2004). De plus, des études récentes ont démontré l'existence d'associations physiques entre certains complexes du STE. En fait, en présence de détergents plus doux (que le *n*-dodecylmaltoside qui solubilise les complexes sous forme monomérique), tels que le triton ou la digitonine, il est possible d'isoler les complexes sous plusieurs formes. Par exemple, on trouve des supercomplexes I-III, I-III-IV et III-IV (Schagger, 2001; Acin-Perez *et al.*, 2008). Les complexes ou supercomplexes seraient donc organisés en respirasome fonctionnel, selon une stoechiométrie précise : le supercomplexe  $I_1III_2$ , pouvant lui-même être assemblé en  $I_1III_2IV_2$  et  $I_1III_2IV_4$ , les indices faisant référence à la quantité de complexes individuels présents dans les supercomplexes (Hatefi, 1985; Schagger, 1995; Schagger, 2001). Le complexe II n'a jamais été observé en association avec d'autres complexes, tout comme l'ATP synthase, qui existe néanmoins à l'état de dimère. Ce dernier, toutefois, semble interagir avec le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) et le transporteur de phosphate, formant un ATP synthasome (Ko *et al.*, 2003). De tels assemblages pourraient

donc permettre le « channeling » des substrats entre les complexes (Lenaz *et al.*, 2007), ce qui contredit le modèle du *random collision*. Par exemple, la séquestration de l'ubiquinol entre les complexe I et III pourrait augmenter la vitesse de leur réaction enzymatique respective et la respiration mitochondriale globale (voir Bianchi *et al.*, 2004; Lenaz *et al.*, 2007; Genova *et al.*, 2008).



**Figure 10. Le réseau mitochondrial.** (A) Photo d'une mitochondrie de cœur de boeuf, obtenue à partir d'un microscope électronique; on y voit une organelle isolée. (B) Photo du réseau mitochondrial, obtenue à partir de cellules cancéreuses de la prostate (DU145). On voit que ce réseau est constitué de tubules s'étendant dans le cytosol.

### 3.1.7. Le réseau mitochondrial

Comme pour les supercomplexes, la vision de la mitochondrie a bien changé depuis plusieurs années. Alors qu'au départ, on se représentait la mitochondrie comme une organelle individuelle, telle que vue dans les images provenant de la microscopie électronique (**Figure 10**), on sait maintenant que les mitochondries peuvent être organisées en réseau. Ce réseau est donc formé de plus ou moins longs tubules, selon le statut énergétique de la cellule. Ainsi, des cellules où les mitochondries sont inhibées et/ou dépolarisées possèdent un réseau ponctué, alors qu'en conditions basales, le réseau est davantage tubulaire. Cet assemblage tubulaire s'étend donc dans le cytosol et semble en contact avec le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le cytosquelette (Amchenkova *et al.*, 1988; Szabadkai *et al.*, 2003; Benard *et al.*, 2007).



La forme globale du réseau est régie par les phénomènes de fusion et de fission (Hales, 2004; Frazier *et al.*, 2006; Cervený *et al.*, 2007). Chez les mammifères, la fusion des mitochondries est réalisée par l'intermédiaire de la mitofusine 2 et OPA1 (pour *dynamin-related guanosine triphosphatase mutated in dominant optic atrophy*), alors que la fission s'opère principalement par Drp1 (pour *dynamin-related protein 1*). Ces processus sont régulés et coordonnés selon différents stades de la cellule, notamment la croissance, la mitose et l'apoptose (voir Cervený *et al.*, 2007). Enfin, il est intéressant de noter que le déplacement des mitochondries dans l'axone d'un neurone se fait grâce aux phénomènes de fusion et de fission, permettant donc aux mitochondries de se rendre là où l'énergie est davantage nécessaire (Hollenbeck et Saxton, 2005).

### **3.2. Le stress oxydant**

Les mitochondries produisent aussi d'importants niveaux de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes (Beckman et Ames, 1998). Les ROS, eux, sont dérivés de l'oxygène moléculaire. Ces molécules sont de puissants oxydants qui peuvent altérer la structure des constituants cellulaires. Ils sont considérés comme des sous-produits normaux du métabolisme aérobie. Ces molécules sont impliquées dans plusieurs fonctions physiologiques importantes telles que l'apoptose, le développement, la prolifération cellulaire, les signaux de transduction et les fonctions immunitaires (Boveris et Cadenas, 2000). Lorsque les niveaux de ROS deviennent trop importants (stress oxydant), il s'ensuit plusieurs types de dommages (spécifiques aux mitochondries, ou non) : des mutations à l'ADNmt, l'ouverture du pore de perméabilité membranaire, la libération de cytochrome *c* pouvant entraîner l'apoptose, des dommages aux protéines du STE ou encore des dommages aux lipides. Ces dérèglements dus au stress oxydant sont associés à une multitude de pathologies, des maladies neurodégénératives au vieillissement.

#### **3.2.1. La production des ROS**

Il est dorénavant reconnu que les ROS sont principalement produits par les mitochondries. Entre 0.1 et 4 % de l'oxygène utilisé par ces dernières serait détourné vers la

production de ROS (Beckman et Ames, 1998; Miwa *et al.*, 2003). Ils sont, plus précisément, formés majoritairement au niveau du système de transport des électrons. La réduction de l'oxygène (en tant qu'accepteur final du système de transport des électrons) en eau nécessite l'apport de quatre électrons (Beckman et Ames, 1998). Or, des réductions à un seul électron, produisant des anions superoxyde, peuvent aussi survenir. L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) constitue le précurseur de la plupart des ROS et induit les réactions oxydatives en chaîne. La production de cet anion augmente en présence d'inhibiteur de la chaîne de transport des électrons et, généralement, lorsque les composantes de cette chaîne sont dans un état très réduit (Abele *et al.*, 2002). La production de ROS pourrait aussi dépendre davantage du gradient de protons que de la vitesse de transfert des électrons entre les complexes. Ainsi, lorsque le gradient est élevé, les complexes ont plus de difficulté à transférer les protons dans l'espace intermembranaire, ralentissant ainsi le transfert (ce qui augmente l'état réduit de chaque complexe). Dans ce cas, les électrons ont plus de temps pour rencontrer une molécule d'oxygène et créer un anion  $\text{O}_2^-$ . Les protéines découplantes qui permettent de diminuer le gradient de protons peuvent induire une diminution de la production de ROS (Brand *et al.*, 2004).

La dismutation de l' $\text{O}_2^-$ , de façon spontanée ou par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase (voir plus bas), produit du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qui peut, à son tour, être complètement réduit en eau ou alors partiellement réduit en radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), l'oxydant le plus puissant parmi ceux observé dans les systèmes biologiques (Turrens, 2003). Ce dernier attaque non spécifiquement toute molécule biologique, ce qui diminue son pouvoir de dispersion. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre mais joue un rôle oxydant ou réducteur dans plusieurs fonctions physiologiques. À l'inverse de  $\text{O}_2^-$ , le  $\text{H}_2\text{O}_2$  diffuse aisément à travers les membranes et les compartiments aqueux. Ces deux ROS sont considérés comme les moins toxiques mais ils ne sont pas à négliger puisqu'ils conduisent à la formation de radicaux  $\text{OH}\cdot$  (Turrens, 2003).

Les complexes I et III sont reconnus comme les principaux producteurs de ROS (Chen *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2004; Miwa et Brand, 2005). Les mécanismes de production par le complexe I de mitochondries isolées semblent bien compris. Brièvement, le complexe I produit l'anion superoxyde selon deux mécanismes. Le premier mécanisme concerne la production de  $\text{O}_2^-$  par la réaction entre l' $\text{O}_2$  et la FMN complètement réduite. Puisque la réduction du FMN dépend du ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , l'inhibition du STE par des dommages, des mutations, l'ischémie, la perte de cytochrome *c* et l'augmentation du pool de NADH due à

une faible demande en ATP ou une faible respiration augmente la production de  $O_2^-$  (Boveris *et al.*, 1972; Kushnareva *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Ce modèle explique donc pourquoi la roténone augmente de façon considérable la production de ROS : elle induit un retour des électrons vers la FMN (Takeshige et Minakami, 1979; Votyakova et Reynolds, 2001). Le deuxième mécanisme de production de l'anion superoxyde concerne le transport inversé des électrons (RET). Ce RET se produit lorsque le pool de CoQ est très réduit et le gradient de protons est très élevé. Ces conditions forcent les électrons à retourner du CoQ vers le complexe I, où le  $NAD^+$  est réduit en NADH au niveau du FMN. Bien que le site de production spécifique de l' $O_2^-$  durant le RET n'est pas encore connu, il semble qu'il soit le plus important producteur de ROS dans les mitochondries (Lambert et Brand, 2004b; Lambert et Brand, 2004a). Cette importante production de ROS peut être observée sur des mitochondries respirant en succinate, en  $\alpha$ -glycérophosphate ou à partir de l'oxydation des acides gras (Votyakova et Reynolds, 2001; Kushnareva *et al.*, 2002; St-Pierre *et al.*, 2002), mais peut être complètement inhibée en présence de roténone (Lambert et Brand, 2004b). Le complexe I forme des ROS exclusivement du côté de la matrice mitochondriale (Miwa *et al.*, 2003).

Le complexe III, en présence d'antimycine, produit d'importants niveaux de  $O_2^-$ , principalement, via la réaction entre l'oxygène et l'ubisemiquinone lié au site  $Q_0$  du complexe III (Cadenas *et al.*, 1977; Zhang *et al.*, 1998). Cependant, il semble qu'en absence d'antimycine, l'anion superoxyde est produit à faible taux, même lorsque la respiration est inhibée en aval, *i.e.*, inhibition par le KCN ou perte de cytochrome *c* (Murphy, 2009). Le complexe III produirait 70% des ROS dans la matrice et 30% dans le cytosol (Miwa et Brand, 2005). On ne sait cependant pas vraiment quel complexe, le I ou le III, est le plus important producteur de ROS, certains auteurs appuyant le complexe I (Murphy, 2009) et d'autres le III (Kudin *et al.*, 2004).

Il existe quelques autres sites de production de ROS à l'intérieur de la mitochondrie, notamment au niveau de l' $\alpha$ -cétoglutarate (Starkov *et al.*, 2004), la flavoprotéine de transfert des électrons (ETF) : CoQ oxidoréductase (St-Pierre *et al.*, 2002), l'oxydation du dihydro-

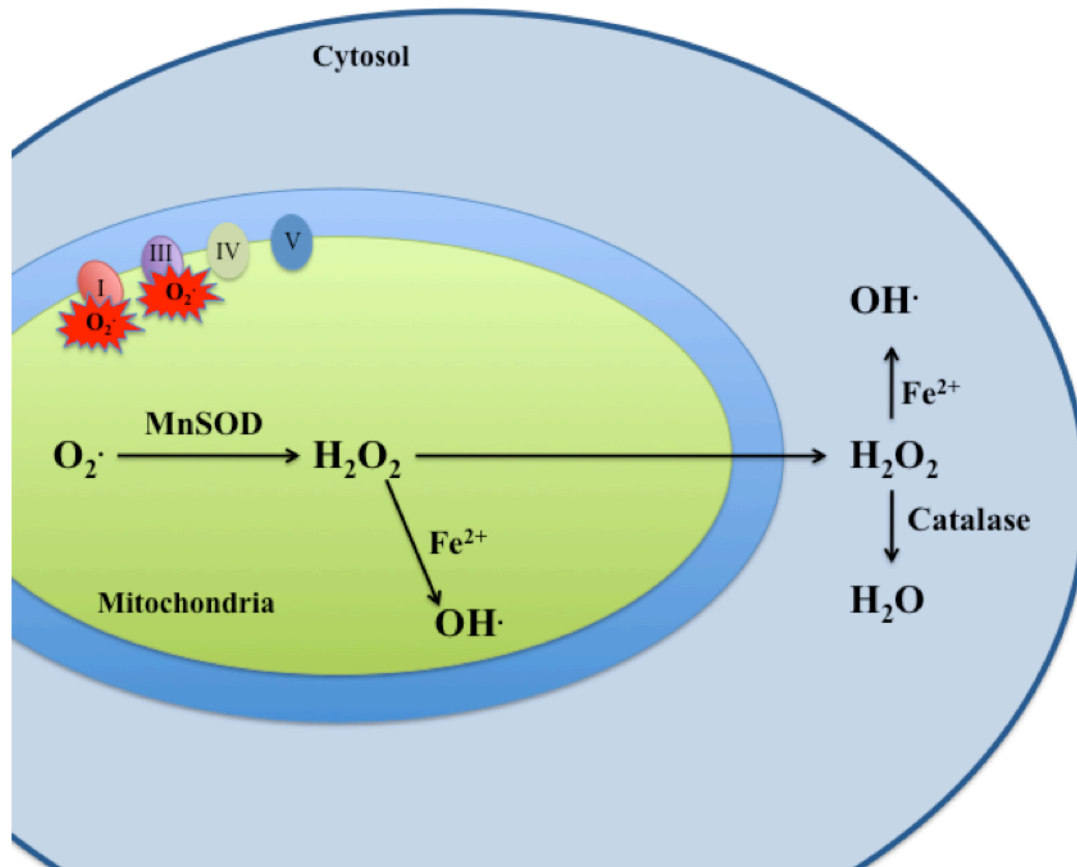


Figure 11. La production et la dégradation des radicaux libres. La mitochondrie produit d'importants niveaux d'anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) au niveau des complexes I et III. Ces anions peuvent être complètement réduits en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), par la superoxyde dismutase (MnSOD). Ensuite, le  $H_2O_2$  peut être partiellement réduit en radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), en réagissant avec certains ions métalliques. Le  $H_2O_2$  peut diffuser à travers les membranes et migrer dans le cytosol, où il peut être transformé en eau par la catalase (et la glutathione peroxydase).

orotate par la dihydro-orotate déhydrogénase (Forman et Kennedy, 1976) et l' $\alpha$ -glycérophosphate déhydrogénase (Tretter *et al.*, 2007). Plusieurs autres sites de production des ROS seront probablement découverts, sans que l'on sache toutefois s'ils ont un réel rôle en conditions physiologiques.

Il existe quelques autres sites de production de ROS à l'extérieur de la mitochondrie. La  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras produit du  $H_2O_2$ . Les peroxysomes possèdent

cependant une forte activité de la catalase, une enzyme antioxydante qui pourrait significativement limiter le largage de peroxyde du peroxyosome dans le cytosol et ainsi minimiser la contribution des peroxyosomes au stress oxydant cytoplasmique total. Les enzymes microsomaux cytochrome *P*-450, qui métabolisent des composés xénobiotiques, réduisent directement l' $O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$ . Les phagocytes, eux, attaquent les corps étrangers avec un cocktail d'oxydants et de radicaux libres. Enfin, plusieurs enzymes sont aptes à produire des oxydants dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques (Finkel et Holbrook, 2000).

### 3.2.2. Le système antioxydant

Lorsque les conditions physiologiques sont normales, on observe un équilibre entre la formation des ROS et leur élimination. Il existe un important répertoire de molécules capables de contrer les effets néfastes liés aux ROS, telles que des enzymes et des molécules de faibles poids moléculaires, dérivées, pour la plupart, de l'alimentation (fruits et légumes). Ces molécules comprennent notamment les enzymes antioxydantes (telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase), l'ascorbate et le glutathion (apte à détruire les  $OH^{\cdot}$ ), le tocophérol, les caroténoïdes et flavonoïdes, qui sont capables de détruire les radicaux lipophyliques et la machinerie cellulaire maintenant un environnement réduit telle que, par exemple, la glucose-6-phosphate qui régénère les niveaux de NADPH (Beckman et Ames, 1998; Finkel et Holbrook, 2000).

La superoxyde dismutase (SOD) est considérée comme le premier rempart contre les dommages des ROS car elle seule peut détoxifier les anions superoxyde, transformant l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  (**Figure 11**). La SOD se trouve sous deux formes dans les cellules eucaryotes; Cu/ZnSOD dans le cytoplasme et l'espace inter-membranaire mitochondrial, et MnSOD dans la matrice mitochondriale (Landis et Tower, 2005). La dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  est catalysée par des ions métalliques tels que le cuivre, le manganèse ou le fer (Balaban *et al*, 2005). Outre le cytosol et la mitochondrie, on retrouve la SOD dans les peroxyosomes (Barata *et al*, 2005).

La catalase et la glutathione peroxydase transforment, sans autre catalyseur, le  $H_2O_2$  en eau et en oxygène, achevant la cascade antioxydante (Bagnyukova *et al*, 2005; Barata *et al*, 2005). Elles préviennent donc la formation du radical hautement toxique,  $OH^{\cdot}$ . La catalase est cependant reconnue comme la principale enzyme antioxydante dans les peroxyosomes et le cytosol des cellules animales.

### 3.3. L'apoptose

Les mitochondries jouent aussi un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire. Elles contiennent plusieurs protéines pro-apoptotiques telles que le facteur inducteur d'apoptose (AIF) et Smac/Diablo. Le cytochrome *c* relargué dans le cytosol peut aussi induire l'apoptose (**Figure 12**). Ces facteurs peuvent être relâchés dans le cytosol suite à l'ouverture du pore de perméabilité transitoire (ou *permeability transition pore*). Ces pores se formeraient par l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (voir van Gurp *et al.*, 2003; Donovan et Cotter, 2004; Festjens *et al.*, 2004). Il est toutefois important de souligner que l'existence de ce pore ne fait pas l'unanimité.

La famille des protéines Bcl-2 comprend des membres anti-apoptotiques (telles que Bcl-2 et Bcl-XL) et des membres pro-apoptotiques (tels que Bad, Bax et Bid). Les protéines pro-apoptotiques peuvent donc se déplacer au niveau de la mitochondrie en situation de stress et y contrecarrer l'action des protéines anti-apoptotiques, causant le largage de facteurs apoptotiques, comme le cytochrome *c*. Lorsqu'il est dans le cytosol, celui-ci peut interagir avec la protéine Apaf-1, menant à la formation d'un apoptosome. La formation de cet apoptosome induit l'activation de la caspase 9 et de l'apoptose (voir Burlacu, 2003; Ola *et al.*, 2011).

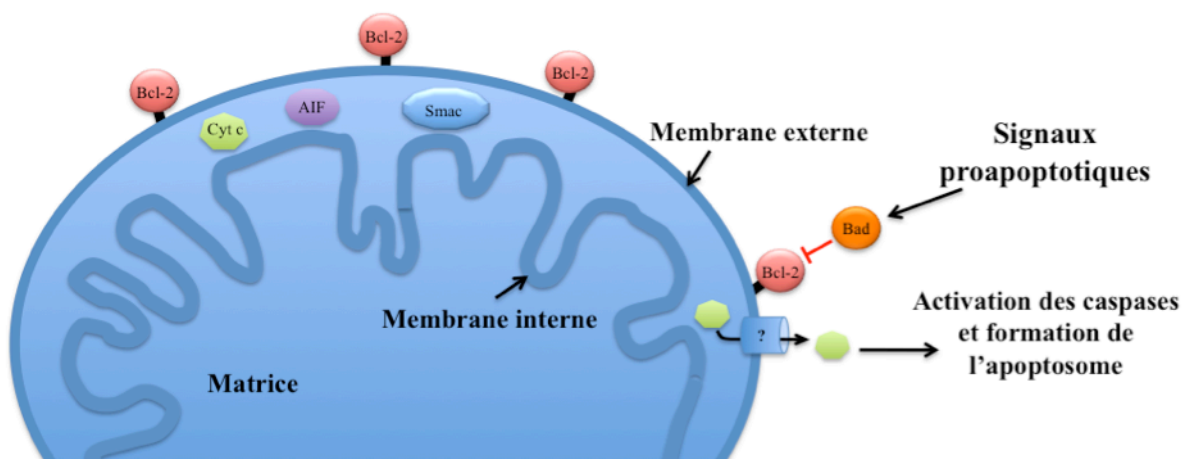


Figure 12. La mitochondrie participe à l'apoptose. Certains signaux peuvent déclencher la translocation de certaines protéines pro-apoptotiques (tel que Bad) sur la mitochondrie, contrecarrant l'action anti-apoptotique des protéines Bcl. Ces processus induisent le largage de facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Le largage du cytochrome *c* dans le cytosol induit la mort cellulaire par apoptose (voir le texte pour plus de détails).

### 3.4. Le métabolisme mitochondrial dans le cancer

Un dérèglement du métabolisme mitochondrial peut donc mener non seulement à une baisse de la production énergétique, mais aussi à une production accrue des ROS, et éventuellement à la mort cellulaire via l'apoptose. Outre les maladies mitochondriales qui sont spécifiquement dues à des défauts des OXPHOS (causés par des mutations dans les gènes nucléaires ou mitochondriaux), plusieurs autres pathologies, telles que les maladies neurodégénératives et le cancer, sont associées au dérèglement de la mitochondrie (voir Schapira, 1998; Wallace, 2001; Jacobs *et al.*, 2006).

Dès 1927, Otto Warburg suggérait que les cellules cancéreuses et les tumeurs utilisaient davantage le glucose que les cellules normales et produisaient l'ATP principalement via la glycolyse aérobie (Warburg *et al.*, 1927). Pendant longtemps, on a cru que cette augmentation de la glycolyse était due à un dysfonctionnement des mitochondries. Or, depuis quelques années, on comprend mieux les mécanismes qui peuvent mener au réarrangement métabolique observé dans les cellules cancéreuses à croissance rapide. Effectivement, ces changements ne sont pas seulement observés dans les cellules cancéreuses, mais bien dans la plupart des cellules qui possèdent d'importantes vitesses de prolifération (DeBerardinis *et al.*, 2008). De même, certaines cellules cancéreuses à croissance lente ne présentent pas le même phénotype métabolique. Plusieurs oncogènes, tels que HIF1- $\alpha$ , Myc, p53 et Ras, peuvent mener à cette réorganisation du métabolisme (voir Cuezva *et al.*, 2009). Par exemple, la stabilisation de HIF1- $\alpha$ , dans les cellules cancéreuses ou dans les cellules normales en hypoxie, stimule l'expression des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) et de plusieurs enzymes glycolytiques, telles que l'hexokinase II, phosphofructokinase, pyruvate kinase et lactate déshydrogénase (DeBerardinis *et al.*, 2008). Ces changements induisent donc une entrée plus importante de glucose dans la cellule, une production de lactate accrue, de même qu'une production d'ATP par la glycolyse beaucoup plus importante. En plus, étant donné que la phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase par la pyruvate déshydrogénase kinase inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs, la production énergétique mitochondriale s'en trouve diminuée (Papandreou *et al.*, 2006). HIF1- $\alpha$  semble aussi induire une diminution de la biogénèse mitochondriale (Hervouet *et al.*, 2008). La présence de l'hexokinase II semble aussi très importante dans l'établissement de cet effet Warburg. Cet enzyme catalyse la phosphorylation du glucose, et des hexoses en général, afin de produire du glucose-6-phosphate, constituant la première étape de la glycolyse. Il apparaît que

l'hexokinase peut se lier à la mitochondrie, via la porine et l'ANT, donnant ainsi accès à l'ATP produit par l'ATP synthase (Bustamante et Pedersen, 1977). Ce phénomène permettrait de multiplier son activité et donc d'induire un flux glycolytique beaucoup plus élevé (Bustamante et Pedersen, 1980; Bustamante *et al.*, 1981). Cette association pourrait être observée chez plusieurs types cellulaires mais il semble qu'elle soit beaucoup plus importante dans les cellules cancéreuses.

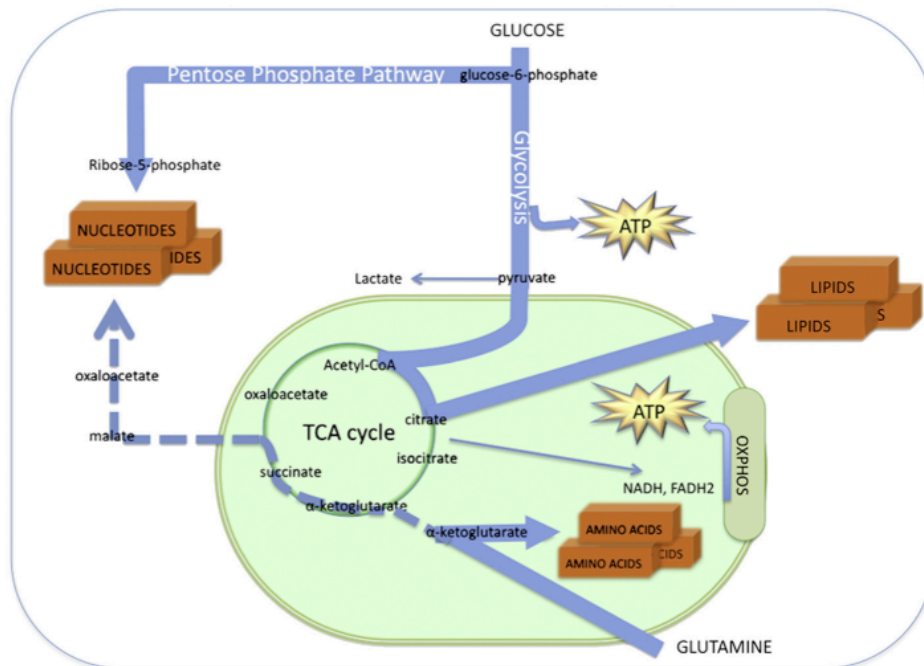


Figure 13. Les voies anaboliques dans la mitochondrie. La mitochondrie est une composante essentielle des voies de production des lipides, des acides aminés et des nucléotides. Dans les cellules cancéreuses et autres cellules prolifératives, on trouve un cycle de Krebs légèrement modifié, dont la principale fonction n'est plus de fournir les substrats du système de transport des électrons mais plutôt les intermédiaires des voies biosynthétiques. Pour plus de détails, voir le texte (Tirée de Jose *et al.*, 2011).

Ce ne sont toutefois pas toutes les cellules cancéreuses qui produisent la plus grande partie de leur énergie via la glycolyse aérobie. Plusieurs études ont montré que certains types de cellules cancéreuses pouvaient utiliser davantage les OXPHOS que la glycolyse pour produire l'ATP (Herst et Berridge, 2007). De plus, plusieurs types de cellules cancéreuses peuvent survivre et proliférer dans des milieux de culture qui sont dépourvus de glucose. Par exemple, lorsque le glucose est remplacé par du galactose, les cellules dérivent alors leur énergie de la glutaminolyse. Étant donné que le galactose ne peut être oxydé par la glycolyse, les cellules utilisent la glutamine comme substrat du cycle de Krebs, qui peut donc fournir des



électrons au STE et ainsi produire de l'ATP (Rossignol *et al.*, 2004), démontrant que les mitochondries des cellules cancéreuses ne sont pas nécessairement dysfonctionnelles.

En fait, le rôle des mitochondries semble changer dans les cellules cancéreuses : alors qu'elles sont principalement responsables de la production énergétique dans les cellules normales, elles deviennent d'importantes composantes des réactions anaboliques dans les cellules cancéreuses, permettant de soutenir les demandes élevées en biosynthèse des cellules proliférantes. La mitochondrie produit effectivement plusieurs précurseurs essentiels pour la biosynthèse des lipides, protéines et acides nucléiques, via les intermédiaires du cycle de Krebs (**Figure 13**).

Il semble qu'on trouve un cycle de Krebs différent dans ces cellules, un cycle tronqué. Par exemple, pour la synthèse des lipides, le pyruvate qui entre dans la mitochondrie est transformé en acétyl-CoA, qui forme avec l'oxaloacétate, du citrate. Ce citrate est alors exporté dans le cytosol, où il est retransformé en oxaloacétate et acétyl-CoA, ce dernier étant un précurseur important dans la synthèse des lipides. Les enzymes ATP citrate lyase et les acides gras synthétases qui transforment l'acétyl-CoA en lipides sont d'ailleurs plus importantes dans les tumeurs et les cellules prolifératives (Kuhajda *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 2004). Cet efflux de citrate et d'oxaloacétate vers le cytosol pourrait cependant causer une perte nette de ces intermédiaires dans la mitochondrie, qui pourrait donc éventuellement induire une diminution de la synthèse des lipides.

La glutaminolyse peut contrecarrer cette perte des intermédiaires du cycle de Krebs. Alors que les cellules peuvent aussi oxyder la glutamine pour produire de l'énergie (Reitzer *et al.*, 1979), elles peuvent aussi l'utiliser pour reformer les stocks d'oxaloacétate. La glutamine est transformée en glutamate dans les mitochondries, qui entre ensuite dans le cycle de Krebs sous la forme d' $\alpha$ -cétoglutarate, menant ultimement à la formation d'oxaloacétate. La consommation de glutamine est d'ailleurs plus importante dans les cellules cancéreuses que dans les cellules « normales » (Wise et Thompson, 2010). En bref, alors que dans les cellules normales le métabolisme est régulé de façon à maximiser la production d'ATP par la mitochondrie, les cellules cancéreuses semblent davantage utiliser la mitochondrie pour soutenir la biosynthèse accrue de ces cellules prolifératives (DeBerardinis *et al.*, 2008): l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie y permet la synthèse des lipides tandis que l'entrée de la glutamine y permet la synthèse des acides aminés et des nucléotides.

#### 4. Phosphorylation des protéines mitochondriales

Les mitochondries doivent évidemment répondre aux différentes exigences et demandes énergétiques des différents types de cellules dans lesquelles elles se trouvent. Le métabolisme mitochondrial se doit donc d'être finement régulé. Il existe plusieurs mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale, de la force proton-motrice et de la production de ROS. Le découplage, des changements au niveau du nombre de protons transférés par rapport au nombre d'électrons transférés et la phosphorylation des enzymes mitochondriales constituent des exemples de mécanisme de régulation des OXPHOS.

La diminution de la force proton-motrice résulte en un découplage plus ou moins important de la mitochondrie. Les acides gras et les UCP (pour *uncoupling proteins*) peuvent abaisser le  $\Delta p$ . L'ANT et UCP1 pourrait se lier et transporter hors de la mitochondrie les acides gras chargés négativement. Après l'ajout d'un proton dans le cytosol, ces acides gras neutres pourrait re-pénétrer dans la matrice mitochondriale, translocant du même coup un proton dans la mitochondrie, ce qui abaisserait la force proton-motrice (Wojtczak et Wieckowski, 1999). Les acides gras seraient aussi aptes à activer les UCP. Ces protéines participent à la thermogénèse des graisses brunes. Dans ce tissu, les mitochondries ne produisent presque pas d'ATP, grâce à la présence des UCP, qui en découplant les mitochondries, permettent la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur plutôt que sous forme d'ATP. Le radical superoxyde serait aussi capable d'augmenter le découplage via une activation de UCP1 (Echtay *et al.*, 2002).

En réponse à certains stimuli, le rapport  $H^+/e^-$  du complexe IV peut diminuer. Normalement, pour chaque électron transféré par la COX du cytochrome *c* à l' $O_2$ , il y a un proton transféré vers l'espace intermembranaire, donc un rapport  $H^+/e^-$  de un (Babcock et Wikstrom, 1992; Ferguson-Miller et Babcock, 1996). Plusieurs conditions peuvent toutefois abaisser ce rapport : des modifications chimiques des sous-unités I, II et III (Prochaska et Fink, 1987; Murphy, 1989), certaines mutations de la sous-unité I (Pfitzner *et al.*, 1998) et d'importants  $\Delta p$  (Capitanio *et al.*, 1991). Ce découplage intrinsèque des pompes à protons (ou *slippage* des rapports  $H^+/e^-$ ) pourraient donc constituer un régulateur important de la production des ROS en prévenant une production trop importante lorsque le potentiel de membrane mitochondrial serait très élevé (Papa *et al.*, 1997). Bien que ce *slippage* soit bien connu pour la COX, il n'a pas encore été observé pour les complexes I et III.

La phosphorylation et déphosphorylation des protéines constituent des mécanismes de régulation très répandus dans les cellules eucaryotes. Les protéines mitochondriales ne constituent pas une exception car on y trouve des centaines de sites de phosphorylation (Miller *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2010). Les phosphorylations et déphosphorylations peuvent moduler les fonctions protéiques de différentes façons; en modulant l'activité enzymatique, en les marquant pour leur destruction, en régulant leur localisation intracellulaire ou en modifiant les interactions entre protéines. La phosphorylation d'une protéine est une modification post-traductionnelle catalysée par une kinase qui transfère un groupement phosphate, provenant essentiellement de l'hydrolyse de l'ATP, sur un résidu sérine (Ser), thréonine (Thr), tyrosine (Y), lysine ou histidine:



Le processus inverse, la déphosphorylation, est réalisé par l'entremise d'une phosphatase (**Figure 14**). Les kinases et phosphatases sont habituellement classées selon le résidu qu'elles modifient; il existe des sérine-thréonine-kinases et -phosphatases, des tyrosine-kinases et -phosphatases ainsi que des phosphatases pouvant déphosphoryler les trois types de résidus.

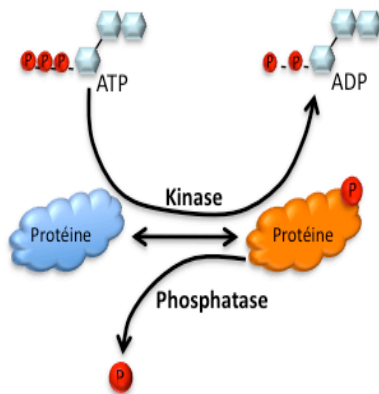


Figure 14. Les processus de phosphorylation. Les kinases ajoutent un groupement phosphate aux protéines, via l'hydrolyse de l'ATP. Les phosphatases déphosphorylent, donc enlèvent les groupements phosphate de leur substrats.

On sait depuis longtemps que les phosphorylations jouent un rôle majeur dans la régulation du métabolisme mitochondrial. Par exemple, la pyruvate déshydrogénase est inhibée par la pyruvate déshydrogénase kinase et activée par la pyruvate déshydrogénase phosphatase (Linn *et al.*, 1969). Dans les mitochondries, on trouve principalement des protéines kinases A (PKA), des MAP kinases (pour *mitogen activated protein*) ainsi que des tyrosines kinases.

## 4.1. Les kinases dans la mitochondrie

### 4.1.1. Les protéines kinases A

Les PKA font partie de la voie sérine/thréonine. Elles sont activées par différents récepteurs hormonaux tels que les récepteurs couplés à des protéines G. En fait, l'activation de ces récepteurs active une protéine G, qui, à son tour, active l'adénylate cyclase. Cette dernière produit l'adénosine 3'5'- monophosphate (AMPc) à partir de l'ATP. Cet AMPc va ensuite se fixer aux sous-unités régulatrices de la PKA. Cette fixation permet la libération des sous-unités catalytiques (**Figure 15**), permettant la phosphorylation des substrats de la PKA (Gerits *et al.*, 2008). Il existe des protéines d'ancrage des PKA (les AKAP) qui assurent la localisation de ces kinases près de leurs substrats (Felicciello *et al.*, 2001). Les PKA peuvent être localisées à la membrane externe de la mitochondrie par l'entremise de AKAP84 et AKAP121 (Chen *et al.*, 1997; Cardone *et al.*, 2004). Elles peuvent aussi être localisées à l'intérieur de la mitochondrie (dans la membrane interne et la matrice) via AKAP121 (Technikova-Dobrova *et al.*, 2001; Sardanelli *et al.*, 2006).

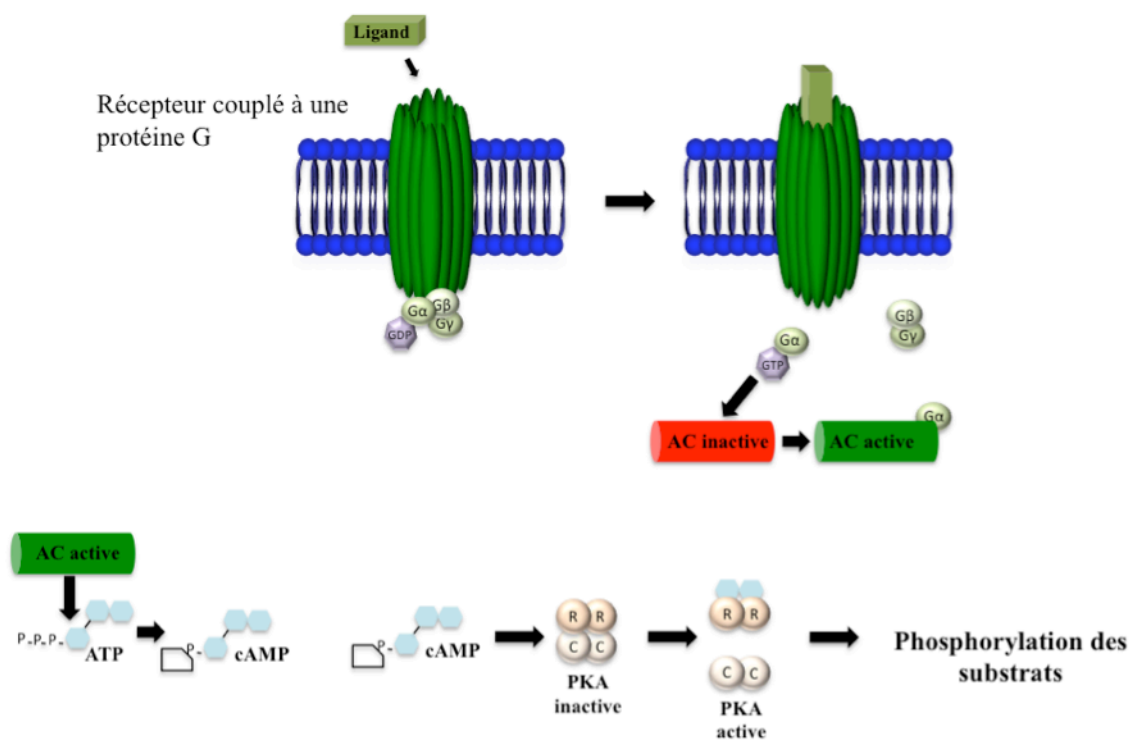


Figure 15. L'activation de la PKA. L'activation d'un récepteur couplé à une protéine G entraîne l'activation des adénylates cyclases (AC). Celles-ci produisent l'AMPc à partir de l'ATP. Lorsque l'AMPc est présent en grandes quantités, il peut induire l'activation des PKA en se liant à ses sous-unités régulatrices, ce qui libère les sous-unités catalytiques des PKA.

Les PKA possèdent de nombreuses fonctions dans la mitochondrie. Par exemple, des PKA, attachées à la membrane externe des mitochondries par D-AKAP1, peuvent minimiser les processus apoptotiques en phosphorylant la protéine pro-apoptotique Bad (Harada *et al.*, 1999). Elles accélèrent aussi le transport du cholestérol dans la mitochondrie, une étape limitante de la stéroïdogénèse (Dyson *et al.*, 2008). L'activité de Drp1, une protéine qui participe à la fission mitochondriale, est aussi diminuée lorsque phosphorylée par les PKA (Chang et Blackstone, 2007). Récemment, l'existence d'une voie adénylate cyclase-AMPC-PKA a été démontrée dans la mitochondrie (Acin-Perez *et al.*, 2009). Effectivement, l'AMPC y serait produit suite à l'activation de l'adénylate cyclase par la formation du dioxyde de carbone (via le cycle de Krebs). Cet AMPC active donc les PKA mitochondriales, pouvant phosphoryler les complexes de l'OXPPOS et ainsi réguler la production d'ATP, bien que les cibles spécifiques de cette voie n'ait pas encore été clairement identifiées.

#### 4.1.2. Les MAP-kinases

Ces kinases font aussi partie de la voie sérine/thréonine. Elles comprennent trois sous groupes de kinases; les ERK (pour *extracellular signal regulated kinases*), les p38 MAP-kinases ainsi que les JNK (pour *c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinases*) (Zhang et Dong, 2007). Ces kinases fonctionnent sensiblement de la même façon. Elles sont organisées en module et les différentes kinases sont activées par une double phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosines, séparés par un seul acide aminé (Zhang et Dong, 2007) : une MAP-kinase-kinase-kinase (MAP3K) active une MAP-kinase kinase (MAP2K) qui active à son tour une MAP-kinase. Il semblerait que certaines MAP-kinases influencent la stéroïdogénèse (Poderoso *et al.*, 2008) et les processus apoptotiques (Arciuch *et al.*, 2009).

#### 4.1.3. Les tyrosine-kinases

Après avoir été sous-estimées pendant de nombreuses années, les phosphorylations sur tyrosines apparaissent de plus en plus comme un mode de régulation important de la physiologie mitochondriale.

Ces kinases existent sous deux formes; les récepteurs tyrosine-kinases transmembranaires (RTK pour *receptor tyrosine kinase*) ainsi que sous forme d'enzymes solubles (NRTK pour *non receptor tyrosine kinase*). Généralement, l'activation des RPTK requiert la liaison d'un ligand, une hormone ou un facteur de croissance, à un site spécifique du domaine extracellulaire de la kinase. S'ensuit alors une dimérisation qui conduit à

l'autophosphorylation de certains résidus tyrosine des domaines cytoplasmiques de la kinase. Certains récepteurs ne possédant pas d'activité kinase peuvent être phosphorylés par des NRPTK sur leurs résidus tyrosine et déclencher les mêmes processus cellulaires que chez les RPTK (van der Geer *et al.*, 1994).

Plusieurs tyrosine-kinases ont été observées dans la mitochondrie, notamment la tyrosine-kinase soluble Abl, qui semble être dirigée vers la mitochondrie en réponse à un stress oxydant élevé (Kumar *et al.*, 2001) et EGFR qui se lie à la sous-unité II de la cytochrome *c* oxydase, après avoir été phosphorylée par une autre tyrosine-kinase, la c-Src kinase (Boerner *et al.*, 2004). D'ailleurs, plusieurs membres de la famille des Src kinases, notamment c-Src (Miyazaki *et al.*, 2003), Lyn (Salvi *et al.*, 2002), Fyn, Fgr et Csk (Tibaldi *et al.*, 2008), ont été observés dans les mitochondries de différents tissus. Ces kinases sont d'ailleurs les tyrosine-kinases les plus actives dans les mitochondries de cerveau chez le rat (Tibaldi *et al.*, 2008).

#### **4.1.3.1. La Src kinase**

La famille des Src kinases compte plusieurs membres chez l'humain; Blk, Brk, Fgr, Frk, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Srm et Yes (Roskoski, 2004). On retrouve la Src (ou c-Src) dans l'ensemble des tissus humains où elle joue d'importants rôles dans les processus de différenciation, prolifération et survie cellulaire (Brown et Cooper, 1996). Par exemple, la stimulation du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR), qui induit la prolifération cellulaire, provoque l'activation de la Src, qui permet à son tour de maintenir et d'amplifier les signaux de EGFR. La Src est aussi impliquée dans l'adhésion, la motilité et la morphologie cellulaire. Les Src kinases sont contrôlées par les récepteurs à tyrosine-kinases, les intégrines, les protéines G, les cytokines et les hormones stéroïdes (Thomas et Brugge, 1997).

La Src kinase est aussi un des premiers oncogènes à avoir été étudié. En fait, la Src (d'ailleurs, Src vient de sarcome) a été tout d'abord identifiée comme la forme cellulaire de v-Src, un puissant oncogène produit par le virus Rous sarcoma (Ishizawa et Parsons, 2004). Cependant, à l'inverse de v-Src, la Src est faiblement oncogénique (voir plus bas). Une surexpression, voire une dérégulation de la Src conduisant à une augmentation de son activité, est néanmoins observée dans plusieurs types de cancers (Yeatman, 2004).

#### 4.1.3.1.1. Structure et régulation de la Src kinase

Les membres de la famille des Src kinases possèdent une structure similaire, sous forme d'enzymes solubles (**Figure 16**). De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on trouve (i) un groupement myristoylé attaché au domaine SH4, un domaine unique et spécifique à chaque membre de la famille des Src kinases, (ii) un domaine SH3, (iii) le domaine SH2, (iv) un *linker* entre ce domaine et le domaine suivant, (v) le domaine kinase (SH1) et (vi) un segment dit régulateur en C-terminal (Boggon et Eck, 2004; Roskoski, 2004).

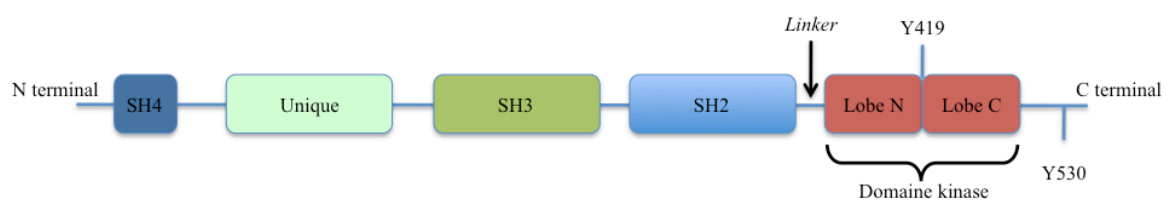


Fig. 16. La structure des Src kinases. Les différents membres de la famille des Src kinases possèdent une structure similaire. Seule le domaine unique varie entre Blk, Brk, Fgr, Frk, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Srm et Yes. Voir le texte pour plus de détails.

La myristoylation de l'extrémité N-terminale facilite l'attachement des Src kinases aux membranes et semble essentielle à leur activation. Le domaine SH3 reconnaît et peut se lier aux motifs riches en proline présents dans les protéines adaptatrices ou les substrats des Src. Le domaine SH2 reconnaît et se lie aux groupements phosphorylés sur tyrosine. Le domaine kinase est constitué de deux lobes (C et N) entourant le site catalytique. Ce site contient un résidu tyrosine très important quant à la régulation de l'activité, le résidu tyrosine 419 (Y419-Src). En position C-terminale, on trouve un autre résidu très important dans la régulation de l'état des Src kinases : le résidu tyrosine 530 (Y530-Src) (Boggon et Eck, 2004).

L'activité de la Src est principalement régulée grâce aux réactions de phosphorylation et déphosphorylation de ces deux résidus tyrosines (Roskoski, 2004; Roskoski, 2005). Premièrement, la phosphorylation (par Csk ou Chk) du résidu Y530-Src, aussi appelé le résidu inhibiteur, permet la liaison de ce résidu avec le domaine SH2, induisant la fermeture de la kinase dans une conformation inactive. Dans cette position, le *linker* se lie au domaine SH3, ce qui augmente la stabilité de la conformation inactive en masquant davantage le site actif (**Figure 17**). La déphosphorylation de ce résidu permet l'ouverture de la kinase,

l'autophosphorylation du résidu Y419-Src (aussi nommé résidu activateur) et l'activation de la kinase. En conditions basales, plus de 90% des molécules de Src serait phosphorylées au niveau du Y530 et inactives (Zheng *et al.*, 2000). Ce résidu inhibiteur n'est pas présent dans la forme virale de la Src expliquant l'activité et l'oncogénicité importante de v-Src.

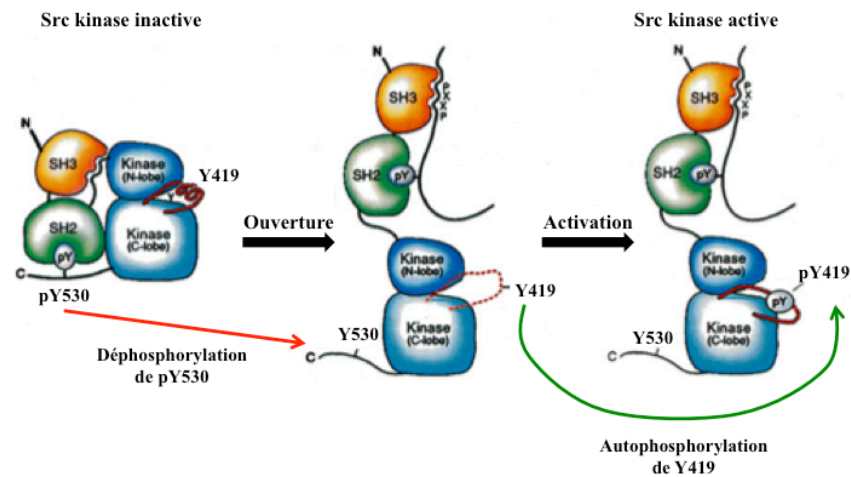
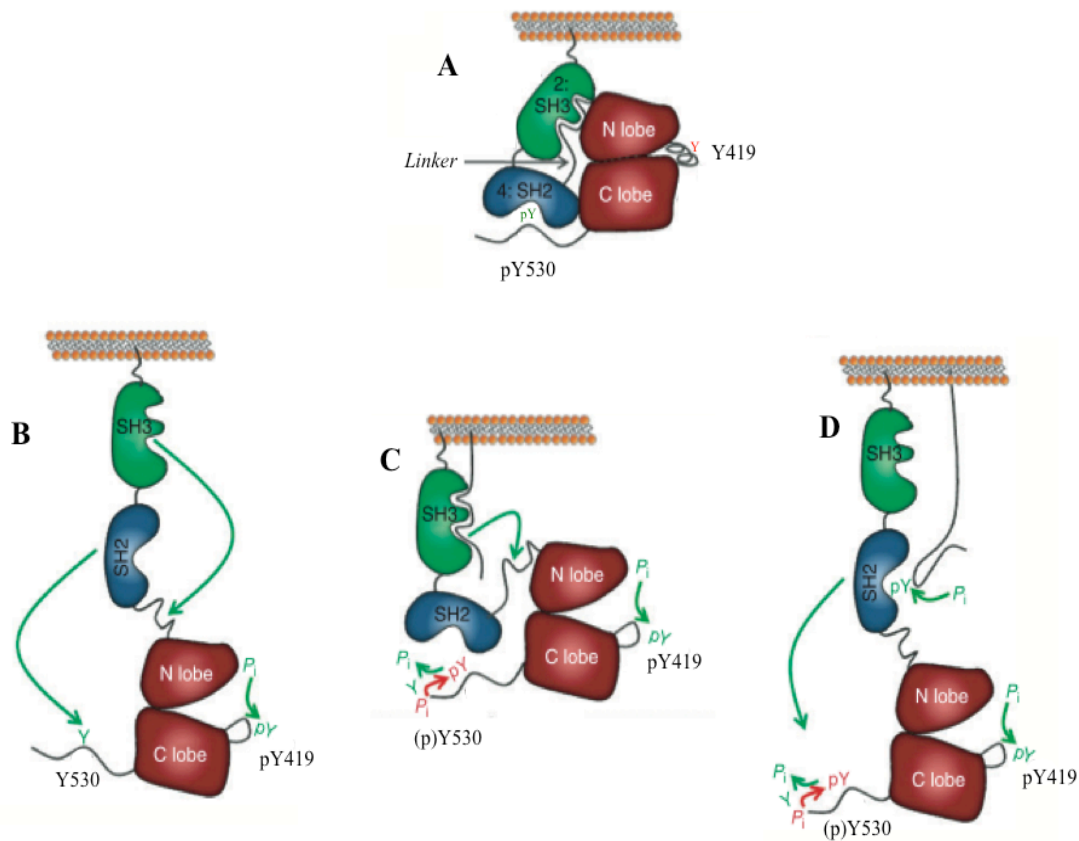


Fig. 17. L'activation de la Src est régulé par les processus de phosphorylation et déphosphorylation. La déphosphorylation du résidu phosphorylé Y530 (pY530) permet l'ouverture de la kinase et ensuite, l'activation via la phosphorylation du résidu Y419 (Modifiée de Roskoski, 2005).

La déphosphorylation du résidu inhibiteur constitue donc un important mécanisme régulateur de l'activité des Src kinases. Plusieurs tyrosine-phosphatases, notamment la tyrosine-phosphatase enrichie en proline (PEP), les tyrosine-phosphatases contenant le domaine SH2 (SHP-1 et SHP-2), la tyrosine-phosphatase des T-cell (TCPTP), CD45 et les tyrosine-phosphatases 1B et 1D (PTP1B et PTP1D) peuvent déphosphoryler le pY530-Src (Brown et Cooper, 1996; Ingley, 2008; Newman, 2009). Parmi celles-ci, seules SHP-2 (Salvi *et al.*, 2004), PTP1B (Augereau *et al.*, 2005; Arachiche *et al.*, 2008) et PTP1D (Cardone *et al.*, 2004) ont été observées dans les mitochondries. Alors que PTP1B déphosphoryle directement le résidu pY530-Src (Neet et Hunter, 1996; Roskoski, 2005), SHP-2 agit de manière indirecte. En fait, SHP-2 déphosphoryle Cbp (pour *Csk binding protein*), ce qui induit la dissociation de Csk (responsable de la phosphorylation du résidu Y530-Src) et de Cbp. Ainsi, Csk ne peut plus phosphoryler et inhiber la Src. On en connaît beaucoup moins sur les acteurs pouvant déphosphoryler le résidu activateur. En fait, une seule phosphatase, apte à jouer ce rôle, a été identifiée à ce jour : la PTP-BL (Palmer *et al.*, 2002). D'un autre côté, la déphosphorylation du résidu activateur pourrait jouer un rôle mineur étant donné que



les Src actives semblent être rapidement dégradées par le protéasome (Harris *et al.*, 1999). Si les mécanismes de régulation de l'activité de la Src kinase sont bien connus dans le cytosol, on ne sait toujours pas si ces mêmes mécanismes sont présents dans les mitochondries.



**Fig. 18. Les différentes conformations des Src actives et inactives.** (A) Les Src inactives possèdent généralement toute la même conformation fermée: un résidu pY530 phosphorylé, lié au domaine SH2, un *linker* lié au domaine SH3, un site catalytique fermé empêchant la phosphorylation du résidu activateur. Les Src actives peuvent cependant être présentes sous différentes conformations. (B) Certaines sont complètement ouvertes : un résidu inhibiteur déphosphorylé, un *linker* libre du domaine SH3 et un site catalytique ouvert. Des substrats à forte affinité pour le domaine SH3 (C) ou SH2 (D) peuvent aussi induire un relâchement de la conformation fermée et une activation de la Src, peu importe l'état de phosphorylation du résidu inhibiteur (Modifiée de Newman, 2009).

Certains autres sites de phosphorylation semblent aussi importants dans la régulation de l'activité de la Src. Par exemple, PDGF (pour *platelet-derived growth factor*) induit la phosphorylation du résidu Y213-Src, situé dans le domaine SH2, ce qui amène une augmentation de l'activité de la Src par rapport à celle qui est seulement phosphorylée au niveau du Y419-Src (Stover *et al.*, 1996). De plus, lorsque Y213-Src est phosphorylé, la réduction de l'activité causée par la phosphorylation du résidu inhibiteur Y530-Src est moins

importante. Il apparaît donc que l'inhibition de la Src par la phosphorylation du résidu inhibiteur Y530-Src peut être contournée par plusieurs événements (voir plus bas).

La structure des Src kinases inactives est toujours semblable (**Figure 18A**): (i) le domaine SH3 est lié au *linker*, (ii) le domaine SH2 est lié et « occupé » par le résidu Y530-Src phosphorylé (pY530-Src), (iii) le domaine SH3 et le *linker* sont en contacts avec certains résidus du lobe N du domaine kinase, et enfin, (iv) le domaine SH2 interagit avec le lobe C du domaine kinase (Newman, 2009). A l'inverse, la structure des Src actives peut varier. Tout d'abord, les Src pleinement « ouvertes » et actives sont caractérisées par (i) le relâchement des interactions intramoléculaires entre le domaine SH3 et SH2, (ii) la présence du résidu Y419-Src phosphorylé (pY419-Src) dans le site catalytique du domaine kinase et (iii) la présence du résidu Y530-Src non-phosphorylé (**Figure 18B**). Cependant, les Src ne doivent pas nécessairement être complètement ouvertes pour être activées. Par exemple, la dissociation du domaine SH3 et du *linker* peut être suffisante pour activer la Src (**Figure 18C**). Cette dissociation pourrait être causée par des agents pharmacologiques ou des mutations au niveau du domaine SH3, du *linker* ou du domaine kinase (Brown et Cooper, 1996; Ingley, 2008). De plus, comme les interactions entre le *linker* et le domaine SH3 sont de faibles affinités, plusieurs substrats (riches en proline) possédant de grandes affinités pour le domaine SH3 peuvent dissocier ce domaine et le *linker* et induire l'activation des Src kinases. Sous cette forme active, les Src kinases peuvent tout de même conserver les interactions intramoléculaires entre le pY530-Src et le domaine SH2. De la même façon, des substrats dont l'affinité serait très forte pour le domaine SH2 peuvent induire la dissociation du résidu pY530-Src et du domaine SH2, activant la Src (**Figure 18D**). Cette dernière interaction ne doit donc pas nécessairement être relâchée pour assurer l'activation des Src kinases (Lerner et Smithgall, 2002). Enfin, le résidu inhibiteur ne doit pas nécessairement être déphosphorylé pour assurer l'activation des Src kinases (Nika *et al.*, 2007).

La Src peut aussi être activée par les ROS. Certains résultats suggèrent que l'oxydation des résidus cystéine (Cys) 245 et 487, respectivement situés dans le domaine SH2 et le domaine kinase, induit une sur-activation de la Src kinase (Giannoni *et al.*, 2005). Cette oxydation provoquerait la formation d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéines, induisant une conformation ouverte et active. En fait, plusieurs études ont démontré que des oxydants ou des conditions propices au stress oxydant augmentent l'activité de la Src. Notamment, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tout comme les ROS produits par irradiation, induisent une augmentation des niveaux de pY419-Src et de l'activité de la Src kinase (Krasnowska *et al.*,

2008; Zhang *et al.*, 2008). Enfin, l'antioxydant N-acetylcystéine (NAC) produit l'effet inverse en diminuant l'activité de la Src (Krasnowska *et al.*, 2008). Cette régulation de la Src par les ROS semble être impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que la survie cellulaire et l'anoïkis (apoptose induite par le détachement des cellules à la matrice extracellulaire), la progression des tumeurs ou l'hypoxie (Giannoni *et al.*, 2005). Bien que la mitochondrie soit un des principaux producteurs de ROS, on connaît peu de choses par rapport à l'activation de la Src vis-à-vis des ROS mitochondriaux. Certains travaux ont cependant démontré que les ROS mitochondriaux induits en conditions hypoxiques permettent l'activation de la Src et, subséquemment, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (pour *hypoxia-induced factor*) et la survie cellulaire (Lluis *et al.*, 2007). La Src mitochondriale semble aussi être activée par les ROS (Buchner *et al.*, 2010).

#### 4.1.3.1.2. La Src kinase dans la mitochondrie

Certains membres de la famille Src kinase sont effectivement présents dans la mitochondrie. En fait, la Src semble être présente dans les mitochondries de plusieurs tissus alors que plusieurs membres des Src kinases (*ie*, Fyn, Lyn, Src et Csk) ont été simultanément observés dans les mitochondries de cerveau de rat (Salvi *et al.*, 2002; Tibaldi *et al.*, 2008). Il semblerait d'ailleurs que les Src kinases y soient les principales responsables des phosphorylations sur résidus tyrosine. Toutefois, peu d'études se sont penchées sur les possibles impacts fonctionnels de l'activité des Src kinases dans les mitochondries. On sait cependant que la Src phosphoryle la sous-unité II de la cytochrome *c* oxydase dans les ostéoclastes (Miyazaki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). Cette phosphorylation induit une augmentation de l'activité enzymatique de ce complexe et de la respiration mitochondriale. Il semblerait donc que cette augmentation d'activité permet aux ostéoclastes de maintenir la résorption osseuse, une activité qui serait hautement énergivore. Certains modèles murins déficients en Src souffrent d'ailleurs d'ostéoporose (Martin, 2001).

On connaît toujours très peu les mécanismes d'importation de la Src kinase (voire des Src kinases) dans les mitochondries. Dans le cerveau du rat et dans les ostéoclastes, certains ont proposé que ces kinases résident de façon permanente dans les mitochondries (Salvi *et al.*, 2002; Salvi *et al.*, 2005). Elle pourrait y être importée par le système d'importation des protéines usuels, soit le complexe formé par les TIM et TOM. Cependant, plusieurs considèrent qu'on devrait arrêter de prendre en compte la localisation des kinases comme un événement ponctuel et statique mais plutôt comme des événements dynamiques où l'on

observerait constamment des mouvements vers et hors de la mitochondrie, sous l'impulsion de stimuli précis. Ainsi, il semble que dans plusieurs lignées cellulaires, où EGFR (*Epidermal Growth factor Receptor*) et la Src sont surexprimés et activés, cette dernière est importée massivement, mais temporairement, dans la mitochondrie (Boerner *et al.*, 2004; Demory *et al.*, 2009). Effectivement, on observe une présence maximale des deux molécules dans la mitochondrie 20 minutes après la stimulation par EGF et une diminution ultérieure de leur niveau. Enfin, à l'intérieur de ces mitochondries, la Src et/ou EGFR induisent la phosphorylation de la sous-unité II de la COX ainsi qu'une diminution temporaire de l'activité de la COX et des niveaux d'ATP cellulaire.

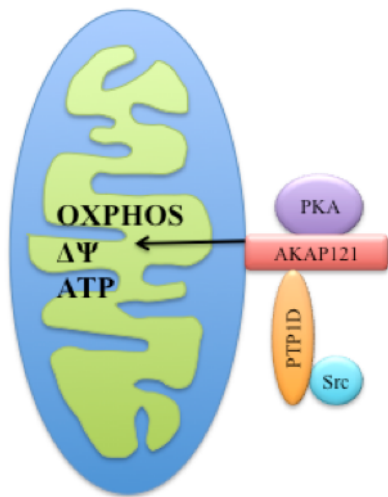


Figure 19. La translocation des kinases vers la mitochondrie. La protéine d'ancrage des PKA, AKAP121, peut translocer simultanément sur la membrane externe de la mitochondrie, les PKA, la Src et PTP1D. PTP1D peut réguler l'activité de la Src par déphosphorylation de son résidu inhibiteur. La translocation de ce complexe induit des augmentations du potentiel de membrane mitochondrial et de la production d'ATP. Le complexe AKAP121-PKA-Src-PTP1D apparaît donc comme une voie de régulation des OXPHOS importantes.

Etant donné que les Src kinases ne possèdent pas de séquence de ciblage à la mitochondrie (Itoh *et al.*, 2005), ces kinases pourraient nécessiter des protéines d'ancrage ou de transport afin de permettre leur acheminement vers la mitochondrie. Certaines protéines d'ancrage des PKA aux mitochondries, notamment AKAP84 et AKAP121, semblent jouer un rôle important dans l'acheminement des signaux cytosoliques vers la mitochondrie via la Src. En fait, AKAP121, en liant et la Src, la tyrosine-phosphatase PTPD1 ainsi que la PKA, (Cardone *et al.*, 2004), permettrait donc de localiser le complexe Src-PTPD1-PKA aux mitochondries et ainsi de relayer les voies de signalisation impliquant l'AMPc et les PKA, à l'aide de la Src, du cytosol aux mitochondries. Suite à l'importation de la Src et des PKA, plusieurs protéines mitochondriales sont davantage phosphorylées par la Src. Dans ces conditions, on observe une augmentation du potentiel de membrane, des niveaux d'ATP, de l'activité de la COX et de l'expression de certaines protéines du STE (Livigni *et al.*, 2006; Carlucci *et al.*, 2008). Enfin, la protéolyse de cette protéine d'ancrage induit rapidement une diminution générale des capacités mitochondriales (Carlucci *et al.*, 2008). Il semble donc que

certaines cellules utilisent la Src pour réguler le métabolisme mitochondrial en contrôlant les niveaux de AKAP121 (**Figure 19**).

La protéine Dok-4 (*Downstream of kinase*) semble aussi jouer un rôle important dans l'importation de la Src dans la mitochondrie des cellules endothéliales (Itoh *et al.*, 2005). Dans ces cellules, la présence de Dok-4 dans les mitochondries est nécessaire à la localisation intramitochondriale de la Src. Ce recrutement de la Src y est accompagné d'une baisse de l'expression de certaines sous-unités du complexe I et d'une modification de la production des ROS.

#### 4.1.3.1.3. La Src dans la régulation de la glycolyse

La Src constitue aussi un régulateur important du métabolisme glycolytique. Les premières études sur le sujet ont montré que des cellules transfectées avec la forme virale de la Src (donc hyperactive) possèdent des « activités » glycolytiques plus élevées (Bosca *et al.*, 1986; Marchand *et al.*, 1992). D'autres études ont montré que certaines enzymes glycolytiques, telles que la lactate déshydrogénase, l'énolase et la pyruvate kinase de type M2 sont ciblées par la Src (Simon *et al.*, 1989; Engen *et al.*, 2008). La Src semble aussi impliquée dans le processus de survie cellulaire en conditions hypoxiques. L'hypoxie entraîne une augmentation des ROS mitochondriaux, ce qui induit l'activation de la Src, et subséquemment, la stabilisation de HIF1- $\alpha$  (Sato *et al.*, 2005). Cette activation de la Src permet donc de contrecarrer le dysfonctionnement des OXPHOS en augmentant la production énergétique glycolytique. L'activation de la Src kinase peut aussi induire la stabilisation de HIF1- $\alpha$  en conditions normoxiques, augmentant ainsi la production de lactate et le métabolisme glycolytique (Karni *et al.*, 2002). Les résultats de ces quelques études suggèrent donc que l'activation de la Src kinase entraîne une augmentation du métabolisme glycolytique. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur un possible effet de la Src sur le métabolisme mitochondrial dans ces conditions.

## 4.2. La phosphorylation des protéines participant aux OXPHOS

Les premières tentatives d'établir le phosphoprotéome mitochondrial, tant au niveau des résidus sérine et thréonine (Lee *et al.*, 2007) qu'au niveau des résidus tyrosine (Distler *et al.*, 2007; Villen *et al.*, 2007; Lewandrowski *et al.*, 2008) sont récentes. Bien que plusieurs autres

protéines mitochondriales soient phosphorylées, nous nous pencherons davantage sur les protéines jouant un rôle dans la respiration mitochondriale et les OXPHOS.

Dans la mitochondrie, parmi les voies de signallement ciblant les composants des OXPHOS, on connaît beaucoup mieux celles qui sont dépendantes de l'AMPc. La plus grande part des effets observés suite à une augmentation des concentrations d'AMPc est due à des réactions de phosphorylations catalysées majoritairement par les PKA.

#### 4.2.1. Le complexe I

La phosphorylation (dépendante de l'AMPc) d'une sous-unité de 18 kDa du complexe I (ADQD ou NDUFS4), chez des mitochondries de cœur de bœuf, induit une activation des capacités catalytiques de ce complexe (Papa *et al.*, 1996). Plus tard, un autre laboratoire a observé la phosphorylation du résidu Ser20 de la sous-unité NDUFB11 et du résidu Ser55 de la sous-unité NDUFA1 dans les mêmes conditions (Chen *et al.*, 2004). Ces phosphorylations semblent aussi induire une diminution de la production de ROS par le complexe I (Bellomo *et al.*, 2006). Certaines mutations de NDUFS4 présentes chez des patients (souffrant notamment du syndrome de Leigh) abolissent le site de phosphorylation et l'activation subséquente du complexe I par l'AMPc (Papa *et al.*, 2001; Petruzzella *et al.*, 2001). En utilisant différentes méthodes couplées (ou non) à la spectrométrie de masse, plusieurs autres sites de phosphorylations ont été notés dans les différentes sous-unités du complexe I; la sous-unité de 42 kDa (Ser59), la sous-unité B14,5 (Ser95), la protéine Fe-S de 75 kDa, la flavoprotéine 1, la sous-unité de 39 kDa du sous complexe 1 $\alpha$ , la sous-unité de 22 kDa du sous complexe 1 $\beta$  et les sous-unités de 15, 23 et 24 kDa (Huttemann *et al.*, 2007). Cependant, les résidus phosphorylés ainsi que les conséquences fonctionnelles de ces phosphorylations restent, pour la majorité de ces sites, à identifier.

#### 4.2.2. Le complexe II

Le précurseur de la sous-unité contenant la flavoprotéine et la sous-unité B, contenant le centre Fer-Soufre semblent être phosphorylés dans les mitochondries de cœur chez le porc (Hopper *et al.*, 2006). Chez la pomme de terre, la sous-unité A est aussi phosphorylée (Bykova *et al.*, 2003). Cependant, la technique utilisée dans ces deux études (marquage des protéines par radioactivité ou avec la sonde *Pro-Q-diamond*) ne permet pas d'identifier la nature des résidus phosphorylés. De plus, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour connaître les impacts de ces phosphorylations sur les OXPHOS.

#### 4.2.3. Le complexe III

Chez la pomme de terre, le précurseur de la protéine I, la protéine de cœur II, le précurseur de la protéine de Rieske et le site de liaison avec l'ubiquinone semblent tous phosphorylés (Bykova *et al.*, 2003). Malheureusement, les acides aminés phosphorylés, les voies de signallement impliquées et les impacts de ces phosphorylations restent inconnus.

#### 4.2.4. Le cytochrome *c*

La phosphorylation du cytochrome *c* au niveau des résidus Y97 et Y48 inhibe la respiration mitochondriale (Lee *et al.*, 2006). Bien que cet acide aminé ne participe pas directement à la liaison du cytochrome *c* avec le complexe IV, il semble que sa phosphorylation induise un changement de conformation de la molécule suffisant pour inhiber la respiration mitochondriale. La phosphorylation du cytochrome *c* au niveau du résidu Y48 induit une diminution de son habilité à se lier à la cardiolipine. Le cyt *c* peut peroxyder la cardiolipine, un lipide de la membrane interne, permettant donc la dissociation du cytochrome *c* de la membrane interne, et sa libération dans les premiers stades de l'apoptose (Kagan *et al.*, 2005). La phosphorylation du résidu Y48 du cyt *c* a donc un impact majeur sur les processus apoptotiques car la diminution de sa capacité à se lier à la cardiolipine diminue aussi son habilité à induire l'apoptose via la caspase 3 (Pecina *et al.*, 2010).

#### 4.2.5. Le complexe IV

Le complexe IV semble être le complexe du système de transport des électrons pour lequel on connaît le mieux les mécanismes de régulation par phosphorylation. Il semble aujourd'hui évident que les voies dépendantes de l'AMPc conduisent à la phosphorylation du complexe IV, induisant une inhibition de son activité. Il semblerait que la présence de ces résidus phosphorylés soit essentielle pour permettre la fixation de l'ATP sur le complexe IV, qui induit une diminution de son activité (voir plus haut). Le groupe de B. Kadenbach, après avoir traité une cytochrome *c* oxydase purifiée et isolée avec de l'AMPc et de la PKA, a identifié les sous-unités I, II, III et Vb comme phosphorylées (Bender et Kadenbach, 2000). Ces phosphorylations induisent effectivement une diminution des capacités catalytiques du complexe IV. Le laboratoire de Avadhania a aussi observé la phosphorylation des sous-unités I (Ser115 et Ser116), IV (Thr52) et Vb (Ser40) après une ischémie dans des mitochondries de cœur de lapin, probablement dépendante de la PKA parce que ces sites n'étaient plus phosphorylés après l'ajout d'un inhibiteur de cette kinase (Prabu *et al.*, 2006). Les voies

dépendantes de l'AMPc peuvent aussi conduire à la phosphorylation de certaines sous-unités du complexe IV sur des tyrosines. Ainsi, après avoir induit de hauts niveaux d'AMPc en utilisant un inhibiteur de la phosphodiesterase (une enzyme qui transforme l'AMPc en ATP), on a observé que les sous-unités I, II, III et IV de ce complexe possédaient un groupement phosphate sur une tyrosine, causant une inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase (Lee *et al.*, 2005). Cependant, les sous-unités II, III et IV semblaient déjà phosphorylées en conditions basales. Le site de phosphorylation de la sous-unité I a été identifié comme le résidu Y304. Il est donc probable que la PKA (en amont de la voie) active une ou plusieurs tyrosines kinases (en aval) qui seraient directement responsables de la phosphorylation de la Y304 de la sous-unité I du complexe IV. Dans les ostéoclastes, la sous-unité II de ce même complexe peut-être phosphorylée sur un résidu tyrosine par la Src (voir plus haut). L'activation de la kinase PKC peut induire la phosphorylation de la sous-unité IV provoquant une augmentation de l'activité du complexe IV (Song *et al.*, 2002; Kagan *et al.*, 2004).

Les voies de régulation dépendantes des phosphorylations peuvent changer selon les tissus. Par exemple, l'isoforme VIa, que l'on trouve dans le cœur et le foie, est phosphorylée au niveau de la thréonine 11 (Tsukihara *et al.*, 2003). On ne sait toujours pas clairement si les différentes isoformes des sous-unités de la cytochrome c oxydase peuvent avoir différentes fonctions, mais la présence de différents sites de phosphorylation suggère la présence de mécanismes de régulation par phosphorylation qui changeraient selon les tissus.

#### 4.2.6. Le complexe V

PDGF peut induire la phosphorylation de la sous-unité  $\delta$ , probablement au niveau de la tyrosine 75, dans différentes lignées cellulaires (Zhang *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 2002). Dans le cerveau de souris, il semble que la sous-unité  $\alpha$  soit phosphorylée au niveau de Ser76 (Vosseller *et al.*, 2005). Dans notre laboratoire, l'équipe a aussi démontré que les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  sont phosphorylées sur tyrosine dans les mitochondries de cerveau chez le rat (Augereau *et al.*, 2005). Les sous-unités  $\alpha$  et OSCP (pour *oligomycin sensitivity-conferring protein*) semblent aussi phosphorylées dans les mitochondries de cœur chez le porc (Hopper *et al.*, 2006). Dans la levure, les sous-unités  $\alpha$  (Y434, Ser416 et Ser426) et  $\beta$  (Y7) sont aussi phosphorylées. Enfin, il semblerait que le niveau de phosphorylation des complexes pourrait changer selon le niveau d'organisation des supercomplexes. Effectivement, il a été montré que les monomères de l'ATP synthase étaient phosphorylés sur tyrosine au niveau de la sous-unité  $\gamma$ , mais pas lorsque le complexe était présent en dimère (Di Pancrazio *et al.*, 2006). Ces



résultats suggèrent fortement que les voies de signalisation impliquant les phosphorylations pourraient influencer l'organisation des complexes du STE en supercomplexe.

#### 4.2.7. Les enzymes du cycle de Krebs

Plusieurs protéines du cycle de Krebs peuvent être phosphorylées. Chez la pomme de terre, l'aconitase, la sous-unité  $\beta$  de la succinate-CoA ligase, la NAD-isocitrate déshydrogénase, l'enzyme malique, les deux sous-unités de la NAD-malate déshydrogénase et la formate déshydrogénase peuvent être phosphorylées (Bykova *et al.*, 2003). On ne connaît cependant que les résidus phosphorylés de la formate déshydrogénase : Thr76 et Thr333. Ces phosphorylations sont fortement inhibées en présence de  $\text{NAD}^+$ , de formate et de pyruvate. Chez les mammifères, l'isocitrate déshydrogénase et l'aconitase ont aussi été montrées comme phosphorylées (Schulenberg *et al.*, 2003), tout comme la succinyl-CoA synthétase (Steiner et Smith, 1981).

A la lumière de ces différents résultats, on remarque qu'il est généralement difficile d'identifier simultanément tous les acteurs impliqués dans les processus de phosphorylations: les kinases et les phosphatases impliquées, les résidus spécifiques et les impacts fonctionnels sont rarement tous identifiés au cours d'une même étude. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces difficultés. Premièrement, les techniques utilisées peuvent biaiser les résultats. L'utilisation de la radioactivité ou d'une sonde spécifique aux résidus phosphorylés (telle que le *Pro-Q-Diamond*) permet d'obtenir une idée générale des protéines qui sont phosphorylées, sans qu'il soit possible d'identifier la nature des résidus phosphorylés. L'utilisation d'anticorps spécifiques à certains résidus phosphorylés (tels que les anticorps reconnaissant les phosphotyrosines, les phosphosérines ou les phosphothréonines) peuvent éventuellement pallier ce manque. Les anticorps doivent cependant reconnaître les acides aminés adjacents au site de phosphorylation pour se lier au groupement phosphorylé. Les anticorps reconnaissant les phosphosérines et phosphothréonines possèdent généralement de trop petits épitopes pour une liaison efficace, un problème que l'on retrouve moins avec les anticorps des phosphotyrosines. L'utilisation de la spectrométrie de masse peut aussi masquer certains sites de phosphorylation car l'ionisation des échantillons peut induire la perte des groupements phosphates, ce qui peut rendre encore plus difficile l'identification des résidus phosphorylés (Huttemann *et al.*, 2007).

## 5. Objectifs

Le principal objectif de cette thèse était donc de mieux comprendre comment les phosphorylations peuvent influencer le métabolisme mitochondrial et plus particulièrement, les OXPHOS. Dans un premier temps, nous avons testé l'existence d'une voie de régulation de l'activité de la Src kinase par la tyrosine phosphatase PTP1B à l'intérieur des mitochondries de cerveau chez le rat (Chapitre 1). Dans un deuxième temps, nous avons regardé si la Src kinase, qui est reconnu comme un important oncogène, pouvait aussi réguler le métabolisme mitochondrial dans différentes cellules cancéreuses (Chapitre 2).

### III. CHAPITRE 1

#### 1. Introduction

On reconnaît depuis quelques années que les processus de phosphorylation constituent une importante voie de régulation des OXPHOS. Plusieurs kinases sont spécifiquement ciblées aux mitochondries où elles peuvent moduler la plupart des fonctions mitochondriales. On y trouve d'ailleurs des protéines phosphorylées dans tous les compartiments mitochondriaux (Horbinski et Chu, 2005; Pagliarini et Dixon, 2006). Après avoir été sous-estimée durant plusieurs années, la phosphorylation sur résidus tyrosine des complexes du STE apparaît maintenant comme une voie de régulation des OXPHOS importante (Salvi *et al.*, 2005). Dans les ostéoclastes, la phosphorylation de la sous-unité II du complexe IV par la Src kinase induit une activation des capacités de l'enzyme ainsi qu'une augmentation de la respiration et de la production d'ATP (Miyazaki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). Dans les hépatocytes, la phosphorylation sur résidu tyrosine de la sous-unité I du complexe IV résulte en une diminution des capacités de l'enzyme (Samavati *et al.*, 2008). La flavoprotéine du complexe II peut être phosphorylé par Fgr, une tyrosine-kinase (Salvi *et al.*, 2007). La phosphorylation des résidus Y48 et Y97 du cytochrome *c* induit une diminution de la respiration. (Lee *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). La phosphorylation du cytochrome *c* affecte aussi le déclenchement de l'apoptose dépendante du largage du cytochrome *c* (Pecina *et al.*, 2010). La chaîne  $\gamma$  de l'ATP synthase est phosphorylée au niveau du résidu Y52 (Di Pancrazio *et al.*, 2006). Tous ces résultats démontrent bien l'importance des phosphorylations sur tyrosine dans la régulation du métabolisme mitochondrial. L'identification des kinases et phosphatases impliquées, des mécanismes de régulation des kinases et phosphatases impliquées, de leurs cibles et des impacts fonctionnels constituent autant de points importants à étudier.

Dans les mitochondries de cerveau chez le rat, les Src kinases (Lyn, Fyn, Fgr, Src et Csk) sont responsables de la majeure partie de l'activité totale de phosphorylation sur tyrosine (Salvi *et al.*, 2002). Chez le rat, la Src kinase est seulement présente dans les mitochondries de cerveau, mais non dans les autres tissus (Arachiche *et al.*, 2008). On sait que la respiration mitochondriale y diminue lorsque la Src est inhibée, sans toutefois connaître ses cibles mitochondriales (Augereau *et al.*, 2005). Certaines tyrosines phosphatases, PTP1B et SHP-2, sont aussi spécifiquement présentes dans les mitochondries de cerveau (Arachiche *et al.*,

2008). Ces deux phosphatases sont connues pour réguler l'activité de la Src kinase dans le cytosol : elles peuvent déphosphoryler le résidu inhibiteur de la Src (Y530) et induire l'activation de cette kinase et la phosphorylation du résidu activateur (pY419) (Roskoski, 2005). On ne sait toutefois pas si de tels mécanismes existent dans les mitochondries.

Cette étude avait donc pour but de vérifier la présence d'une régulation intramitochondriale de la Src par PTP1B et d'en étudier les impacts fonctionnels dans les mitochondries de cerveau chez le rat.

## 2. Article 1

### **FUNCTIONAL IMPACT OF PTP1B-MEDIATED SRC REGULATION ON OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA**

**Etienne Hébert Chatelain<sup>a</sup>, Jean-William Dupuy<sup>b</sup>, Thierry Letellier<sup>a</sup> and Jeanne Dachary-Prigent<sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup>INSERM-U688 Physiopathologie Mitochondriale, Université de Bordeaux, 146 : rue Léo Saignat, Bordeaux, F-33076 France

<sup>b</sup>Université de Bordeaux, Pôle Protéomique, Centre de Génomique Fonctionnelle, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, F 33076 France

\*corresponding author: Jeanne Dachary-Prigent, INSERM-U688, Université Victor Ségalen-Bordeaux2, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux-Cedex, France. Fax 05 57 57 17 03; E-mail : [jeanne.dachary@u-bordeaux2.fr](mailto:jeanne.dachary@u-bordeaux2.fr)

Running title: Regulation of Src in mitochondria

Sous presse dans Cellular Molecular Life Sciences (DOI 10.1007/s00018-010-0573-6)

Hébert Chatelain et al (2011), **68**: 2603-2613.

Cell. Mol. Life Sci. (2011) 68:2603–2613  
DOI 10.1007/s00018-010-0573-6

**Cellular and Molecular Life Sciences**

RESEARCH ARTICLE

### **Functional impact of PTP1B-mediated Src regulation on oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria**

**Etienne Hébert Chatelain · Jean-William Dupuy ·  
Thierry Letellier · Jeanne Dachary-Prigent**

N.B. Dans cet article, la structure des Src kinases aviaires a été utilisée alors que dans le reste de la thèse, la structure des Src kinases humaines a été utilisée pour décrire les résidus activateurs et inhibiteurs. Ainsi, dans le présent article, le résidu Y419-Src est nommé Y416-Src, tandis que le résidu Y530-Src est nommé Y527-Src.

## 2.1. ABSTRACT

Given the presence of Src and PTP1B within rat brain mitochondria, we have investigated whether PTP1B regulates Src activity in mitochondrial as in the cytosol. Results showed that Src was stimulated by *in vitro* addition of ATP to mitochondria, and this stimulation was reversed by a membrane-permeable allosteric inhibitor of PTP1B, and by a potent selective Src inhibitor. They also indicated a direct action of PTP1B on phosphorylated tyrosine 527 residue of Src, thus implicating a role for PTP1B in the modulation of Src activity in mitochondria. Putative Src substrates were identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry and two-dimensional blue native/SDS-PAGE. Both inhibitors inhibited ADP-stimulated respirations concurrently to Src activation and complex IV activation by ATP, while having no effect or increasing the activity of the other complexes. Our analysis emphasizes the regulatory function of Src and its modulation by PTP1B on oxidative phosphorylation in mitochondria.

**Keywords:** Src kinase, PTP1B, mitochondria, oxidative phosphorylation, regulation, signaling, respiration

**Abbreviations:** oxidative phosphorylation: OxPhos; tyrosine: Y; C terminal Src kinase: Csk; 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine: PP2; 3-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide inhibitor: PTP1Bi; 2D BN/SDS-PAGE: two-dimensional blue native/sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; nano LC-MS/MS: nano liquid chromatography tandem mass spectrometry.

## 2.2. INTRODUCTION

The main part of the energy used by the cell is produced by mitochondria through oxidative phosphorylation (OxPhos). During this process, reducing equivalents are transferred from the Krebs cycle to electron transport chain complexes. The course of electrons through the complexes I, II, III and IV allows for the reduction of O<sub>2</sub> to form H<sub>2</sub>O and the passage of protons (except for the second complex) to mitochondrial inter-membrane space to form a proton gradient which is used by the ATP synthase (complex V) to produce ATP (Navarro et Boveris, 2007).

Since the mitochondrial energetic production depends on various functions and demands of the cell, the OxPhos process needs tight regulation by different mechanisms (Huttemann *et al.*, 2007). One major known pathway of physiological regulation is phosphorylation of proteins. Numerous kinases are specifically targeted to mitochondria where they modulate fusion, fission, apoptosis and metabolism and where they phosphorylate numerous proteins in all mitochondrial compartments (for reviews see Horbinski et Chu, 2005; Pagliarini et Dixon, 2006). After being underestimated for years, phosphorylation/dephosphorylation on tyrosine residues now appears to be an important regulation pathway of OxPhos enzymes (Salvi *et al.*, 2005), with the discovery that many components of the respiratory chain complexes were tyrosine-phosphorylated. For example, the tyrosine kinase Src was shown to phosphorylate an unknown tyrosine (Y) residue of complex IV subunit II in osteoclasts, resulting in activation of the enzyme (Miyazaki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). Treatment of hepatocyte with Tissue Necrosis Factor  $\alpha$  stimulates an unknown tyrosine kinase to phosphorylate Y304 residue in complex IV subunit I, resulting in inactivation of the complex (Samavati *et al.*, 2008). The flavoprotein of complex II was shown to be phosphorylated by Fgr, but the resulting effect was not known (Salvi *et al.*, 2007). The  $\gamma$  chain of the ATP synthase monomers was shown to be phosphorylated on Y52, and this phosphorylation was postulated to regulate the central stalk rotation of the enzyme (Di Pancrazio *et al.*, 2006). Complex IV activity is inhibited when its substrate cytochrome *c* is phosphorylated on Y48 (Yu *et al.*, 2008). Recently, Src and Lck-mediated phosphorylation of Y190 and Y194 in adenine nucleotide translocase was shown to be involved in its carrier function and in cell respiration (Feng *et al.*, 2010). Therefore, the data are in favour of tyrosine phosphorylation as a major factor in the regulation of mitochondrial bioenergetics.

Although further studies are required to identify other tyrosine-phosphorylated proteins, the kinases involved and to decipher their role in mitochondrial bioenergetics, an additional worth studying aspect is the inter-regulation of signaling proteins in mitochondria. Several members of the Src kinase family, including Src, Lyn, Fyn, Fgr, the regulatory C terminal Src kinase (Csk) (Salvi *et al.*, 2002; Tibaldi *et al.*, 2008), and the tyrosine phosphatases PTP1B (Augereau *et al.*, 2005) and SHP2 (Salvi *et al.*, 2004) are present in rat brain mitochondria. It is well known that activation and inhibition of cytosolic Src kinases depend on the phosphorylation status of two key Y residues: Y416 and Y527 (Brown et Cooper, 1996; Roskoski, 2004; Roskoski, 2005). C-terminal Y527 is phosphorylated by Csk, enabling phosphorylated Y527 (pY527) to bind to the SH2 domain of Src kinases, thus resulting in the

stabilization of a restrained and inactive form of these enzymes (Roskoski, 2005). Dephosphorylation of pY527 by tyrosine phosphatases such as SHP2 or PTP1B induces a disruption of the SH2 domain-pY527 interaction (Roskoski, 2004; Roskoski, 2005). This opens the catalytic domain and facilitates autophosphorylation of Y416 (pY416) in the catalytic site leading to activation of Src kinases (Brown et Cooper, 1996).

In this study, we used rat brain mitochondria as a model to study the occurrence of a regulation of mitochondrial Src by PTP1B, taking advantage of the fact that both enzymes reside in mitochondria from this tissue (Arachiche *et al.*, 2008). To address this issue, we used a specific membrane-permeable allosteric PTP1B inhibitor: 3-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide (PTP1Bi) (Wiesmann *et al.*, 2004) and studied its effect on Src activation, using phospho-specific Src antibodies. The results were compared to the effect of 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP2), a well known potent and selective Src kinase inhibitor (Bain *et al.*, 2003). We provided evidence that PTP1B positively regulates Src activity by dephosphorylating the pY527 residue in mitochondrial Src. This was shown in *in vitro* experiments and also under more physiologic conditions as represented by studies of ADP-stimulated respiration linked to catalytic activities of the respiratory complexes. Finally, several mitochondrial proteins were shown to be putative substrates of Src kinase.

### 2.3. MATERIALS AND METHODS

*Chemicals-* The mouse monoclonal antibody to phosphotyrosine (PY20) and PY20 directly coupled to agarose, the mouse monoclonal antibody to c-Src, protein A/G PLUS-agarosec conjugated were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies to phosphorylated and non-phosphorylated Src species (pY416-Src, pY527-Src, non-pY416-Src and non-pY527-Src) were bought from Cell Signaling. The antibody to v-Src directly coupled to agarose, the Src kinase inhibitor PP2 and the PTP1B inhibitor (PTP1Bi) were from Calbiochem. All antibodies against OxPhos complexes were bought from Mitosciences. Protease and phosphatase cocktail inhibitors were bought from Roche. All other chemicals were from Sigma.



*Isolation of mitochondria-* Male Wistar rats were sacrificed by cervical shock and decapitation. Brain mitochondria were isolated from whole brain, as described by Clark and Nicklas (Clark et Nicklas, 1970), and further purified on a discontinuous Ficoll gradient. Protein content was measured by Biuret method. After isolation, 1-mg mitochondrial fractions were immediately stored at -80°C for further experiments. All oxygraphic measurements were carried out within 3 hours with freshly isolated mitochondria.

*In Vitro Src regulation-* Rat brain mitochondria were thawed and samples preincubated in parallel at 30°C for 10 min in kinase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>) containing 20 mM oligomycin and 30 ng/ml rotenone, together with either 30 μM PP2, 50 μM PTP1Bi or 10 mM NaF plus 2 mM orthovanadate. Then, 1 mM ATP was added, except in the control sample and incubation continued for another 10 min period. The samples were supplemented with protease and phosphatase cocktail inhibitors, centrifuged at 12000 rpm (4°C), and proteins in the pellet were immediately solubilised in 1X denaturing Laemmli buffer. In some experiments, mitochondrial Src was immunoprecipitated from samples as described below.

*Oxygraphic experiments-* Mitochondrial oxygen consumption was monitored with fresh mitochondria at 30°C in a 1-ml thermostatically controlled chamber equipped with a Clarke oxygen electrode, in the following respiration buffer: 75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 100 mM KCl, 10 mM Tris-phosphate, 10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 7.4). Inhibitors (or DMSO for the control never exceeding 0.8 %) were incubated with mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) in the oxygraphic cuvette for 3 min before addition of 10 mM pyruvate, 10 mM malate and 2 mM ADP. Control values for respiration rates were 32.6 ± 2.4 for state 2, 56.8 ± 7.0 for state 3 (or ADP-stimulated respiration), with RCR = 1.8 ± 0.2 (means ± S.D, n=8 different mitochondrial preparations). Respiratory control ratios (RCR) were determined from the ratio between state 2 (pyruvate and malate) and state 3 (pyruvate and malate plus ADP). Preliminary experiments showed that state 2 and 4 were equivalent.

*Src immunoprecipitation-* Mitochondria solubilised with n-dodecyl-maltoside (2 mg.mg protein<sup>-1</sup>) in the presence of protease and phosphatase cocktail inhibitors as described in (Augereau *et al.*, 2005). After solubilisation, samples were centrifuged and immunoprecipitation was performed on supernatant with the antibody to c-Src for 1 hour at 4°C. Protein A/G agarose beads (20 μL) were then added and incubation continued overnight at 4°C with constant rocking. The beads were washed three times with PBS (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) containing protease and phosphatase inhibitors. Proteins were eluted from the beads with 1X Laemmli buffer, boiled with 5% β-mercaptoethanol and processed for western blotting.

Because pY527-Src was not immunodetected when immunoprecipitation was performed with the antibody to c-Src (whose epitope is between amino acids 506-537 at the C-terminus of c-Src), we also used an antibody to v-Src (which does not contain the C-terminus tail, and whose epitope is within the SH3 domain of Src, and therefore which is not sensitive to the phosphorylation status of Y416 nor Y527).

*Enzymatic activities of electron transport system complexes and of ATP synthase-* Enzymatic activities were measured as in (Arachiche *et al.*, 2008). When required, mitochondria were pre-incubated for 10 min at 30°C with 30 μM PP2 or 50 μM PTP1Bi, before addition of 1 mM ATP. The Src phosphorylation status was controlled at the end of complex I and V enzymatic assays, as these were performed with respectively 40 and 30 μg/ml of mitochondria. The samples, supplemented with protease and phosphatase inhibitors, were taken from the spectrophotometric cuvettes and centrifuged at 6000 g (4°C) for 5 min. The pellets were solubilised in 1X denaturing Laemmli buffer, and western blotted with pY416-Src antibody. This control could not be performed for complex III and IV due to the small amount of mitochondria used in the assays (3 and 5 μg, respectively).

*Two dimensional electrophoresis-* 400 μg of purified mitochondria were subjected to *in vitro* treatments (see above), pelleted at 13000 rpm at 4°C, and processed for BN-PAGE according to slightly modified protocols from (Williams *et al.*, 2004; Wittig *et al.*, 2006). In brief, mitochondria were solubilised with n-dodecyl-maltoside (2.5 g mg/mg protein) in 1 M 6-aminocaproic acid, 50 mM BisTris, pH 7.0 buffer, supplemented with glycerol and Coomassie Blue, and subjected to 5-13% gradient BN-PAGE, which was directly transferred to PVDF membrane for immunodetection of tyrosine-phosphorylated proteins in the native complexes. Alternatively, the treated samples were processed for BN-PAGE, the lanes were cut and processed for second dimension on 12,5 % SDS-PAGE after denaturation and reduction in 1% sodium dodecyl sulfate (w/v) and 1% (v/v) β-mercaptoethanol. The 2<sup>nd</sup> dimension gels were immunoblotted for detection of tyrosine-phosphorylated proteins. A 2<sup>nd</sup> dimension gel was kept for Coomassie blue coloration. Tyrosine-phosphorylated spots appearing in the Coomassie blue gel were excised and proteins identified by nano liquid chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS).

*Gel Electrophoresis and Western Blotting-* Samples were subjected to SDS-PAGE (12.5%) and separated proteins were transferred onto a nitrocellulose or PVDF membranes as already described (Augereau *et al.*, 2005). Phosphotyrosines were revealed with PY20 antibody while OxPhos complexes were revealed with antibody against complex I 39 kDa subunit, complex II 70 kDa subunit, complex III core 2 protein subunit, complex IV subunit III and complex V  $\alpha$  subunit. Primary antibodies were revealed with horseradish peroxidase-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse or anti-rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub> fragment-specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Blots were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) Plus from Amersham. Labelings were quantified by densitometric analysis using Image J (NIH) software.

*Proteomic analyses-* The spots of interest were digested by trypsin as indicated in Pocaly *et al.* (Pocaly *et al.*, 2008). Peptides were further analyzed by nano liquid chromatography coupled to a MS/MS LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo-Finnigan, San Jose, CA). Peptides were identified with SEQUEST through the Bioworks 3.3.1 interface (Thermo-Finnigan, Torrence, CA, USA) against a subset of the UniProt database restricted to *Rattus norvegicus* entries (UniProtKB, Release 2010\_09, August 2010, 32482 entries). Peptides were validated using the following criteria ( $\Delta\text{CN} \geq 0.1$ ,  $\text{Xcorr} \geq 1.5$  (single charge), 2.0 (double charge), 2.5 (triple charge), 3.0 (Quadruple charge), Peptide Probability  $\leq 0.001$ ). Proteins were validated as soon as two different peptides are validated.

*Statistical analyses-* STATISTICA (7.1) was used for all statistical analyses. One-way ANOVA (with treatment as factor) was used to compare means among treatments for all parameters measured. The normality assumption was verified with the Kolmogorov-Smirnoff test and variance equality was confirmed with the Levene test. Significance was assessed at the 0.05 (or lower) level for all tests.

## **2.4. RESULTS**

*In vitro study of mitochondrial Src kinase regulation-* Assuming that PTP1B can up-regulate Src activity in mitochondria, we examined the effect of PTP1Bi on the global tyrosine phosphorylation protein profile in mitochondria incubated in the presence of ATP, in comparison to the specific Src inhibitor PP2.

Incubation with exogenous ATP induced the appearance of tyrosine-phosphorylated mitochondrial proteins compared to control samples (Fig. 1; lanes 1 and 2). The maximal increase was observed in the presence of phosphatase inhibitors (lane 5). When compared to the ATP treatment, the global tyrosine phosphorylation level decreased with either 30  $\mu$ M PP2 or 50  $\mu$ M PTP1Bi (lanes 3-4). These concentrations of inhibitors were those which gave a net and recurrent decrease in the global tyrosine phosphorylation level.

We next examined the phosphorylation status of Y416 and Y527 residues in Src with phospho-specific antibodies. The labeling intensities were quantified in relation to the MnSOD signal as a loading control. Results showed little labeling of pY416-Src in control samples (Fig. 2A, B; lane 1). Labeling increased in ATP-treated mitochondria and was maximal when mitochondria were incubated with phosphatase inhibitors prior to ATP (Fig. 2A, B; lanes 2 and 5). This later result could reflect increased activity of Src family kinases in the presence of orthovanadate, as shown in several reports (Mohamed *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2009; Shani *et al.*, 2009). Indeed dephosphorylation of pY416 residue can be induced by unidentified tyrosine phosphatases, inhibited by orthovanadate (Roskoski, 2005).

In the presence of PP2 or PTP1Bi, the labeling intensity of pY416-Src was clearly reduced (Fig. 2A, B; lanes 3 and 4). Concerning pY527-Src labeling, ATP treatment increased the signal compared to the control (Fig. 2A, B; lanes 1 and 2). A further significant increase was found when mitochondria were exposed to PP2 or PTP1Bi (Fig. 2A, B; lanes 3-4).

*Evidence that the phospho-specific antibodies recognize mainly Src-* As the phospho-specific antibodies can recognize other members of the Src kinase family, we analyzed the phosphorylation status in immunoprecipitated Src from samples collected after in vitro treatments.

The results showed that pY416-Src labeling in immunoprecipitated Src varied in the same way as when immunodetection was performed in the whole lysate for mitochondria treated with ATP, PP2 and PTP1B (Fig. 2-3). In the presence of phosphatase inhibitors (Fig. 3; lane 5), pY416-Src labeling was lower than in the mitochondrial lysates (Fig. 2; lane 5), reflecting here the level of active Src compared to mitochondrial lysates where several Src family kinases were probably labeled. The data also revealed that pY416 residue is not a

target for PTP1B, since PTP1B inhibition would have led to increased pY416-Src labeling, as with orthovanadate.

As pY527-Src was not detected when immunoprecipitation was performed with the antibody against c-Src, immunoprecipitation was performed with an antibody against v-Src (see Materials and Methods), and the pY527-Src signals quantified in relation to the non-phosphorylated Y527-Src signals (Fig. 3C, D). The data showed similar variations as in total lysates (Fig. 2). Normalization against v-Src recovery gave similar results (result not shown).

Taken together, the data confirmed that phosphorylated Y527 residue is a substrate of PTP1B, the inhibition of which resulted in an increased phosphorylation of Y527 residue, with a concomitant decrease in the pY416-Src labeling.

*Determination of tyrosine-phosphorylated proteins*-In an attempt to determine Src substrates in mitochondria, we compared the pattern of tyrosine phosphorylation according to the different treatments of native OXPHOS complexes obtained by BN-PAGE followed by direct transfer and immunodetection of tyrosine phosphorylation (Fig. 5A). Results showed that the presence of ATP increased the tyrosine phosphorylation of all complexes, identified by the labeling of one of their subunits (Fig. 5A) and by their catalytic staining by histochemical reactions (results not shown) as already performed [15]. PP2 decreased the tyrosine phosphorylation labeling to the level of the control sample, whereas PTP1Bi was less efficient. In addition, the labeling of bands at the bottom of the membrane was rather enhanced in the presence of PTP1Bi.

We next separated subunits of the different complexes by performing a second dimension SDS-PAGE after denaturation and reduction of the corresponding BN-PAGE, and studied their tyrosine phosphorylation state. Very low phosphotyrosine signals were detected in untreated mitochondria, while several spots appeared after incubation with ATP (Fig. 5B). The level of labeling of these spots was strongly attenuated in the presence of PP2 and less in the presence of PTP1Bi (Fig. 5B).

We analyzed a dozen spots by nano LC-MS/MS in the corresponding Coomassie blue-stained gel (Fig. 5C). The results show that except for spots 1, 2, 8 and 11 which corresponded at least at 87% to a single protein, respectively clathrin, the 75 kDa subunit of complex I, the subunit 2 of complex III and aconitase (Table 3), the other spots were composed of several proteins (see supplemental data). In table 3 were recorded two or three

proteins representing more than 60 % of the spot. Interestingly, clathrin in spot 1 and the three subunits of sodium/potassium transporting ATPase in spot 12 are found in membrane fractions according to the UniProt database. This could suggest some contamination and/or mitochondrial associated proteins. The other identified proteins are mitochondrial and most corresponded to OxPhos complexes subunits and to matrix proteins. Therefore, this experiment enabled to detect putative tyrosine-phosphorylated proteins in mitochondria which are sensitive to PP2 and also to PTP1Bi albeit to a lesser extent.

*Functional study of mitochondrial Src kinase regulation-* ATP induced an increase in the global tyrosine-phosphorylated protein profile along with the labeling of mitochondrial pY416-Src. PP2 and PTP1Bi abrogated these effects although the latter inhibited more efficiently tyrosine phosphorylation during 1D SDS-PAGE analysis as compared to 2D BN-PAGE/SDS/PAGE analysis. Since ATP is produced during ADP-stimulated respiration (state 3), we examined the effect of the inhibitors during this step of mitochondrial respiration. Results showed that both inhibitors inhibited ADP-stimulated respiration, with PTP1Bi being the most efficient (Table 1).

We then controlled the phosphorylation status of Y416 residue in mitochondria taken from the oxygraphic chamber. No pY416-Src labeling was observed when immunodetection was performed with mitochondrial lysates. Therefore, analysis was performed on Src immunoprecipitated from mitochondria pelleted from the oxygraphic samples. Results showed that PP2 and PTP1Bi decreased pY416-Src labeling during ADP-stimulated respiration to a similar degree (Fig. 4A, B; lanes 1 and 2).

*Enzymatic activities of OxPhos complexes-* The preceding results suggest a tight link between oxygen consumption and Src activity. As respiration depends on OxPhos activities, this could occur by means of Src-induced phosphorylation of OxPhos complexes. To address this question, we examined the effect of the inhibitors on the enzymatic activities of the OxPhos complexes, in an attempt to identify potential targets. Enzymatic activities in control samples (Table 2) were in the range of previous results from our laboratory (Arachiche *et al.*, 2008). ATP addition significantly affected enzymatic activities of all complexes, decreasing the activities of complex I, III, I+III and V while increasing the activity of complex IV (Table 2). PP2 and PTP1Bi reversed the effect of ATP on the enzymatic activities for all the complexes, except for complex III with PTP1Bi (Table 2). The inhibitors had no effect on enzymatic activities of the complexes measured in the absence of ATP (data not shown).

Controls (results not illustrated) showed that the labeling of pY416-Src in the assays varied in a similar way than in *in vitro* experiments (Fig. 2).

## 2.5. DISCUSSION

Since the discovery of tyrosine kinases of the Src family in rat brain mitochondria (Salvi *et al.*, 2002; Tibaldi *et al.*, 2008), Src-mediated tyrosine phosphorylation is emerging as an important pathway for the regulation of mitochondrial bioenergetics. In addition, the presence of the tyrosine phosphatase PTP1B in mitochondria represents a possible mechanism of Src regulation. In this study, we used a PTP1B inhibitor (Wiesmann *et al.*, 2004) to study PTP1B-mediated regulation of Src activity in brain mitochondria and the influence of this regulation on mitochondrial bioenergetics.

*In vitro* studies showed that ATP induced phosphorylation at Y416 and Y527 residues in Src, in parallel to the increase in the tyrosine phosphorylation profile of mitochondrial proteins. Although fully active Src is characterized by phosphorylated Y416 and unphosphorylated Y527 residues (B in Fig. 5), numerous studies have shown that Src phosphorylated on Y416 is active, regardless of the phosphorylation state of the Y527 residue (Stover *et al.*, 1996; Newman, 2009). Therefore, the phosphorylation of Y416 residue is a reliable indicator of active Src in mitochondria, as confirmed by the concurrent enhanced protein tyrosine phosphorylation pattern (Fig. 1; lane 2).

In the presence of PP2, the labeling of tyrosine-phosphorylated mitochondrial proteins and of pY416-Src decreased while the signal of pY527-Src increased (Fig. 1-3; lane 3). PP2 blocks the ATP binding site of Src (Bain *et al.*, 2003; Arachiche *et al.*, 2008; Tibaldi *et al.*, 2008), preventing autophosphorylation of Y416 residue and activation of Src (D in Fig. 5). The increase in pY527-Src labeling (Fig. 2A,B; lane 3) suggested an increased activity of mitochondrial Csk on Y527 in inactivated Src. This is supported by a study showing that a mutant of Lck, another member of the Src kinase family, containing a K273R mutation, is defective in binding ATP and cannot autophosphorylate (Yamaguchi et Hendrickson, 1996), but is nonetheless an efficient substrate for Csk (Sondhi *et al.*, 1998).

In mitochondria pre-incubated with PTP1Bi, the data exhibited a similar variation as with PP2, *i.e.* a decrease in the tyrosine phosphorylation of mitochondrial proteins, a decrease in

the labeling of pY416-Src and an increase of pY527-Src signal (Fig. 1-3, lane 4). Previous studies reported that PTP1B dephosphorylates the pY527 residue and stimulates Src activity in several human cancer cell lines (Bjorge *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2007). Therefore, our experimental data indicated that PTP1Bi inhibited PTP1B-induced dephosphorylation of Y527 residue, thus enhancing pY527-Src labeling (D in Fig. 5). The phosphorylation of this residue induces intramolecular interactions between the SH2 and SH3 domains and the pY527 residue, preventing the autophosphorylation of the Y416 residue (Harrison, 2003), explaining the lower labeling of pY416-Src with PTP1Bi. Thus our results showed for the first time that the pY527 residue in mitochondrial Src is a PTP1B substrate, as in the cytosol, the dephosphorylation of which resulting in the activation of this kinase.

In spite of the fact that PP2 and PTP1Bi induced similar inhibitory effect on Src activity, examination of the effect of both inhibitors on the tyrosine phosphorylation of OxPhos complexes showed that PP2 was more efficient than PTP1Bi in preventing tyrosine phosphorylation induced by the presence of ATP. This is particularly evidenced in the 2<sup>nd</sup> dimension SDS-PAGE following the BN-PAGE (Fig. 5B). Mass spectroscopy enabled to identify some proteins that are tyrosine-phosphorylated by Src kinase in the presence of ATP (Table 3). However, it was not possible to assign a defined protein to a tyrosine-phosphorylated spot, due to the fact that different proteins have been sometimes identified in a single spot. In addition, some tyrosine-phosphorylated spots have not counterparts in the corresponding Coomassie blue staining second dimension gel. Nonetheless, the higher level of tyrosine phosphorylation labeling in the presence of PTP1Bi compared to PP2 allows to propose that PTP1Bi inhibits PTP1B-induced direct dephosphorylation of mitochondrial proteins, in addition to inhibiting Src, as shown in Fig. 2-3.

ADP-stimulated respiration and pY416-Src labeling were decreased in the presence of PP2 or PTP1Bi (Table 1 and Fig. 4). These results indicate that Src kinase activity is at least partly involved in the regulation of mitochondrial ADP-stimulated respiration. As ADP is progressively transformed to ATP during state 3 respiration, available ATP is therefore lower than in *in vitro* experiments, resulting in a lower amount of pY416-Src, which must be immunoprecipitated to be detected in oxygraphic experiments (Fig. 4).

A potential link between respiration rates and OxPhos activities required that the analysis was performed on complex activities in the presence of ATP, since pY416-Src was labeled in ADP-stimulated respiration (Fig. 4; lane 2) and in enzymatic measurements performed in the



presence of ATP (as in Fig. 2). All OxPhox complexes activities appeared influenced by Src activity. Functional impact of Src-mediated phosphorylation on enzymatic activities of OxPhox complexes was further confirmed by the observation of at least one Src-dependent tyrosine phosphorylated subunit of complex I, III, IV and V (Table 3). Data showed that the inhibitors decreased complex IV activity (Table 2), concurrently to decreasing Src activity as demonstrated by the loss of labeling of pY416-Src. This result is in line with the finding that Src kinase is known to upregulate cytochrome *c* oxidase activity in osteoclasts (Miyazaki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). The inhibitors had no effect or increased enzymatic activities for the other complexes. Therefore, the inhibition of mitochondrial respiration observed in the presence of the inhibitors could be due (at least partly) to decreased Src-mediated phosphorylation of complex IV components. Interestingly, the subunit 2 of complex IV was found in spot 10, and is therefore probably tyrosine-phosphorylated by Src. As a matter of fact, this subunit has been found to be directly phosphorylated by purified Src (Miyazaki *et al.*, 2003). Notably, it is known that cytochrome *c* oxidase tightly controls OxPhos (Villani *et Attardi*, 1997; Villani *et al.*, 1998; D'Aurelio *et al.*, 2001), emphasizing the importance of Src-mediated phosphorylation of complex IV components in the regulation of respiration.

The different effects of PP2 and PTP1Bi on state 3 respiration or tyrosine-phosphorylation pattern in 2D BN-PAGE/SDS-PAGE analysis suggest that besides Src, PTP1B could have other mitochondrial substrates whose dephosphorylation is involved in state 3 respirations. These could be Oxphos complexes and/or other tyrosine-phosphorylated proteins involved in the mitochondrial metabolism such as citric acid components (Salvi *et al.*, 2005; Hopper *et al.*, 2006), such as aconitase, which was found in spot 11 (Table 3), due to the localization of PTP1B in the mitochondrial matrix (Augereau *et al.*, 2005). Clear identification of PTP1B substrates other than mitochondrial Src (from our analyses) seems however difficult since phosphorylation status of those proteins should depends on Src-dependent phosphorylation and PTP1B-dependent dephosphorylation of different (or not) subunits and/or residues.

In conclusion, we provide the first experimental evidence of a positive regulation of Src by PTP1B in rat brain mitochondria, and of its involvement in ADP-stimulated respiration and in enzymatic activity of the OxPhos complexes. Several mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation were shown to be Src-dependent tyrosine-phosphorylated after incubation with ATP. These data also underline that PTP1B could have other mitochondrial

substrates. Identification of PTP1B substrates among mitochondrial proteins will be an important issue for a better understanding of the regulation of mitochondrial function, at least in rat brain.

## **2.6. ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Nadia Barrier for her technical support. Etienne Hébert Chatelain was financially supported by FQRNT (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies) and NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada) scholarships. This work was supported in part by grants from INSERM, the University Victor Segalen-Bordeaux 2 and the Fondation de France (N°Engt 2008002720).

## 2.7. TABLEAUX ET FIGURES

**Table 1. Effect of PP2 and PTP1Bi on mitochondrial ADP-stimulated respiration rates.**

The inhibitors were incubated for 3 min at 30°C with mitochondria in respiration buffer before addition of pyruvate plus malate and ADP. ADP-stimulated respiration rates are presented as percentage (mean  $\pm$  SD, n=3) of a control sample treated with DMSO. Means bears different superscripts as they are significantly different ( $p > 0.05$ ) according to the Tukey test.

|             | CTL                    | PP2 (30 $\mu$ M)        | PTP1Bi (50 $\mu$ M)      |
|-------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| State 3 (%) | 100 (0.0) <sup>a</sup> | 73.4 (3.5) <sup>b</sup> | 13.8 (0.90) <sup>c</sup> |

**Table 2. Effects of ATP, PP2 and PTP1Bi on the enzymatic activities of the OxPhos complexes.**

Thawed mitochondria were incubated at 30°C for 10 min in kinase buffer with 1  $\mu$ M cAMP-dependent protein kinase inhibitor, 30 ng ml<sup>-1</sup> rotenone (except for complex I), 20  $\mu$ M oligomycin (except for ATPase activity) and the different inhibitors as indicated. Then 1 mM ATP was added and incubation continued for 10 min. Control experiments were performed under the same conditions without ATP or PP2 and PTP1Bi. Results are the means ( $\pm$  SD) of five independent measurements. Means that are not significantly different, ( $p > 0.05$ ) according to the Tukey test, share superscripts. Enzymatic activities are presented as  $\mu$ m min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

|                | Control                   | ATP                        | ATP + PP2 (30 $\mu$ M)     | ATP + PTP1Bi (50 $\mu$ M)  |
|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Complex I      | 0.107(0.003) <sup>a</sup> | 0.056 (0.001) <sup>b</sup> | 0.097 (0.001) <sup>c</sup> | 0.077 (0.003) <sup>d</sup> |
| Complex III    | 2.209(0.070) <sup>a</sup> | 1.745 (0.048) <sup>b</sup> | 2.149 (0.304) <sup>a</sup> | 1.708 (0.170) <sup>b</sup> |
| Complex I +III | 0.136(0.003) <sup>a</sup> | 0.119 (0.001) <sup>b</sup> | 0.125 (0.001) <sup>c</sup> | 0.130 (0.003) <sup>c</sup> |
| Complex IV     | 1.220(0.081) <sup>a</sup> | 1.739 (0.200) <sup>b</sup> | 1.195 (0.204) <sup>a</sup> | 1.246 (0.133) <sup>a</sup> |
| Complex V      | 0.439(0.017) <sup>a</sup> | 0.343 (0.031) <sup>b</sup> | 0.366 (0.002) <sup>c</sup> | 0.419 (0.047) <sup>a</sup> |

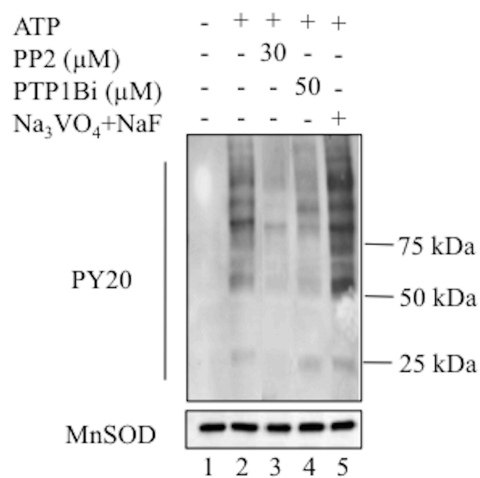
**Table 3. Proteins identified by LC-MS/MS in the different spots and representing more than 60% of the spot. Spots were selected as indicated in Fig. 5C and proteins identified by LC-MS/MS.**

| Spot | Accession number | Protein   | MS/MS scans (n) | Peptides (n) | Protein sequence coverage of peptides (%) | Molecular weight (kDa) |
|------|------------------|---|-----------------|--------------|---|------------------------|
| 1    | P11442           | Clathrin heavy chain                                  | 254             | 57           | 37,5                                      | 191                    |
| 2    | Q66HF1           | NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit         | 224             | 28           | 44,7                                      | 79                     |
| 3    | P15999           | ATP synthase subunit alpha                            | 515             | 25           | 50,4                                      | 59                     |
|      | P10179           | ATP synthase subunit beta                             | 214             | 25           | 71  | 56                     |
| 4    | P10179           | ATP synthase subunit beta                             | 564             | 31           | 72,6                                      | 56                     |
|      | P15999           | ATP synthase subunit alpha                            | 387             | 24           | 46,6                                      | 59                     |
| 5    | P32551           | Cytochrome b-c1 complex subunit 2                     | 97              | 17           | 42  | 48                     |
| 6    | P10179           | ATP synthase subunit beta                             | 99              | 24           | 68  | 56                     |
|      | P35435           | ATP synthase subunit gamma                            | 44              | 9            | 23,4                                      | 30                     |
| 7    | Q68FY0           | Cytochrome b-c1 complex subunit 1                     | 87              | 10           | 28,1                                      | 52                     |
|      | P10719           | ATP synthase subunit beta                             | 87              | 24           | 63,5                                      | 56                     |
|      | P50554           | 4-Aminobutyrate aminotransferase                      | 54              | 14           | 38,4                                      | 56                     |
| 8    | P3255            | Cytochrome b-c1 complex subunit 2                     | 119             | 19           | 40,5                                      | 48                     |
| 9    | P17764           | Acetyl-CoA acetyltransferase                          | 52              | 10           | 28  | 44                     |
|      | Q8VHF5           | Citrate synthase                                      | 44              | 10           | 22,1                                      | 51                     |
| 10   | Q05962           | ATP/ADP translocase 1                                 | 49              | 9            | 23,5                                      | 32                     |
|      | P00406           | Cytochrome c oxidase subunit 2                        | 27              | 4            | 24,6                                      | 25                     |
|      | Q09073           | ATP/ADP translocase 2                                 | 6               | 2            | 8   | 32                     |
| 11   | Q9ER34           | Aconitase hydratase                                   | 283             | 31           | 41,3                                      | 85                     |
| 12   | P06685           | Na/K-transporting ATPase subunit alpha 1 <sup>a</sup> | 132             | 26           | 31  | 112                    |
|      | P06687           | Na/K-transporting ATPase subunit alpha 3 <sup>a</sup> | 112             | 15           | 18  | 111                    |
|      | P06686           | Na/K-transporting ATPase subunit alpha 2 <sup>a</sup> | 101             | 24           | 23,5                                      | 112                    |

<sup>a</sup> Plasma and other membranes

**Fig. 1. Changes in protein tyrosine phosphorylation of rat brain mitochondria following exposure to ATP, PP2, PTP1Bi, or orthovanadate + NaF.**

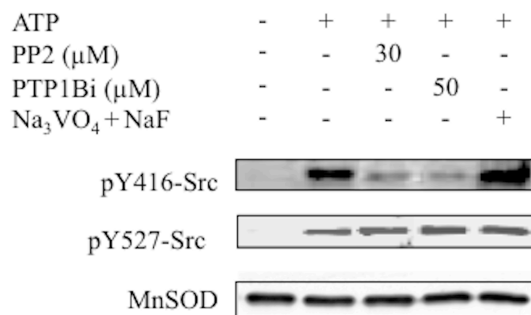
Mitochondria (50  $\mu$ g) were untreated (lane 1) or treated at 30°C for 10 min with 1 mM ATP alone (lane 2) or after pre-incubation at 30°C for 10 min with 30  $\mu$ M PP2 (lane 3), 50  $\mu$ M PTP1Bi (lane 4) or 2 mM orthovanadate plus 10 mM NaF (lane 5). The reaction was stopped by addition of 5X Laemmli buffer. Tyrosine-phosphorylated proteins on immunoblots were detected with an antibody to phosphotyrosine. The membrane was stripped and reprobed with an antibody to MnSOD as a loading control (below). Data are representative of at least three experiments.



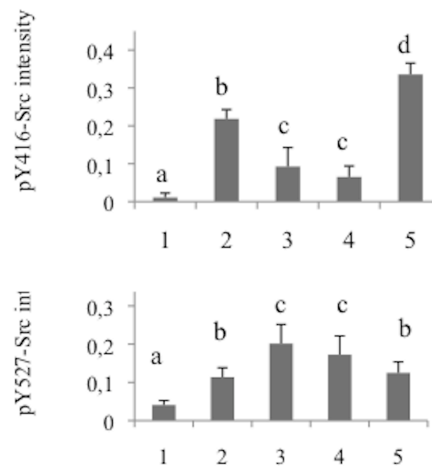
**Fig. 2. Phosphorylation status of mitochondrial Src in *in vitro* treatments.**

(A) Mitochondria, treated as described in the legend to Fig. 1, were western blotted and immunodetected first with the anti-pY416-Src antibody, stripped and reprobed with the anti-pY527-Src antibody, stripped again and finally probed with an antibody to MnSOD as a loading control. (B) The intensity of pY416-Src and pY527-Src labeling was normalized over the MnSOD signal for each treatment. Data are representative of at least three experiments. Means that are not significantly different, ( $p > 0.05$ ) according to the Tukey test, share superscripts.

**A**

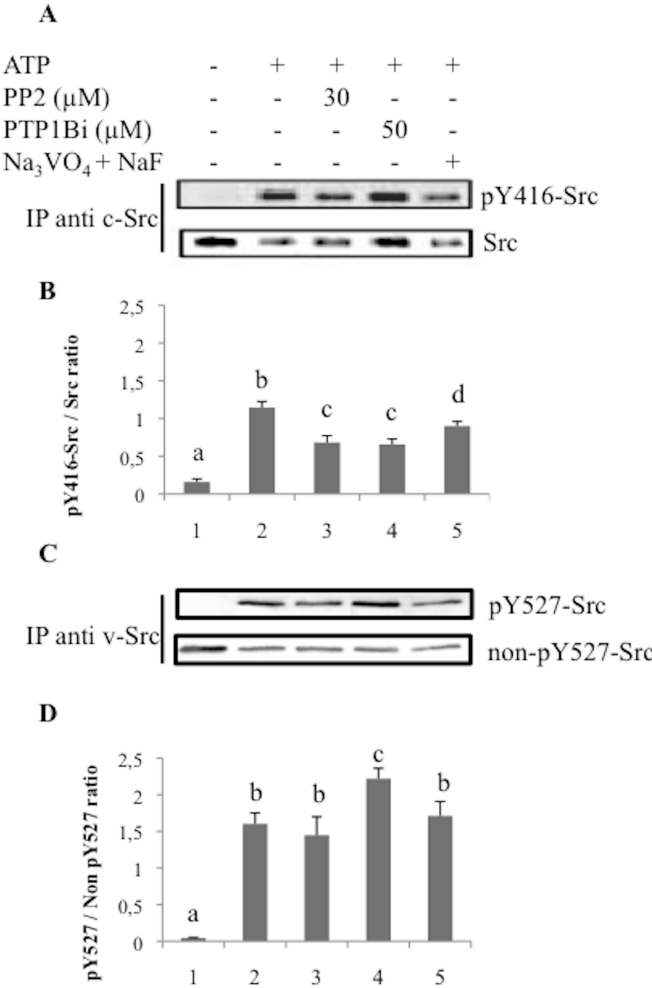


**B**



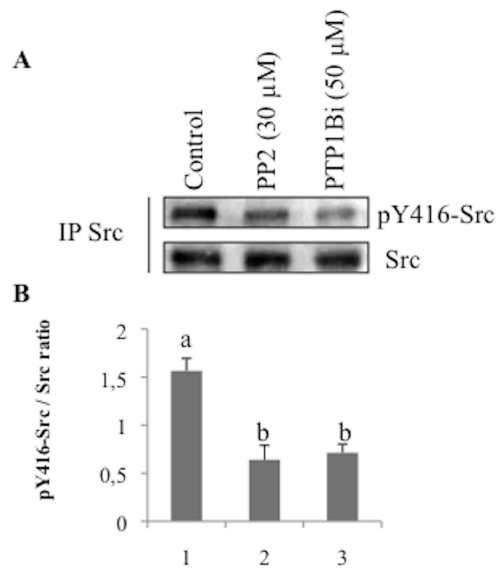
**Fig. 3. pY416-Src and pY527-Src labelings in immunoprecipitated Src from mitochondria in *in vitro* experiments.**

(A) Src was immunoprecipitated from mitochondria treated as described in the legend to Fig. 1, and immunoblotted first with the anti- pY416-Src antibody, stripped and reprobed with anti-Src antibody. (B) Normalizations of pY416-Src labeling versus Src signal. (C) For analysis of pY527-Src, Src was immunoprecipitated with an antibody to v-Src which recognizes an epitope in the SH3 region, and immunoblotted first with an antibody to pY527-src, stripped and reprobed with an antibody to non-pY527-Src (see Materials and Methods). (D) Normalizations of pY527-Src labeling versus non-pY527-Src signal. Data are representative of three experiments. Means that are not significantly different, ( $p > 0.05$ ) according to the Tukey test, share superscripts.



**Fig. 4. pY416-Src labeling in immunoprecipitated Src from oxygraphic assays.**

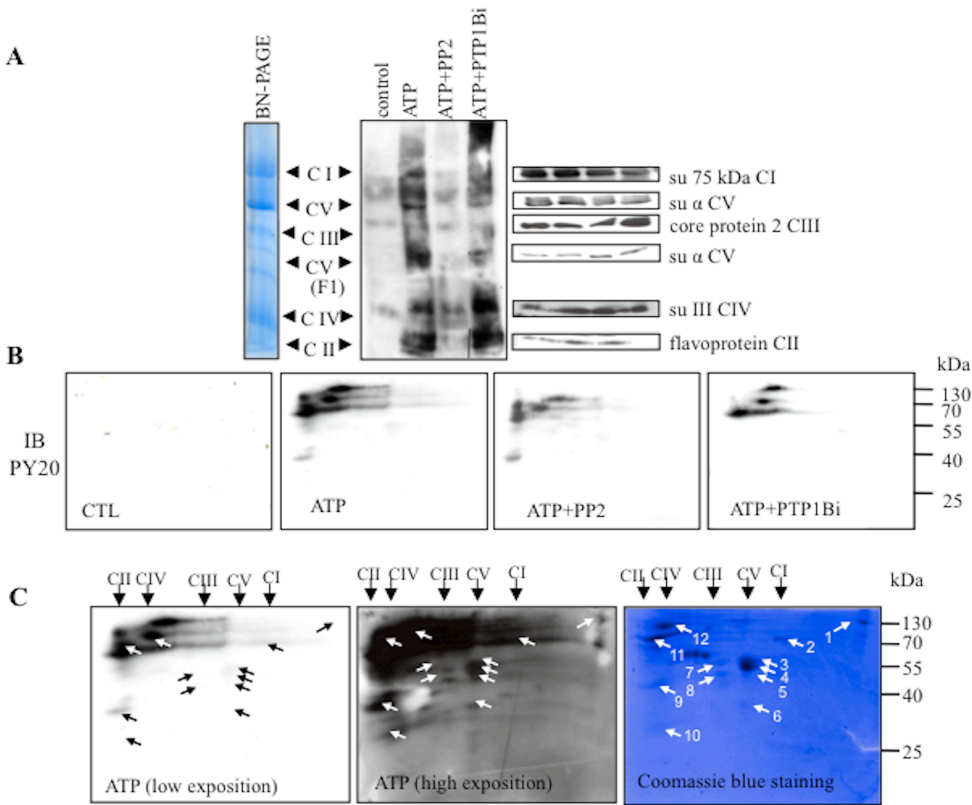
(A) Mitochondrial proteins were sampled from the oxygraphic chamber and immunoprecipitation of Src was immediately performed, as described in Materials and Methods. The phosphorylation status of Src was detected with the anti-pY416-Src antibody. The membrane was stripped and reprobred with anti-Src antibody. (B) The intensity of pY416-Src labeling was normalized over the Src signal for each treatment. Data are representative of three experiments. Means that are not significantly different, ( $p>0.05$ ) according to the Tukey test, share superscripts.





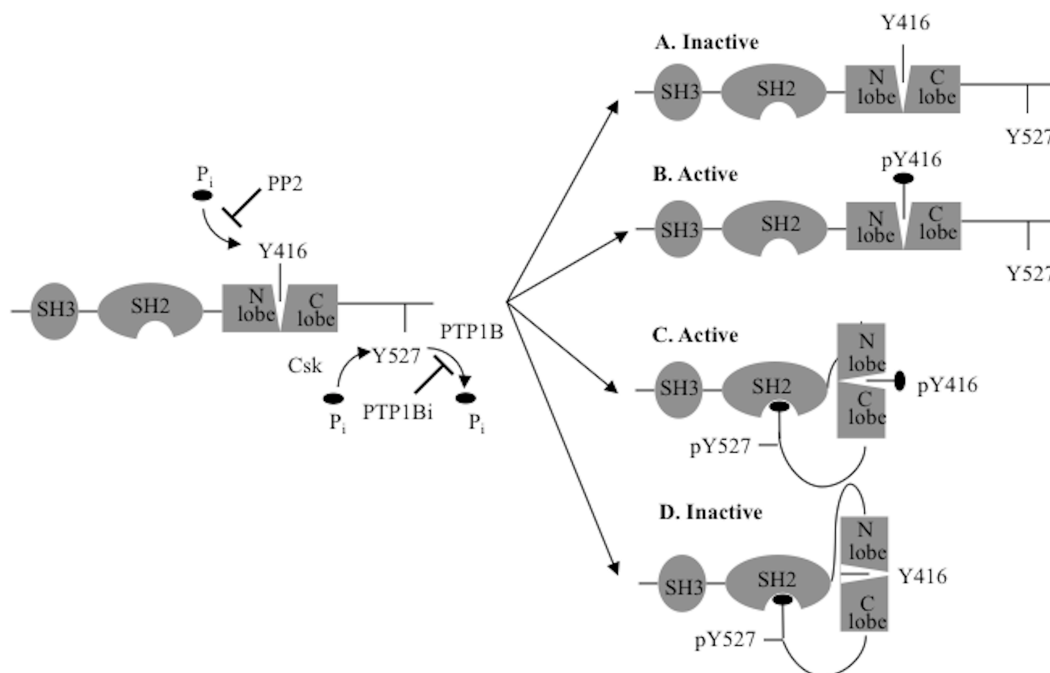
**Fig. 5. Identification of Src-dependent phosphorylation sites among mitochondrial proteins.**

Mitochondria were treated as described in the legend of Fig. 1. Proteins were then solubilized with n-dodecyl-maltoside (2.5 mg/mg protein) and 100 to 200 µg per lane were subjected to BN-PAGE (5-13%). (A): The BN-PAGE was directly transferred on PVDF membranes and tyrosine-phosphorylated proteins were detected with an antibody to phosphotyrosine (PY20). Membranes were then stripped and reprobed with antibodies against one subunit of each OxPhos complex. (B) Individual lanes corresponding to each treatment (CTL, ATP, ATP+PP2, ATP+PTP1Bi) were cut, soaked with 1% sodium dodecyl sulfate (w/v) and 1% (v/v) β-mercaptoethanol, and subjected to a second dimension SDS-PAGE (12.5%) for immunodetection of tyrosine phosphorylation. For each lane, one second dimension gel was kept for Coomassie blue staining. (C) Spots (arrows) detected both in the Coomassie blue stained gel and in the immunoblot corresponding to the ATP treatment were analyzed by LC-MS/MS. Data are representative of at least three experiments.



**Fig. 6. Phosphorylation sites and organization of Src kinase family.**

Src kinases possess a SH3 domain directing binding to specific adaptors or substrates, a SH2 domain containing a phosphotyrosyl-binding pocket and linked to the N lobe. The autocatalytic Y416 residue in C-lobe lies in a pocket between the two lobes. The two lobes can move and open or close the catalytic site. Src can be non-phosphorylated (A), phosphorylated on Y416 residue (B), phosphorylated on both Y416 and Y527 residues (C) and phosphorylated on Y527 residue. Our data showed that (A) was found in thawed, untreated mitochondria, (B) and (C) in ATP treated mitochondria, and (D) in PP2 and PTP1Bi treated mitochondria. ATP induced both autophosphorylation of Y416 residue and Csk-mediated phosphorylation of Y527 residue. PP2 blocks the ATP binding site in the catalytic domain of Src thus leading to inhibition of autophosphorylation, without preventing Csk-mediated phosphorylation of Y527. PTP1Bi blocks the ATP binding site in the catalytic domain of Src thus leading to inhibition of autophosphorylation, without preventing Csk-mediated phosphorylation of Y527. PTP1Bi inhibits PTP1B-mediated dephosphorylation of Y527 residue, leading to interaction of pY527 to the SH3 binding pocket, thus sequestering Y416 residue which cannot be phosphorylated.



### 3. Conclusion

#### 3.1. Analyse des résultats

Au cours de cette étude, nous avons démontré que la Src kinase pouvait être régulée par PTP1B directement dans la mitochondrie de cerveau chez le rat. Nous avons également identifiées plusieurs protéines mitochondriales pouvant être ciblées par la Src kinase. Enfin, nous avons examiné les impacts fonctionnels des phosphorylations induites par cette kinase sur les OXPHOS.

L'incubation des mitochondries avec l'ATP induit une augmentation importante des phosphotyrosines. Cette augmentation est encore plus importante lorsque des inhibiteurs de phosphatases sont ajoutés avec l'ATP. À l'inverse, l'inhibition de la Src par PP2 induit une diminution importante des phosphotyrosines. L'inhibition de PTP1B induit aussi une telle diminution des phosphotyrosines. Ces premiers résultats suggèrent donc que le principal rôle de PTP1B est bien la désactivation d'une kinase.

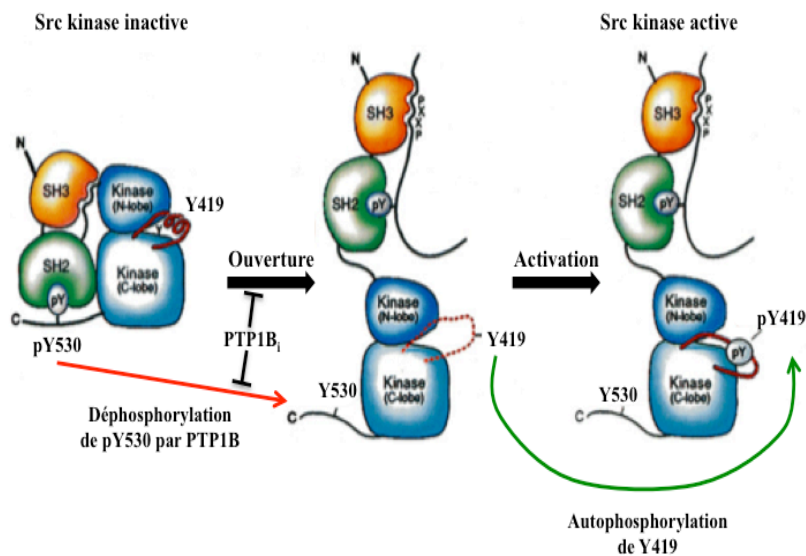


Figure 20. La régulation de la Src par PTP1B. En conditions basales, PTP1B peut déphosphoryler le résidu inhibiteur (Y530) et induire l'activation de la Src mitochondriale. Lorsque l'activité de PTP1B est inhibée, la Src ne peut donc être activée (Modifiée de Roskoski, 2005).

Pour vérifier si PTP1B pouvait bel et bien réguler l'activité de la Src mitochondriale, nous avons ensuite examiné l'état de phosphorylation des résidus activateur (pY419) et inhibiteur (pY530) selon l'activation ou l'inactivation de la Src. Lorsque la Src est activée, on

observe une augmentation de la phosphorylation des deux résidus, le pY419 et le pY530. Lorsque la Src est directement inhibée par PP2, on observe une diminution de la phosphorylation du résidu activateur. Lorsque PTP1B est inhibée, on remarque aussi une diminution de la phosphorylation du résidu activateur, mais aussi une augmentation de la phosphorylation du résidu inhibiteur, le pY530. Ces résultats démontrent clairement que PTP1B peut activer la Src via la déphosphorylation du résidu inhibiteur (**Figure 20**). Cette étude est donc très importante car elle est une des premières à démontrer l'existence d'une voie de régulation intramitochondriale de la Src.

Plusieurs protéines mitochondriales semblent être ciblées par la Src kinase. En fait, dans les mitochondries de cerveau du rat, la Src semble être apte à moduler l'activité de chaque complexe du STE : la sous-unité de 75 kDa du complexe I, les sous-unités 1 et 2 du complexe III, la sous-unité II du complexe IV et les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  du complexe V semblent tous phosphorylées par la Src kinase. La phosphorylation de ces différentes sous-unités mène à des effets différents sur la capacité des enzymes. Alors que l'activation de la Src (et donc la phosphorylation des sous-unités correspondantes) diminue les activités des complexes I, III et V, elle augmente les capacités du complexe IV. Sachant que l'inhibition de la Src induit une diminution de la respiration dans les mitochondries de cerveau chez le rat, il semble que la Src y stimule principalement la respiration mitochondriale par la phosphorylation de la sous-unité II du complexe IV, tout comme dans les ostéoclastes (Miyazaki *et al.*, 2003). À l'inverse, la Src pourrait au contraire induire des diminutions de respiration, en phosphorylant les sous-unités des complexes I, III et V, sous certaines conditions. La Src kinase apparaît donc comme un régulateur important du métabolisme mitochondrial, pouvant stimuler ou diminuer les capacités enzymatiques de plusieurs protéines participant aux OXPHOS (enzymes du cycle de Krebs et enzymes du STE).

L'inhibition de PTP1B empêche la déphosphorylation du résidu inhibiteur et donc l'activation de la Src. Cette inhibition permet donc de renverser tous les impacts dus à l'activation de la Src. Il existe cependant quelques différences au niveau des impacts fonctionnels lorsque la Src est inactivée directement ou via l'inhibition de PTP1B, suggérant que PTP1B pourraient réguler les OXPHOS via la déphosphorylation d'autres protéines que la Src. Les techniques utilisées n'ont cependant pas permis d'identifier quelles pourraient être ces cibles.

### 3.2. Perspectives

Les résultats du premier chapitre suggèrent donc que PTP1B pourrait avoir des effets directs sur la mitochondrie. En effet, la diminution de la respiration est plus importante lorsque PTP1B est inhibée que lorsque la Src est directement inhibée (par PP2). De plus, l'inhibition de PTP1B renverse les changements d'activité enzymatiques, dus à l'activation de la Src kinase, des complexes I, IV et V. Cependant, l'inactivation de PTP1B ne renverse pas les activités du complexe III. Ces derniers résultats suggèrent donc que PTP1B pourrait déphosphoryler d'autres protéines mitochondriales et ainsi réguler les OXPHOS sans la Src kinase. La majorité des études s'intéressant aux processus de phosphorylation dans les mitochondries tentent d'identifier les kinases et leur(s) site(s) de phosphorylations. Or, la déphosphorylation des protéines mitochondriales peut aussi jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme mitochondrial. En conditions basales, il existerait plusieurs sites d'autophosphorylation (*i.e.* phosphorylation indépendante de la présence de kinases) parmi les complexes du STE (Phillips *et al.*, 2011). La déphosphorylation de ces protéines pourrait donc jouer un rôle majeur dans la régulation des OXPHOS. De plus, la déphosphorylation du complexe IV abolit la capacité de ce complexe à se lier avec l'ATP (Kadenbach *et al.*, 2010). Sachant que la liaison de l'ATP au complexe IV induit une diminution des activités de ce complexe, ce processus de déphosphorylation constituerait donc une voie importante de régulation de la production énergétique par la mitochondrie, mais aussi de la production de ROS. SHP-2, qui peut aussi induire l'activation de la Src kinase, a aussi été observée dans les mitochondries de cerveau chez le rat (Salvi *et al.*, 2004). Une mutation au niveau du gène codant pour cette tyrosine-phosphatase, causant une suractivation de l'enzyme, peut provoquer le syndrome de Noonan, le syndrome de LEOPARD et des leucémies (Keilhack *et al.*, 2005). Chez des patients souffrant du syndrome de Noonan, l'activité et l'expression de la cytochrome *c* oxydase sont fortement diminuées tout comme la production d'ATP alors que le stress oxydant se trouve augmenté chez ces patients (Lee *et al.*, 2010). Ces différentes études suggèrent donc que les phosphatases sont aussi d'importants régulateurs des fonctions mitochondriales.

L'identification des différentes cibles des phosphatases mitochondriales (telles que PTP1B et SHP2) dans les mitochondries de cerveau chez le rat et de leur(s) impact(s) fonctionnel(s) semblent donc essentiels à une meilleure compréhension des processus de régulation du métabolisme mitochondrial.

## IV. CHAPITRE 2

### 1. Introduction

Les processus de régulation du métabolisme optimisent la production d'ATP par les OXPHOS dans les cellules saines. Inversement, il semble que les cellules hautement prolifératives, telles que les cellules cancéreuses et embryonnaires, sont davantage glycolytiques (Warburg *et al.*, 1927; Warburg, 1956). On a d'abord cru que cet effet Warburg était causé parce que les mitochondries de ces tissus étaient dysfonctionnelles. Il apparaît aujourd'hui que les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme énergétique suite à l'activation de plusieurs oncogènes. Par exemple, la stabilisation de HIF1- $\alpha$  induit une plus grande expression des transporteurs de glucose et de certaines enzymes de la glycolyse, ainsi qu'une diminution des capacités de la pyruvate déshydrogénase (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006). Toutes ces modifications induisent donc un changement du métabolisme: la majorité de l'énergie est produite par la glycolyse et peu de substrats entrent dans la mitochondrie (Semenza, 2007). Même si elle ne produit plus beaucoup d'énergie, celle-ci reste cependant essentielle aux cellules cancéreuses car elle constitue, notamment, une composante importante des voies biosynthétiques. La production *de novo* des lipides, acides aminés et acides nucléiques utilise effectivement des précurseurs formés au niveau du cycle de Krebs (Hatzivassiliou *et al.*, 2005).

La Src kinase, surexprimée dans plusieurs types de cancer, est impliquée dans plusieurs processus physiologiques caractéristiques des cellules cancéreuses: des augmentations importantes de la survie cellulaire, des capacités de prolifération, de migrations et des propriétés métastatiques (Yeatman, 2004; Guarino, 2010). L'activation de la Src peut aussi induire la stabilisation de HIF1- $\alpha$  et une augmentation du métabolisme glycolytique (Karni *et al.*, 2002). D'un autre côté, plusieurs études ont démontré que la Src kinase pouvait être ciblée vers la mitochondrie où elle régule le métabolisme mitochondrial par phosphorylation des complexes du STE. Par exemple, la Src induit la phosphorylation de la sous-unité II du complexe IV, augmentant les capacités de cette enzyme (Miyazaki *et al.*, 2003). Quelques études ont aussi montré que la Src est présente dans mitochondrie de cerveau du rat (Salvi *et al.*, 2002), où elle peut phosphoryler plusieurs protéines (Hebert Chatelain *et al.*, 2010). Ces phosphorylations peuvent induire des changements de respiration mitochondriale, mais aussi des capacités enzymatiques de chaque complexe du STE (Arachiche *et al.*, 2008; Hebert

Chatelain *et al.*, 2010). On ne sait toutefois toujours pas si la Src kinase peut influencer le métabolisme mitochondrial et les OXPHOS dans les cellules cancéreuses.

Le but principal de cette étude était de vérifier si la Src kinase peut influencer le métabolisme mitochondrial dans différentes lignées cancéreuses, où la Src est suractivée.

## 2. Article 2

### **PRESERVATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN CANCER CELLS THROUGH MEMBRANE POTENTIAL: PHOSPHORYLATION OF NDUFB10 BY Src KINASE**

**Etienne Hébert-Chatelain<sup>a</sup>, Caroline Jose<sup>a</sup>, Nicolas Gutierrez Cortes<sup>a</sup>, Jean-William Dupuy<sup>b</sup>, Christophe Rocher<sup>a</sup>, Jeanne Dachary-Prigent<sup>a</sup> and Thierry Letellier<sup>a</sup>.**

From INSERM-U688 Physiopathologie mitochondriale<sup>a</sup>, Pôle protéomique du Centre de Génomique Fonctionnelle<sup>b</sup>,

Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, 33076 France

Running head: Src kinase in mitochondria of cancer cells

Address correspondence to: Thierry Letellier, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, 33076, France. Fax: 05 57 57 16 12. Email : [thierry.letellier@u-bordeaux2.fr](mailto:thierry.letellier@u-bordeaux2.fr)

Cet article a été soumis pour publication dans *The Journal of Biological Chemistry*, le 2 Juin 2011.



## 2.1. ABSTRACT

The tyrosine Src kinase is upregulated in several cancer cells. In such cells, there is a metabolic reprogramming elevating aerobic glycolysis that seems partly dependent of Src activation. Src kinase was recently shown to be targeted to mitochondria where it modulate mitochondrial bioenergetics in non-proliferative tissues and cells. The main goal of our study was to determine if the increased Src kinase activity could also influence mitochondrial metabolism in cancer cells (143B and DU145 cells). We have shown that 143B and DU145 cells produce most of ATP through glycolysis but also that inhibition of OXPHOS led to an important decrease of proliferation which was not due to a decrease in total ATP levels. These results evidence that mitochondria in cancer cells could be more important for ensuring other mitochondrial function than ATP production. This study is the first to show a putative role of intramitochondrial Src kinase on the oxidative phosphorylation in cancer cells. Indeed, we have shown that Src kinase inhibition led to a decrease of mitochondrial respiration via a specific decrease of complex I activities (NADH - ubiquinone oxidoreductase). This decrease is associated with a lower phosphorylation of complex I subunit NDUFB10. Inhibition of Src kinase also led to lower mitochondrial membrane potential. These results suggest that Src kinase participate in the elaboration of the overall phenotype of cancer cells partly by maintaining mitochondrial metabolism.

## 2.2. INTRODUCTION

While differentiated cells rely mainly on oxidative phosphorylation (OXPHOS) to produce ATP, cancer cells are generally seen as highly glycolytic cells because they produce large amount of lactate regardless of oxygen availability (Warburg, 1956; Schmidt *et al.*, 1991). Otto Warburg initially explained this high aerobic glycolysis by a defect of OXPHOS (Warburg *et al.*, 1927; Warburg, 1956). It is now accepted that cancer cells may reprogram their metabolism in this way to sustain a high proliferative phenotype. For example, the stabilization of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) induces a switch of energy metabolism from mitochondrial to glycolytic, including up-regulation of glucose transporters and glycolytic enzymes as well as inhibition of pyruvate dehydrogenase (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006). However, even if mitochondria become a minor ATP producer (Semenza, 2007), they are still essential since most lipid, protein and nucleic acid biosynthetic

machineries use precursors derived from the TCA cycle in proliferative cells (Hatzivassiliou *et al.*, 2005). Therefore, mitochondrial regulation pathways could be devoted to preserve functionality of mitochondria without important utilization of OXPHOS.

The tyrosine Src kinase, which is overexpressed or up-regulated in several cancer cells is implicated in several physiological processes such as increased cell survival, proliferation and metastatic properties (Yeatman, 2004; Wheeler *et al.*, 2009; Guarino, 2010). Src activation can also induce the remodeling of energetic metabolism via stabilization of HIF1- $\alpha$  and increased activities of several glycolytic enzymes (Karni *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005). On the other hand, recent papers had shown that Src kinase could be targeted to mitochondria where it modulates OXPHOS. Indeed, Src kinase phosphorylates cytochrome *c* oxydase (complex IV) subunit II in osteoclasts, resulting in activation of the enzyme (Miyazaki *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2006). Src and Lck-mediated phosphorylation of Y190 and Y194 in adenine nucleotide translocase were shown to be involved in its carrier function and in respiration of yeast (Feng *et al.*, 2010). Enzymatic activity of ATP synthase (complex V) is decreased by Src-dependent phosphorylation while activity of complex IV is increased with Src activation in rat brain mitochondria (Arachiche *et al.*, 2008; Hebert Chatelain *et al.*, 2010). However, the possible implication of Src kinase in the regulation of mitochondrial metabolism in cancer cells still need to be established.

Since Src kinase is highly activated in several cancer cells, the main goal of our study was to determine if Src kinase activity could influence mitochondrial metabolism in such cells. First, we showed that 143B and DU145 cells produce most of ATP through glycolysis but also that inhibition of OXPHOS led to an important decrease of proliferation which was not due to decrease in total ATP level. We then demonstrated intramitochondrial localization of Src kinase in 143B and DU145 cell lines. By using two different specific Src inhibitors: PP2 and SU6656, we showed that inhibition of Src kinase leads to a specific decrease of mitochondrial respiration and complex I enzymatic activities, probably via lower phosphorylation of complex I subunit NDUFB10. Inhibition of Src kinase also led to lower mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), suggesting that Src kinase may be involved in the maintenance of mitochondrial functions important for proliferative properties of cancer cells other than energy production.

### 2.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Chemicals-* The mouse monoclonal antibody to phosphotyrosine (PY20), the mouse monoclonal antibody to c-Src, the mouse monoclonal antibody to LAMP-2, the rabbit polyclonal antibody to calregulin and the mouse monoclonal antibody to Bcl-2 were bought from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies to phosphorylated Src species (PY419-Src) were bought from Cell Signaling. Src kinase inhibitors PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) and SU6656 were from Calbiochem. All antibodies against OxPhos complexes (except NDUFB10 bought from Abcam) were bought from Mitosciences. Protease and phosphatase cocktail inhibitors were bought from Roche. All other chemicals were from Sigma.

*Cell culture-* The human osteosarcoma cell line 143B TK- and the human prostate cancer cell line DU145 were maintained in culture with high glucose (4,5 g L<sup>-1</sup>) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate and 10 % (v/v) fetal bovine serum. 143B and DU145 cells were also grown in galactose medium, which consisted of DMEM without glucose, supplemented with 10 mM galactose, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 10 % fetal bovine serum. Cells grown in glucose DMEM will be referred as 143B glu and DU145 glu while cells grown in galactose will be referred as 143B gal and DU145 gal. All cells were maintained in their respective medium during at least 5 passages before beginning analysis. All cells were kept in a 10 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C and medium was renewed every 2 to 3 days. Analysis and cell harvesting were always performed when confluency was about 80-90 %.

*Isolation of mitochondrial-enriched fractions-* Cells were harvested, resuspended in isolation buffer (250 mM sucrose, 1mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing protease and phosphatase inhibitors cocktails and disrupted through 25 strokes with 25G syringe. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation at 400 g during 5 min. (4°C). The supernatant was kept and was centrifuged at 10000 g for 10 min. (4°C). The supernatant obtained during this step was considered as the cytosolic fractions (post-mitochondrial supernatant). The pellet was then resuspended and the cycle of centrifugation was repeated. Then, the last pellet obtained was considered as the mitochondrial fraction (mitochondrial-enriched fraction). Cytosolic contamination was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activities in total cell lysate (TCL) and mitochondrial fractions. LDH activity measurements revealed poor cytosolic contamination as LDH activity in

mitochondrial fractions represented only  $1.42 \pm 0.55$  % of TCL LDH activity ( $n = 8$ ). Moreover, immunodetection of  $\beta$ -tubulin among total cell lysate and mitochondrial fractions showed no signal for the cytosolic protein in mitochondrial fractions (data not shown). Those preliminary experiments clearly minimized the possibility of cytosolic Src contamination in mitochondrial fractions.

*Oxygraphic measurements-* Mitochondrial oxygen consumption assays were performed using the high-resolution respirometry system Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Austria). Cell respiration was measured at  $5 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$  according to volume-specific flux at  $37^\circ\text{C}$  in 2 ml chambers at a stirring rate of 750 rpm. Firstly, three different states of endogenous respiration with intact cells were measured: (i) basal respiration representing the endogenous physiological coupled state, (ii) respiration with oligomycin ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) representing non-coupled resting respiration and (iii) maximal uncoupled respiration induced by CCCP ( $0.5 \mu\text{M}$  steps with  $2 \mu\text{M}$  final concentration) providing a measure of maximal capacity of ETS under conditions of physiological substrate supply in the intact cell.

Respiration was also measured in cells permeabilized with digitonine ( $0.3 \mu\text{g}/10^6$  cells) in respiration buffer (75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 100 mM KCl, 10 mM Tris-phosphate, 10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 7.4). Using this respiration buffer allowed to lower digitonine concentrations for sufficient permeabilization and decreased the possibility of loss of integrity of mitochondrial membranes. Digitonine amount was selected to achieve a maximal increase of respiration with rotenone-succinate-ADP substrates without further stimulation by addition of cytochrome *c* (data not shown). Notably, basal  $\text{O}_2$  consumption measured in respiration buffer (143B glu:  $34.56 \pm 15.06 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^{-6}$  cells; DU145:  $57.22 \pm 30.96 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^{-6}$  cells; 143B gal:  $25.53 \pm 9.37 \text{ pmol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^{-6}$  cells) was not different from respiration measured in DMEM ( $p > 0.05$ ). Complex I-driven state 3 respiration (St3 PMD) was measuring with pyruvate (5 mM), malate (2 mM) and ADP (5 mM). Complex II-driven state 3 respiration (St3 SD) was measuring with rotenone ( $0.5 \mu\text{M}$ ), succinate (10 mM) and ADP (5 mM).

*Identification of Src target in complex I-* Mitochondrial fractions were incubated with ATP without or with PP2 ( $20 \mu\text{M}$ ), as in (Augereau *et al.*, 2005; Arachiche *et al.*, 2008; Hebert Chatelain *et al.*, 2010). Treated samples were incubated overnight with complex I-agarose beads conjugated (Mitosciences, OR), then eluted with glycine buffer and samples were finally processed for western blotting, as in Augereau *et al.* Phosphotyrosines were then

immunodetected using PY20 antibody. Tyrosine-phosphorylated complex I subunit was identified by determining peptides present in the spot showing phosphotyrosine signal. The spot of interest was digested by trypsin as indicated in (Pocaly *et al.*, 2008). Peptides were further analyzed by nano liquid chromatography coupled to a MS/MS LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer, as detailed in (Hebert Chatelain *et al.*, 2010).

*Measurements of mitochondrial membrane potential and ROS levels-* After treatment, cells were harvested. Then,  $5 \times 10^5$  cells were incubate for 10 min. at 37°C with 50 nM tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM), 50 nM CM-H<sub>2</sub>DCFDA or 50 nM MitoSox (Invitrogen, USA). Fluorescence of each probes was read as manufacturer's recommendation on a spectrofluorometer (SAFAS).

*Gel Electrophoresis and Western Blotting-* Samples were subjected to SDS-PAGE (10 or 12.5%) and separated proteins were transferred onto a nitrocellulose or PVDF membranes as already described (Augereau *et al.*, 2005). Primary antibodies were revealed with horseradish peroxidase-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat IgG, F(ab')<sub>2</sub> fragment-specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Blots were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) Plus from Amersham. Labelings were quantified by densitometric analysis using Image J (NIH) software.

*Statistical analysis-* Student's T test was used to compare means with control values using Excel software (12.2.8). Significance was assessed at the 0.05 (or lower) level for all tests.

## **2.4. RESULTS**

*Mitochondria seem important in cancer cells for other function(s) than energy production.* Glycolytic- and mitochondrial-dependent steady-state ATP levels were measured in 143B and DU145 cells grown in glucose or galactose DMEM, as in (Jose *et al.*, 2010). When 143B and DU145 cells were maintained in glucose DMEM, mitochondrial ATP production represented about 10 % of total ATP levels, while this mitochondrial ATP production was increased to approximately 50 % for 143B cells and 75 % for DU145 cells maintained in galactose medium (Fig. 1A).

Proliferation capacities of 143B and DU145 cells grown in glucose DMEM supplemented with increasing doses of OXPHOS inhibitors during 5 days were then evaluated by trypan blue staining. As mitochondria produce as little as 10% of total ATP in 143B and DU145 cells (Fig. 1A), we expected inhibition of mitochondrial ATP production to have little or no impact on proliferation. Interestingly, treatment of cells with rotenone or oligomycin during 5 days decreased proliferative capacity by more than 50 % (Fig. 1B and C). As seen in Figure 1D, total ATP levels were not changed when OXPHOS was inhibited by rotenone during 5 days, showing that the reduction of proliferation was not due to a decline of ATP production. These first results suggest that mitochondria of cancer cells could be more important for ensuring other mitochondrial function(s) than preserving ATP production. We then examined if Src kinase could participate in the maintenance of such mitochondrial function(s) in cancer cells such as 143B and DU145.

*A fraction of Src kinase locates to mitochondria of 143B and DU145 cells.* Fractionation of DU145 cells on a sucrose gradient revealed that only Src kinase and mitochondria, as shown by the labeling of 70 kDa subunit of succinate-coenzyme Q reductase (complex II), were present in fraction 6 and 7 (Fig. 2A), suggesting that this kinase could be located to mitochondria. Src kinase was also present in fractions where lysosome and endoplasmic reticulum were observed. Similar Src kinase localization after sucrose gradient was observed in 143B cells (data not shown).

To examine the topological features of Src in mitochondria, we performed trypsin protection assays in the presence or absence of the detergent Triton X-100 using fractions 6 and 7 of both cell types. Indeed, any protein not imbedded within the organelle is available to trypsin cleavage while mitochondrial membranes protect intramitochondrial proteins from protease activity. As shown in figure 2B, the subunit I of Complex IV, which is located at the level of mitochondrial inner membrane, is protected from trypsin digestion in the absence of detergent whereas Bcl 2, an antiapoptotic protein associated with the outer membrane, is completely degraded by trypsin regardless of the presence of Triton X-100. The resistance of Src to trypsin proteolysis in the absence of detergent suggests that Src kinase is located within the mitochondria of 143B and DU145 cells (Fig. 2B).

*Impact of Src kinase activity on mitochondrial bioenergetics of 143B and DU145 cells.* The activity of Src kinase in mitochondria was then studied by analyzing the tyrosine phosphorylation status of mitochondrial proteins in the presence of PP2, a specific Src

inhibitor (Augereau *et al.*, 2005; Hebert Chatelain *et al.*, 2010). Incubation of mitochondrial fractions with ATP increased the level of tyrosine-phosphorylated proteins as compared to non-treated mitochondria (Fig. 2C, lane 2). The intensity of phosphotyrosine signal diminished with increasing inhibition of Src activity by PP2 (Fig. 2C, lane 3-5), showing that Src kinase is an important player in total mitochondrial tyrosine phosphorylation activity in 143B and DU145 cells.

To determine if the inhibition of Src kinase could influence mitochondrial metabolism, we incubated 143B and DU145 cells with two specific and structurally non-related Src kinase inhibitors, PP2 (Bain *et al.*, 2003) and SU6656 (Blake *et al.*, 2000), during 4 hours. The treatment of both cells lines with 5  $\mu$ M PP2 or 10  $\mu$ M SU6656 did not affect cell viability (143B control cells:  $100.0 \pm 11.0$  %; 143B PP2-treated cells:  $98.5 \pm 14.4$ %,  $p > 0.05$ ; 143B SU6656-treated cells:  $108.8 \pm 6.2$  %,  $p > 0.05$ ; DU145 control cells:  $100.0 \pm 9.5$  %; DU145 PP2-treated cells:  $96.0 \pm 28.8$  %,  $p > 0.05$ ; DU145 SU6656-treated cells:  $121.2 \pm 18.9$  %,  $p > 0.05$ ;  $n=5$ ) according to the neutral red assay (Smolkova *et al.*, 2010).

After treatment with Src inhibitors, Src activation was evaluated by immunodetection of phosphorylated Y419 residue of Src (PY419-Src). As shown in figure 3A, Src activation in mitochondrial fractions isolated from 143B and DU145 cells was significantly reduced as compared to untreated cells, without influencing the amount of total Src kinase.

Different steps of mitochondrial respiration (basal respiration, oligomycin respiration and uncoupled respiration) were measured in intact cells. Basal and uncoupled respirations were significantly higher ( $p < 0.05$ ) for cells maintained in galactose DMEM as compared to cells maintained in glucose medium (Table 1). Oligomycin respiration was similar ( $p > 0.05$ ) between both culture conditions (Table 1). These results are consistent with the Crabtree effect observed in cancer cells: in high glucose medium, minimum level of OXPHOS substrates enters into mitochondria, explaining why mitochondrial ATP production and respiration are lower than in galactose medium. Crabtree effect can be circumvented by using galactose DMEM. Galactose is not oxidized via glycolysis forcing cells to use glutamine and subsequent mitochondrial-dependent ATP production (Reitzer *et al.*, 1979; Rossignol *et al.*, 2004; Smolkova *et al.*, 2010). These results also demonstrate that mitochondria are not impaired *per se* in 143B and DU145 cells.

After PP2 and SU6656 treatments, basal and uncoupled respiration significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in each cell lines (Fig. 3B and C). The same decrease of respiration was observed in both glucose and galactose DMEM for 143B and DU145 cells, indicating that Src influence on respiration does not depend on the bioenergetic phenotype. The O<sub>2</sub> consumption reduction during uncoupled respiration suggests that Src kinase may modulate OXPHOS via one component of the ETS. To determine which ETS complexes were targeted by Src kinase, ADP-stimulated respiration was measured by using different respiratory substrates (pyruvate-malate or succinate) in permeabilized cells. Src inhibition induced a clear decrease of mitochondrial respiration when ETS was feed with complex I substrates but no effect was noted with the substrate of complex II (Fig. 4A and B). These results suggests that Src kinase influence OXPHOS mainly via the complex I.

Complex I enzymatic activity was also strongly decreased in cells treated with the inhibitors (Fig. 4B). In contrast, no significant effect was observed for complex II, III and IV activities in treated cells (Fig. 4B). Globally, these results show that Src kinase regulates bioenergetics of 143B and DU145 cells mainly via complex I activity.

Citrate synthase activity, which is a reliable marker of mitochondrial content (Benard *et al.*, 2006), was not changed in treated cells (Fig. 4B), showing no change in mitochondrial content. Analysis by western blotting of NDUFS2 and COXII as markers respectively of complex I and complex IV showed that the level of both complexes was not affected by treatments (Fig. 4C). Moreover, BN-PAGE analyses showed that native complex I amount did not changed after Src inhibition in both cell lines (data not shown), suggesting no impairment of complex I assembly.

*Identification of Src-mediated phosphorylation site in complex I.* Lower complex I activities could not be explained by lower protein content, suggesting that its enzymatic activities were affected through post-translational modifications. In order to identify which subunit of complex I was differentially targeted by Src kinase among treatments, complex I was immunoprecipitated from mitochondrial fractions of 143B and DU145 cells that were preincubated with ATP in presence or absence of PP2, and analysed by western blotting. As shown in figure 5, a tyrosine-phosphorylated band of about 20 kDa was observed after incubation with ATP and not (or to a lower intensity) when Src kinase was inhibited by PP2. Mass spectrometry identified this band as NDUFB10 (Table 2) and the phosphorylated protein was further confirmed by immunoblotting with an antibody to NDUFB10 (Fig. 5).



Therefore, Src kinase seems to sustain mitochondrial respiration by phosphorylating the NDUFB10 subunit of complex I.

*Other mitochondrial parameters influenced by Src inhibition.* Because mitochondrial ATP production does not seem the most important player for proliferation of 143B and DU145 cells, Src kinase-mediated maintenance of mitochondrial respiration should be related to other mitochondrial function(s). Complex I inhibition being known to increase ROS levels (Selivanov *et al.*, 2008; Fato *et al.*, 2009), we evaluated ROS levels after treatment with Src inhibitors with CM-H<sub>2</sub>DCFDA and MitoSox probes (Fig. 6A and B). As no difference of these fluorescence probes was noted among treatment, it seems that Src kinase did not influence ROS production, at least in our experimental conditions. Since the inhibition of complex I can also reduce the mitochondrial membrane potential (Benard *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010), we then measured TMRM fluorescence. Accordingly with increased OXPHOS utilization in galactose DMEM, TMRM signal was more important in galactose-grown control cells than in glucose-grown control cells. This result could be in accordance with an increase of mitochondrial content (Rossignol *et al.*, 2004) and consistent with the increase of respiration in galactose medium as compared to glucose medium (see Table 1). Src inhibition treatments induced a clear decline of TMRM fluorescence in 143B gal and DU145 gal, but not in 143B glu DU145 glu (Fig. 6C). These results clearly suggest that Src kinase-mediated phosphorylation of NDUFB10 maintain the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), at least when cells are maintained in galactose medium.

## 2.5. DISCUSSION

Several cancer cells and tumors exhibit increased aerobic glycolysis, which is known as the Warburg effect (Warburg *et al.*, 1927; Warburg, 1956). Modifications of mitochondria had also been observed: decrease of mitochondrial biogenesis (Isidoro *et al.*, 2004), alteration of ETS complexes activities (Simonnet *et al.*, 2003), truncation of TCA cycle with citrate efflux (Hatzivassiliou *et al.*, 2005), increase binding of hexokinase II to mitochondria (Bustamante *et al.*, 1981; Wallace, 2005), changes in the shape and size of mitochondria (Arismendi-Morillo et Castellano-Ramirez, 2008) and accumulation of mutations in mitochondrial DNA (for recent reviews, see Brandon *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006). All these changes lead to increased glycolytic ATP production and lower mitochondrial ATP

production as we observed for 143B and DU145 cells where ATP was mostly produced (approximately 90 %) by glycolysis. Despite this low mitochondrial energetic production in glycolytic cells, inhibition of OXPHOS can lead to important decrease of proliferation, as we observed for 143B and DU145 cells (Fig. 1). Interestingly, most of the precursors that are used by biosynthesis pathways are produced by the TCA cycle. For example, most of citrate is exported out of mitochondria and used for *de novo* fatty acid synthesis in cancer cells. Increased glutamine uptake and mitochondrial glutamine catabolism exhibited by cancer cells also allows higher biosynthesis rates as well as production of intermediates of the TCA cycle to maintain the mitochondrial membrane potential (Bode *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2008). Therefore, the mitochondrial metabolism is essential to sustain the high proliferative phenotype of cancer cells, as we observed in 143B and DU145 cells. Indeed, depletion of mitochondrial DNA and OXPHOS in different cancer cell lines can induce lower tumorigenic properties and metastatic potential, both *in vitro* and *in vivo* (Yu *et al.*, 2007; Berridge et Tan, 2010).

Src-dependent tyrosine phosphorylation of mitochondrial proteins increases concomitantly with stimuli triggering cell proliferation in neuroblastoma cells (Tibaldi *et al.*, 2008). According to our results, we propose that the increase of Src kinase activity is important for the proliferative phenotype of cancer cells via its effect on complex I. Our study showed that Src kinase is present within mitochondria of 143B and DU145 cells where it plays a major role in *in vitro* tyrosine phosphorylation. Inhibition of Src kinase in 143B and DU145 cells led to inhibition of complex I dependent respiration but no effect was observed with complex II substrates. This decrease of respiration was shown to be due to a specific decrease of complex I enzymatic capacities (Fig. 3), which was probably explained by lower Src-dependent phosphorylation of NDUFB10 subunit (Fig. 4). As the main role of mitochondria is not ATP production in these cells, Src kinase mediated increase of complex I activity and respiration should be related to other mitochondrial functions.

Inhibition of Src kinase induced a clear decrease of mitochondrial membrane potential in 143B gal and DU145 gal but not in cells maintained in high glucose medium (Fig. 6). TMRM signals were lower in cells cultured in glucose medium than in cells cultivated in galactose medium. It is possible that decline of  $\Delta\Psi$  in 143B glu and DU145 glu was not detected because their TMRM values were close to the lower limit of detection of  $\Delta\Psi$  by TMRM. Indeed, amount of functional mitochondria appear lower in glucose DMEM. Therefore, by inducing the phosphorylation of NDUFB10, Src kinase allows the maintenance of the

mitochondrial membrane potential. Most mitochondrial functions as, for example import of proteins into or across the mitochondrial inner membrane, require sufficient  $\Delta\Psi$  (Schleyer et Neupert, 1985; Martin *et al.*, 1991; Geissler *et al.*, 2000). Thus, the preservation of  $\Delta\Psi$  via Src could maintain adequate importation of mitochondrial proteins (such as TCA cycle enzymes) into mitochondria, enabling biosynthesis and proliferation. Another important feature of mitochondria is its role in apoptosis, the maintenance of  $\Delta\Psi$  via Src kinase could also play as an antiapoptotic mechanisms in cancer cells. Further investigations remain imperative to examine this possible function of Src despite it is not clear if mitochondrial depolarization is a primary or a secondary event during apoptosis (Marchetti *et al.*, 1996; Finucane *et al.*, 1999; Dussmann *et al.*, 2003). Interestingly, tyrosine phosphorylation of unknown mitochondrial proteins by the Src kinase family member Lyn protects against apoptosis during early liver regeneration that is associated with higher proliferation rates of hepatocytes (Gringeri *et al.*, 2010). This protection against apoptosis is dependent of the translocation of active Lyn within mitochondria. Therefore, it appears important to determine if Src-dependent maintenance of mitochondrial metabolism in cancer cells depends on the translocation of active Src from cytosol to mitochondria or on the activation of a pool of Src kinase resident in mitochondria.

The structure of complex I is not completely understood but NDUFB10 seems located on the matrix side of the subcomplex I $\beta$  within the hydrophobic arm of complex I (Brandt, 2006). Four accessory subunits, including NDUFB10, contain cysteine-rich motifs and it was proposed that these subunits might be involved in the iron-cluster assembly (Videira, 1998; Cardol *et al.*, 2004). Phosphorylation of NDUFB10 by Src kinase could therefore affect the transfer of electrons within complex I, decrease its enzymatic activity (Fig. 4) and  $\Delta\Psi$  (Fig. 6). Complex I transfers electrons from NADH to ubiquinone and simultaneously pumps protons from mitochondrial matrix to the intermembrane space. This translocation of protons is thought to occur in the membrane arm but the exact mechanism is unknown as several models still exist (Brandt, 2006). Therefore, NDUFB10 could also act as a regulator of complex I by modulation of proton translocation through Src-mediated phosphorylation since Src inhibition led to decreased mitochondrial membrane potential (Fig. 6). Obviously, a more accurate understanding of the complex I structure and of its proton translocation will be needed to confirm these mechanisms.

In conclusion, we propose that Src-dependent phosphorylation of NDUFB10 could participate in the elaboration of the proliferative phenotype of glycolytic cancer cells such as

143B and DU145 cells by allowing preservation of complex I activity and mitochondrial membrane potential. Src kinase is involved in several properties of cancer cells such as increased survival, migration and proliferative capacities. If previous studies showed that high Src kinase activity allows increase of aerobic glycolysis (13-14), this study demonstrate that Src also participate in maintenance of mitochondrial functions in cancer cells. The oncogene c-Myc is also well known for simultaneously stimulating aerobic glycolysis (Shim *et al.*, 1997; Osthus *et al.*, 2000) and maintaining functionality of mitochondria (Wise *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009), suggesting that Src kinase should be also considered as a pinpoint control in the establishment of proliferative phenotypes.

## **2.6. ACKNOWLEDGEMENTS**

Etienne Hébert Chatelain and Caroline Jose were financially supported by FQRNT (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies) and NSERC (National Sciences and Engineering Research Council of Canada) scholarships. This work was supported by INSERM, University Victor Segalen-Bordeaux 2 and region Aquitaine

## 2.7. TABLEAUX ET FIGURES

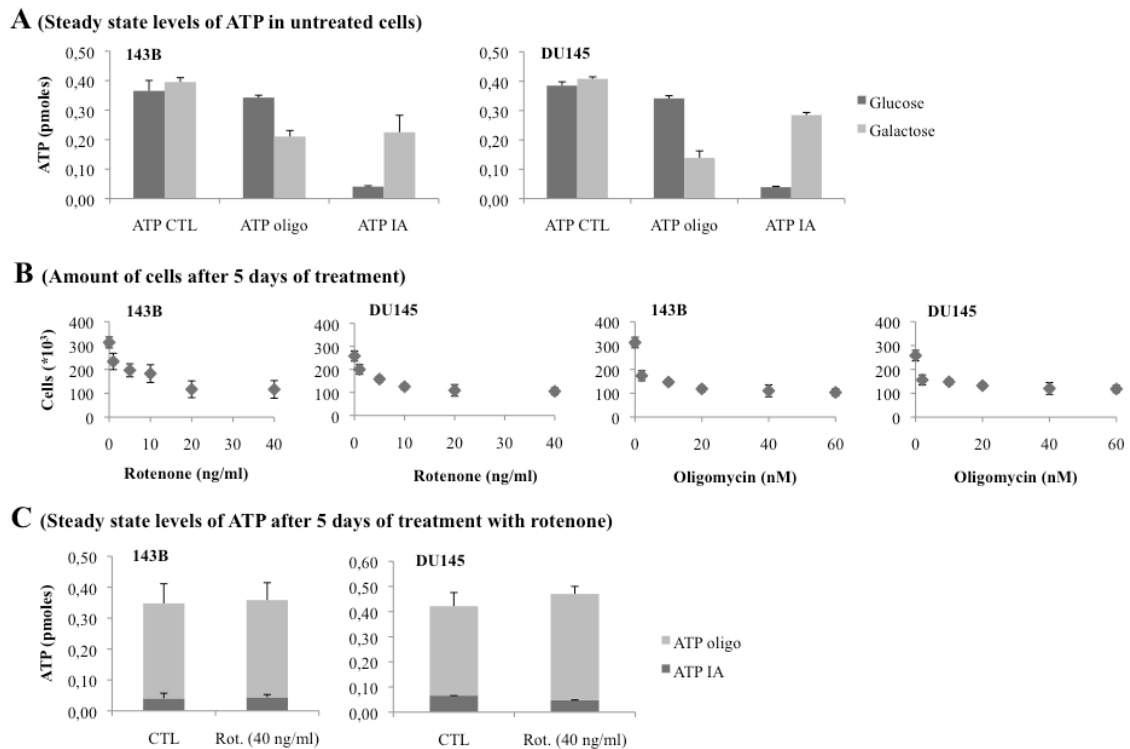
Table 1. Mean (S.D.) values of different respiration ( $\text{pmol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^{-6} \text{ cells}$ ) steps for intact and untreated 143B and DU145 cells grown in glucose or galactose DMEM (n=4-5). \* means that respiration values are statistically different ( $p \leq 0.05$ ) between glucose and galactose DMEM .

|            | 143B          |                | DU145         |                 |
|------------|---------------|----------------|---------------|-----------------|
|            | Glucose       | Galactose      | Glucose       | Galactose       |
| Basal      | 34.18 (3.53)  | 52.33 (5.43)*  | 37.10 (10.88) | 56.18 (1.56)*   |
| Oligomycin | 11.61 (2.54)  | 14.68 (3.21)   | 17.37 (4.60)  | 19.50 (3.51)*   |
| CCCP       | 81.71 (12.70) | 119.51 (4.18)* | 65.39 (14.82) | 114.73 (13.54)* |

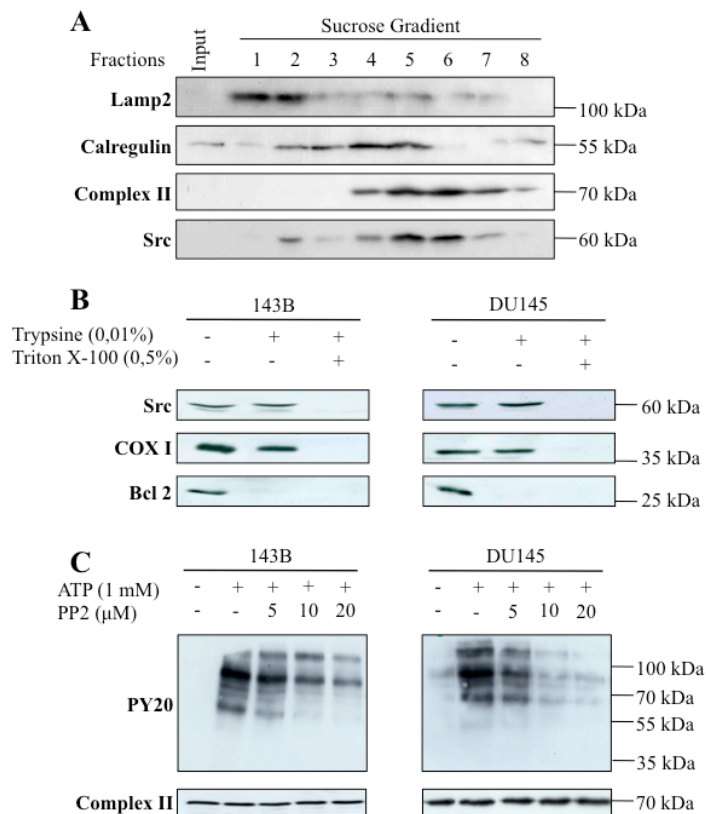
Table 2. Proteins identified by LC-MS-MS in tyrosine-phosphorylated band of complex I immunoprecipitates in Fig. 4.

| Accession number | Protein                              | MS/MS scans ( <i>n</i> ) | Peptides ( <i>n</i> ) | Protein sequence coverage of peptide (%) | Molecular weight (kDa) |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------|--|------------------------|
| P02768           | Serum albumin                        | 5                        | 2                     | 2.46                                     | 69.322                 |
| P47985           | Complex III subunit Rieske           | 3                        | 3                     | 15.69                                    | 29.649                 |
| O96000           | Complex I beta subcomplex subunit 10 | 3                        | 3                     | 20.93                                    | 20.763                 |
| P21291           | Cysteine and glycine-rich protein    | 2                        | 2                     | 19.17                                    | 20.554                 |
| P04083           | Annexin A1                           | 2                        | 2                     | 7.80                                     | 38.690                 |

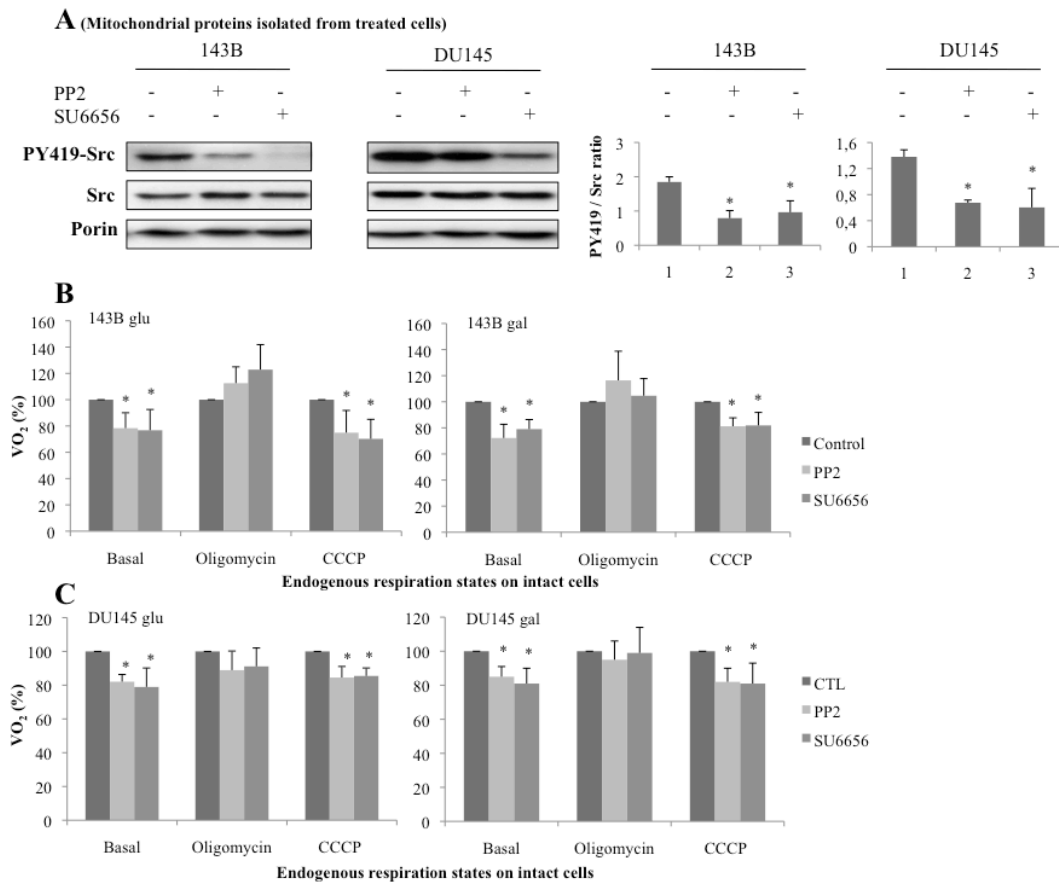
**Figure 1. Steady-state ATP level in 143B and DU145 cells.** (A) ATP steady-state levels (pmole) were measured with 100 000 cells incubated with vehicle, 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oligomycin (indicative of glycolytic ATP production) or 500  $\mu\text{M}$  iodoacetate (indicative of mitochondrial ATP production) for both cell lines in both culture conditions. Data (n=5) are shown as means (S.D.). (B) Proliferation of 2000 cells grown in high glucose DMEM supplemented with different concentrations of rotenone (1, 2, 4, 10 and 40  $\text{ng ml}^{-1}$ ) and oligomycin (2, 10, 20, 40, 60 nM). Cells were count by trypan blue staining after 5 days of treatment (n=5). (C) Mitochondrial and glycolytic ATP levels were measured on 100 000 cells treated with high glucose DMEM supplemented with rotenone (40  $\text{ng/ml}$ ) during 5 days. No statistical difference was noted, according to Student T test ( $p > 0.05$ ). Data (n=5) are shown as means (S.D.).



**Figure 2. Src kinase is located within mitochondria of 143B and DU145 cells.** (A) Organelles were separated by ultracentrifugation (100 000\*g during 4 hours) on a discontinuous sucrose gradient (30-60%). Each fractions were then western blotted: lysosomes were immunodetected using lamp2 antibody, endoplasmic reticulum with calregulin antibody, mitochondria with complex II 70 kDa subunit antibody and Src kinase with Src B12 antibody. (B) Fractions 6 and 7 (from panel A) were untreated or incubated with trypsin in the presence or absence of Triton X-100 and then western blotted for localization of Src kinase: COX I was used as marker of intramitochondrial proteins while Bcl 2 was used as marker of extramitochondrial proteins. (C) Isolated mitochondrial fractions were untreated or incubated with ATP, with DMSO (as control) or with increasing concentrations of Src inhibitor PP2 and then western blotted. Phosphotyrosine were detected using PY20 antibody while complex II 70 kDa subunit antibody was used a loading control.

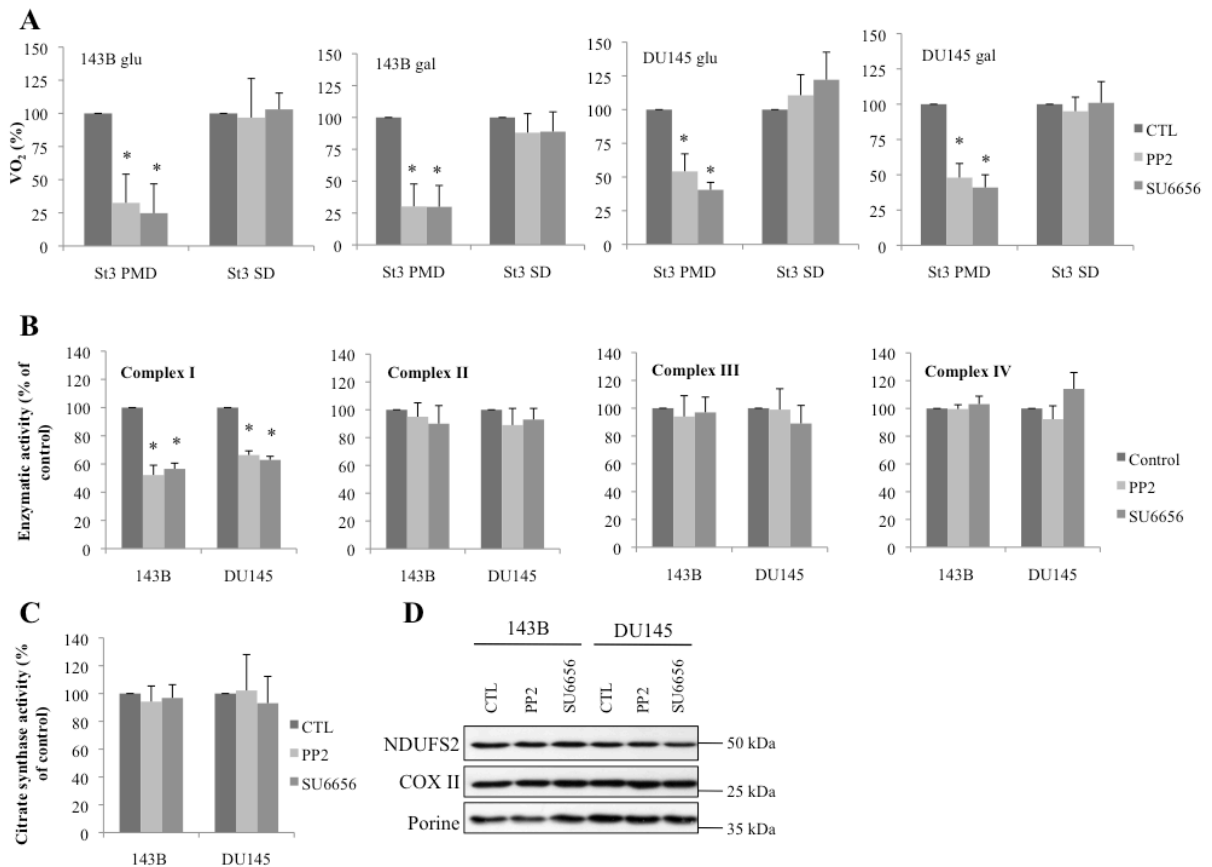


**Figure 3. Effect of Src inhibition on bioenergetics of 143B and DU145 cells.** Cells were incubated during 4 hours with DMEM supplemented with DMSO or Src inhibitors PP2 (5  $\mu$ M) and SU6656 (10  $\mu$ M). (A) After treatment, mitochondrial fractions were isolated and immunoblotted with PY419-Src and porin antibodies, stripped and reprobbed with Src B12 antibody. The intensity of PY419-Src labeling among treatment was normalized over Src signal (n=3). (B and C) After treatment, O<sub>2</sub> consumption was measured (n = 4-5) in intact 143B and DU145 cells grown in glucose (glu) and galactose (gal) DMEM during basal, oligomycin and CCCP respirations states. Means bearing \* are significantly different (p < 0.05) from control according to Student T test.

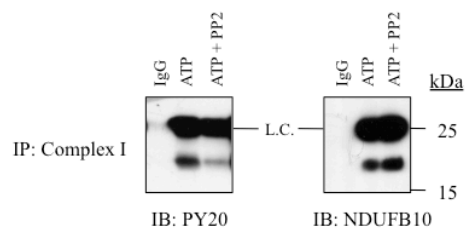




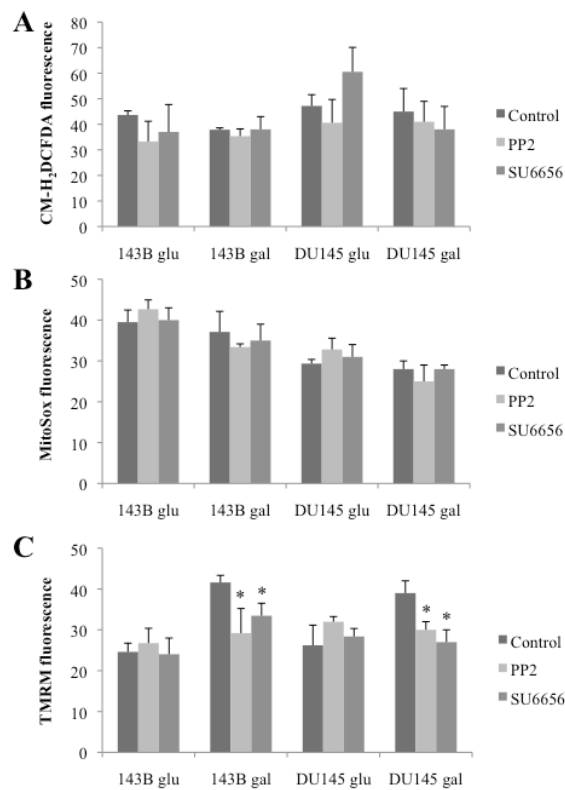
**Figure 4. Inhibition of Src kinase leads to a decrease of complex I activity in 143B and DU145 cells.** (A) After treatment of 143B and DU145 cells grown in glucose (glu) and galactose (gal) DMEM with DMSO (as control), PP2 (5  $\mu$ M) or SU6656 (10  $\mu$ M) during 4 h., O<sub>2</sub> consumption was measured (n = 4-5) in digitonin-permeabilized cells during pyruvate-malate-ADP driven respiration (St3 PMD) and rotenone-succinate-ADP driven respiration (St3 SD). (B and C) After treatment, cells were harvested and complex I, II, III and IV as well as citrate synthase enzymatic activities (n = 3) were measured as in (Aleardi *et al.*, 2005). (D) After treatments, cells were harvested and mitochondrial fractions were immunoblotted with NDUFS2 antibody (marker of complex I), COX II antibody (marker of complex IV) and porine (as a loading control). All blots are representative of three independent experiments. Means bearing \* are significantly different (p < 0.05) from control according to Student T test.



**Figure 5. Src kinase induce tyrosine phosphorylation of complex I subunit NDUFB10.** Immunoprecipitation of complex I from 143B and DU145 isolated mitochondria was performed after incubation of isolated mitochondrial fractions with ATP (1 mM) or ATP with PP2 (10uM). Immunoprecipitates were then western blotted and phosphotyrosine were detected with PY20 antibody. Identity of the phosphorylated subunit was first revealed by mass spectrometry (as shown in Table 2) and further confirmed by labeling the NDUFB10 subunit. Immunoblots are only presented for complex I immunoprecipitated from DU145 mitochondrial fractions although the same results were obtained from 143B cells (L.C.: light chain).



**Figure 6. Mitochondrial membrane potential is decreased after Src inhibition treatment but not ROS levels.** After treatment of 143B and DU145 cells grown in glucose (glu) or galactose (gal) DMEM with DMSO (as control), PP2 (5  $\mu$ M) or SU6656 (10  $\mu$ M) during 4 h., ROS levels were evaluated by the fluorescence of (A) CM-H<sub>2</sub>DCFDA (mainly indicative of cytosolic ROS) and (B) MitoSox (mainly indicative of mitochondrial ROS) probes while mitochondrial membrane potential was evaluated from (C) TMRM signal (n=3). Means bearing \* are significantly different (p < 0.05) from control according to Student T test.



### 3. Conclusion

#### 3.1 Analyse des résultats

Plusieurs types de cellules cancéreuses possèdent un phénotype métabolique hautement glycolytique, phénomène connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg *et al.*, 1927; Warburg, 1956). Par exemple, les lignées cancéreuses 143B et DU145 ne produisent qu'environ 10% de l'ATP par les mitochondries. Néanmoins, l'inhibition des OXPHOS entraîne une chute de plus de 50% de la prolifération de ces cellules. Cette chute de la prolifération ne peut pas être expliquée par une chute de la production d'ATP car l'inhibition des OXPHOS ne cause pas de diminution des niveaux d'ATP totaux. Plusieurs études précédentes ont aussi observé une baisse de prolifération chez différents types de cellules cancéreuses suite à une inhibition des OXPHOS, sans pour autant diminuer les niveaux d'ATP totaux (Yuneva *et al.*, 2007 ; Hao *et al.*, 2010). Ces résultats démontrent bien l'importance des mitochondries dans la prolifération de ces cellules cancéreuses.

Dans les cellules cancéreuses, mais aussi pour les cellules présentant d'importantes vitesses de prolifération en général, le réarrangement métabolique semble important pour soutenir la production des précurseurs essentiels des voies de biosynthèse des lipides, protéines et acides nucléiques. La synthèse de lipides semble effectivement plus importante dans les cellules cancéreuses que dans les cellules différenciées (Medes *et al.*, 1953; Sabine *et al.*, 1967; Milgraum *et al.*, 1997; Rashid *et al.*, 1997). De plus, les cellules proliférantes consomment davantage de glutamine, via la mitochondrie, pour produire les précurseurs des voies de synthèse des acides aminés et des acides nucléiques (Bode *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004). Le métabolisme mitochondrial reste donc important pour les cellules cancéreuses, telles que 143B et DU145. Certaines études ont d'ailleurs montré que des cellules cancéreuses dans lesquelles on avait supprimé l'ADNmt et les OXPHOS présentaient des phénotypes moins prolifératifs et des propriétés métastatiques diminuées (Yu *et al.*, 2007; Berridge et Tan, 2010).

Etant donné que la Src kinase, connue pour réguler le métabolisme mitochondrial dans certains tissus non cancéreux, est suractivée dans différentes lignées cancéreuses, dont 143B et DU145, nous avons regardé si cette kinase pouvait réguler les fonctions mitochondriales dans ces deux lignées cancéreuses. Premièrement, la Src est présente à l'intérieur des mitochondries chez 143B et DU145. L'inhibition de cette kinase induit une diminution de la respiration dépendante du complexe I. Cette baisse de la respiration est due à un effet spécifique de la Src kinase sur le complexe I: l'inactivation de la Src entraînant une baisse des activités enzymatiques exclusivement chez complexe I. Cette diminution de l'activité du complexe est probablement due à une baisse de phosphorylation de NDUFB10. Ces résultats suggèrent que la Src kinase peut réguler les fonctions mitochondriales par la phosphorylation de NDUFB10. La production d'ATP par les OXPHOS ne semblant pas la fonction mitochondriale la plus importante chez ces lignées cancéreuses, la maintenance de la respiration mitochondriale induite par la Src devrait être relié à d'autres fonctions.

L'inhibition de la Src entraîne une baisse du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi$ ). Il semble donc que le maintien de l'activité du complexe I par la phosphorylation de NDUFB10 via la Src kinase, permet de maintenir les niveaux du potentiel de membrane mitochondrial. La majorité des fonctions mitochondriales, comme l'importation des protéines à l'intérieur de la mitochondrie, nécessite des niveaux de  $\Delta\Psi$  suffisants (Schleyer et Neupert, 1985; Geissler *et al.*, 2000). La préservation du  $\Delta\Psi$  par la Src pourrait donc permettre de maintenir l'importation des protéines participant au cycle de Krebs, et de maintenir les voies de biosynthèses et les capacités prolifératives de 143B et DU145.

### **3.2. Perspectives**

Les différents résultats de cette étude suggèrent donc que la Src kinase peut agir comme un régulateur important dans les cellules cancéreuses. En induisant la phosphorylation de NDUFB10, la Src kinase pourrait participer à l'élaboration du phénotype prolifératif des cellules cancéreuses (du moins chez 143B et DU145) via la

préservation de l'activité du complexe I et du  $\Delta\Psi$ . Certaines études précédentes ont montré que l'activation de la Src pouvait conduire à l'augmentation du métabolisme glycolytique (Karni *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005). Etant donné que les résultats de la présente étude démontrent l'importance de la Src comme régulateur des OXPHOS chez des lignées cancéreuses hautement glycolytiques, cette kinase apparaît donc comme un point de contrôle important dans l'élaboration des phénotypes bioénergétique et prolifératif des cellules cancéreuses.

L'importation des protéines dans la mitochondrie requiert la présence d'un potentiel de membrane mitochondrial (Schleyer *et al.*, 1982; Geissler *et al.*, 2000). La maintenance du  $\Delta\Psi$  par la Src kinase pourrait donc permettre de maintenir les voies anaboliques dépendantes du cycle de Krebs, en maintenant l'importation des protéines du cycle de Krebs dans la mitochondrie. Il pourrait donc être très intéressant de mesurer les niveaux d'importation de ces protéines chez des lignées cancéreuses, telles que 143B et DU145, lorsque la Src est inhibée. De plus, il serait important de mesurer la synthèse *de novo* des lipides, protéines et acides nucléiques lorsque l'inhibition de la Src induit une diminution du  $\Delta\Psi$ . Sachant que l'activation de la Src peut aussi stimuler le métabolisme glycolytique, il serait important de déterminer si la Src pourrait aussi stimuler la production de nucléotides via la voie des pentose-phosphates.

L'augmentation du  $\Delta\Psi$  dans les cellules cancéreuses est aussi associée à une diminution des voies apoptotiques (Heerdt *et al.*, 2005). À l'inverse, l'inhibition du complexe I (notamment par la roténone) peut causer une dépolarisation du  $\Delta\Psi$  et déclencher l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, des cellules neuronales (Moon *et al.*, 2005) à différents types de cellules cancéreuses (Follstad *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2010). Ainsi, la Src kinase pourrait donc participer à ces processus d'inhibition de l'apoptose dans les lignées cancéreuses: l'augmentation de l'activité du complexe I, de la respiration et du potentiel de membrane mitochondrial induite par la Src pourrait diminuer la sensibilité des cellules cancéreuses au déclenchement des voies apoptotiques. En ce sens, il serait intéressant de mesurer la sensibilité à différents inducteurs de l'apoptose, de même que les différents marqueurs des voies apoptotiques (notamment la présence du cytochrome *c* dans le cytosol et l'activation des caspases)

lorsque la Src n'est plus activée. On ne sait toutefois pas si la dépolarisation mitochondriale est un phénomène primaire ou secondaire de l'apoptose (voir Ly *et al.*, 2003). L'apoptose peut effectivement être déclenchée suite à l'ouverture du pore de perméabilité transitoire, induisant le largage de facteurs apoptotiques et causant, en même temps, une diminution du  $\Delta\Psi$ . Dans ce cas précis, la dépolarisation serait donc une conséquence et non l'inducteur de l'apoptose. De plus, il semble que cette dépolarisation ne soit pas nécessaire au relargage du cytochrome *c* (Finucane *et al.*, 1999; Grubb *et al.*, 2001), mais absolument essentielle au largage du AIF (Ly *et al.*, 2003). L'étude des effets la Src kinase, en tant que modulateur du  $\Delta\Psi$ , sur le déclenchement de l'apoptose pourrait donc permettre de mieux comprendre comment la Src participe à l'élaboration du phénotype global des cellules cancéreuses.

## V. CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a permis de démontrer l'importance des phosphorylations induites par la Src kinase dans la régulation du métabolisme mitochondrial dans différents types cellulaires. **Dans le premier chapitre, nous avons démontré que la Src kinase pouvait être régulée par la tyrosine-phosphatase PTP1B directement dans les mitochondries de cerveau chez le rat.** De plus, l'activation ou l'inhibition de la Src kinase y influence grandement les capacités enzymatiques des complexes du STE et la respiration mitochondriale. **Dans le deuxième chapitre, nous avons montré que la Src kinase peut aussi moduler le métabolisme mitochondrial dans les lignées cancéreuses, et ainsi maintenir certaines fonctions mitochondriales essentielles à ces cellules.**

Ces résultats montrent pour la première fois que la Src kinase peut être régulée directement à l'intérieur de la mitochondrie. Les PKA constituent un autre exemple de ce phénomène. Les PKA sont présentes dans différents compartiments mitochondriaux, de la membrane externe à la matrice mitochondriale (Cardone *et al.*, 2004; Sardanelli *et al.*, 2006). L'adénylate cyclase, qui produit l'AMPc, un activateur des PKA, semble aussi présente dans la matrice mitochondriale (Acin-Perez *et al.*, 2009). Ainsi, les PKA peuvent être directement activées dans les mitochondries. Le CO<sub>2</sub> produit par le cycle de Krebs (via l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase) active l'adénylate cyclase mitochondriale, augmentant les niveaux d'AMPc dans la mitochondrie, induisant l'activation des PKA. L'activation de l'adénylate cyclase et des PKA y induit une augmentation de la respiration et de la production d'ATP. Ces résultats montrent bien que l'activité des PKA peut être modulée directement dans les mitochondries.

Certaines protéines d'ancrage, telles que AKAP121 et AKAP84, ont la capacité d'importer la Src et les PKA sur la membrane externe mitochondriale (Cardone *et al.*, 2004; Livigni *et al.*, 2006). Cette translocation de kinases cytosoliques s'accompagne de hausses de la production d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial.

Ces différentes études suggèrent donc l'existence de différentes voies de régulation du métabolisme mitochondrial par les phosphorylations (**Figure 21**). D'un côté,



l'importation de kinases cytosoliques dans la mitochondrie permettrait de relayer la signalisation du cytosol à la mitochondrie. La translocation de la Src ou des PKA cytosoliques par les AKAP sur la membrane externe mitochondriale représente probablement une voie de signalement efficace afin de transmettre des signaux provenant du cytosol et du noyau vers la mitochondrie. Ces voies de signalement pourraient donc permettre d'ajuster le métabolisme mitochondrial en fonction de paramètres externes à la mitochondrie. Par exemple, différents stimuli cytosoliques peuvent induire la translocation de PKC vers la mitochondrie et déclencher l'apoptose (Li *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2007). De plus, la dégradation des protéines de transport des kinases pourrait stopper ces voies de signalisation. Ainsi, la dégradation de AKAP121, qui transporte la Src et les PKA sur la membrane externe de la mitochondrie, suffit à renverser les effets de la Src sur la mitochondrie (Itoh *et al.*, 2005; Carlucci *et al.*, 2008). Cette première voie pourrait donc agir indépendamment de la mitochondrie pour répondre davantage aux paramètres cytosoliques.

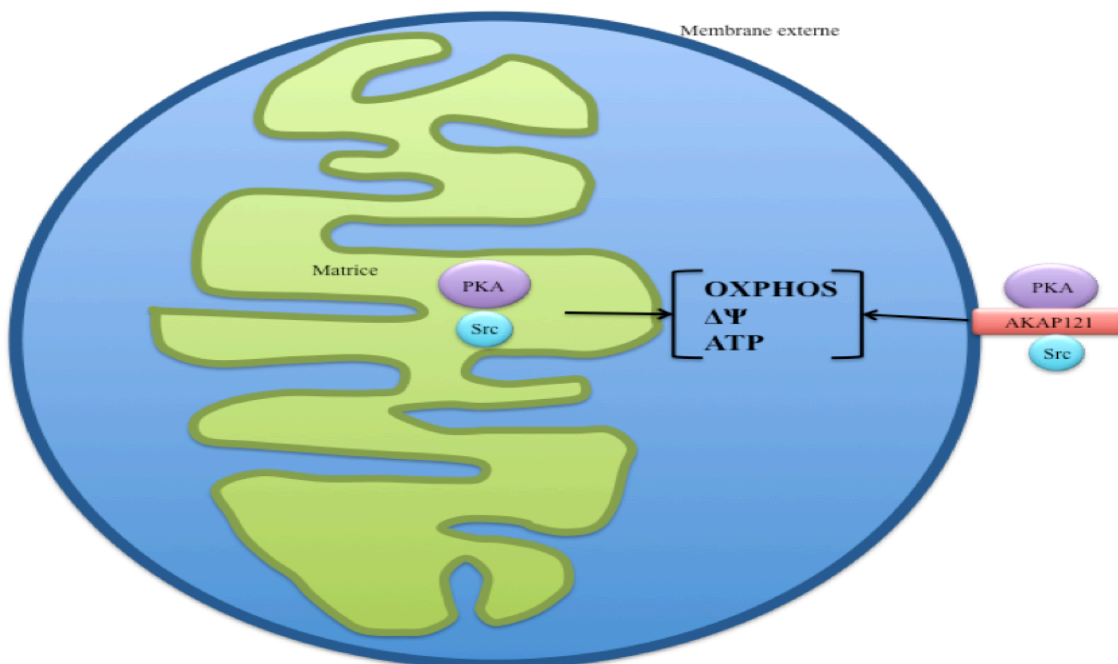


Figure 21. Les différentes voies de régulation des OXPHOS par les processus de phosphorylation. Les kinases peuvent être présentes, simultanément ou non, dans différents compartiments mitochondriaux. Par exemple, la Src et les PKA peuvent être présentes, simultanément ou non, dans la matrice ou sur la membrane externe. Ces différentes localisations pourraient être utilisées selon des paramètres différents. Ainsi, les kinases cytoplasmiques situées sur la membrane externe de la mitochondrie pourraient agir en fonction de signaux dits cytosoliques alors que les kinases matricielles agiraient en fonction de paramètres dits mitochondriaux.

La régulation intramitochondriale des kinases déjà présentes à l'intérieur de l'organelle pourrait permettre la régulation des OXPHOS en fonction de signaux dits mitochondriaux, tels que le potentiel de membrane mitochondrial. Par exemple, l'activation de l'adénylate cyclase et des PKA par le CO<sub>2</sub> (lui-même produit par un bon fonctionnement du cycle de Krebs) semble être davantage lié à la maintenance du métabolisme mitochondrial. Ce mécanisme pourrait cependant difficilement renverser à lui seul un ralentissement trop important du métabolisme mitochondrial puisqu'une diminution du cycle de Krebs devrait entraîner une diminution de l'activité des PKA et de la stimulation de la production d'ATP. À ce moment, la translocation de kinases cytosoliques vers la mitochondrie pourrait donc permettre un réajustement majeur du métabolisme mitochondrial. Ainsi, la régulation des OXPHOS par les kinases intramitochondriales pourrait constituer un ensemble d'événements continuels aptes à réguler finement la respiration mitochondriale, tandis que la régulation par importation de kinases cytosoliques constituerait un ensemble d'événements plus ponctuels aptes à induire des changements plus importants.

On en connaît cependant très peu sur les différentes conditions qui peuvent induire, d'une part, la translocation des kinases vers ou dans la mitochondrie, et d'autre part, l'activation des kinases mitochondriales. L'expression de kinases comportant des séquences de ciblage vers différents compartiments cellulaires tels que le cytosol, la membrane externe mitochondriale et la matrice mitochondriale, pourrait permettre de déterminer comment la localisation intracellulaire des kinases dicte leur(s) impact(s) fonctionnel(s). L'étude de ces différentes voies permettra sans aucun doute de mieux comprendre l'importance des processus de phosphorylation comme régulateur de métabolisme énergétique.

Ces études pourraient aussi permettre de déterminer si la Src peut induire à elle seule le réarrangement métabolique et le phénotype prolifératif des cellules cancéreuses. Une surexpression de la Src dans le cytosol induit une augmentation de plusieurs enzymes glycolytiques (Karni *et al.*, 2002), mais pourrait aussi induire une augmentation de la voie des pentoses-phosphates et de la production des nucléotides. De même, la surexpression de la Src mitochondriale dans différents compartiments mitochondriaux pourrait stimuler

la production d'acides aminés et de lipides. Ces études pourraient donc permettre de vérifier à quel point la Src participe à ces changements.

En conclusion, les travaux de cette thèse montre clairement que les phosphorylations sur tyrosine, plus particulièrement celles induites par la Src kinase, constituent une voie de régulation majeure des OXPHOS.

## VI. ANNEXE

### **Publications;**

#### Travaux de thèse:

**Hébert Chatelain, É.**, Jose, C., Gutierrez Cortes, N., et al. Preservation of mitochondrial functions in cancer cells through membrane potential: phosphorylation of NDUFB10 by Src kinase. Soumis dans The Journal of Biological Chemistry, le 2 juin 2011.

**Hébert Chatelain, É.**, Dupuis, J.W., Letellier, T. et al. 2011. Fonctionnal impact of PTP1B-mediated Src regulation on oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria. Cell. Mol. Life Sci., **68**: 2603-2613.

**Chatelain, E.H.** Letellier, T. et Dachary-Prigent, J., 2010. Src-mediated tyrosine phosphorylation; a new way of regulating mitochondrial bioenergetics? Biochimica and Biophysica Acta. **1797**: 72.

#### Travaux en collaboration durant la thèse:

Jose, C., Bellance, N., **Hébert Chatelain, É.** et al. 2011. Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. Accepté dans Mitochondrion.

Jose, C., **Hébert-Chatelain, É.**, Bellance, N., et al. 2010. AICAR inhibits the growth of cancer cells and triggers cell-type distinct effects on mitochondrial biogenesis and oxidative stress. Biochimica and Biophysica Acta. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2010.12.002 (Sous presse).

## Congrès;

**Hébert Chatelain, É.**, Jose, C., Dachary-Prigent, J. et al. Preservation of mitochondrial functions in cancer cells through membrane potential: phosphorylation of NDUFB10 by Src kinase in 143B and DU145 cells. Affiche présentée à la *Gordon Research Conference-Bioenergetics* (2011), Andover, NH, USA.

**Hébert Chatelain, É.**, Letellier, T. et Dachary-Prigent, J., Src-mediated tyrosine phosphorylation; a new way of regulating mitochondrial bioenergetics? Présentation orale invitée à l'EBEC (2010), Varsovie, Pologne (Récipiendaire de l'EBEC *student grant award*).

**Hébert Chatelain, É.**, Letellier, T. et Dachary-Prigent, J. Impacts fonctionnels des phosphorylations induite par la Src kinase sur les phosphorylations oxydatives. Affiche présentée à Meetochondrie 2010, Aussoie, France.

**Hébert Chatelain, É.**, Arachiche, A., Letellier, T. et al. Régulation du métabolisme mitochondrial par les phosphorylations sur tyrosine. Affiche présentée à Meetochondrie 2009, Montpellier, France.

## VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abele, D., Heise, K., Portner, H. O. et Puntarulo, S. 2002.** Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol* 205(Pt 13):1831-41.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A. et Enriquez, J. A. 2008.** Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32(4):529-39.
- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R. et Manfredi, G. 2009.** Cyclic AMP Produced inside Mitochondria Regulates Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab* 9(3):265-76.
- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N. et Kang, D. 2003.** Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* 31(6):1640-5.
- Aleardi, A. M., Benard, G., Augereau, O., Malgat, M., Talbot, J. C., Mazat, J. P., Letellier, T., Dachary-Prigent, J., Solaini, G. C. et Rossignol, R. 2005.** Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 37(4):207-25.
- Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P. et Zorov, D. B. 1988.** Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 107(2):481-95.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F. et al. 1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-65.
- Arachiche, A., Augereau, O., Decossas, M., Pertuiset, C., Gontier, E., Letellier, T. et Dachary-Prigent, J. 2008.** Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences. *J Biol Chem* 283(36):24406-11.
- Arciuch, V. G., Alippe, Y., Carreras, M. C. et Poderoso, J. J. 2009.** Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 61(14):1234-49.
- Arismendi-Morillo, G. J. et Castellano-Ramirez, A. V. 2008.** Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potentials implications pro-therapeutics strategies. *J Electron Microsc (Tokyo)* 57(1):33-9.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. et Schagger, H. 1998a.** Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17(24):7170-8.
- Arnold, S., Goglia, F. et Kadenbach, B. 1998b.** 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem* 252(2):325-30.
- Arnold, S. et Kadenbach, B. 1997.** Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* 249(1):350-4.

- Asin-Cayuela, J. et Gustafsson, C. M. 2007.** Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 32(3):111-7.
- Augereau, O., Claverol, S., Boudes, N., Basurko, M. J., Bonneu, M., Rossignol, R., Mazat, J. P., Letellier, T. et Dachary-Prigent, J. 2005.** Identification of tyrosine-phosphorylated proteins of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery. *Cell Mol Life Sci* 62(13):1478-88.
- Babcock, G. T. et Wikstrom, M. 1992.** Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356(6367):301-9.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. et Cohen, P. 2003.** The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371(Pt 1):199-204.
- Bauer, D. E., Harris, M. H., Plas, D. R., Lum, J. J., Hammerman, P. S., Rathmell, J. C., Riley, J. L. et Thompson, C. B. 2004.** Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J* 18(11):1303-5.
- Beckman, K. B. et Ames, B. N. 1998.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78(2):547-81.
- Bellomo, F., Piccoli, C., Cocco, T., Scacco, S., Papa, F., Gaballo, A., Boffoli, D., Signorile, A., D'Aprile, A., Scrima, R. et al. 2006.** Regulation by the cAMP cascade of oxygen free radical balance in mammalian cells. *Antioxid Redox Signal* 8(3-4):495-502.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. et Rossignol, R. 2007.** Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120(Pt 5):838-48.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J. P., Casteilla, L., Letellier, T. et Rossignol, R. 2006.** Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(6):C1172-82.
- Bender, E. et Kadenbach, B. 2000.** The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett* 466(1):130-4.
- Berridge, M. V. et Tan, A. S. 2010.** Effects of mitochondrial gene deletion on tumorigenicity of metastatic melanoma: reassessing the Warburg effect. *Rejuvenation Res* 13(2-3):139-41.
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S. et Crofts, A. R. 2000.** Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem* 69:1005-75.
- Berry, E. A. et Trumpower, B. L. 1985.** Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome b<sub>cl</sub> and cytochrome c-aa<sub>3</sub> complexes. *J Biol Chem* 260(4):2458-67.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. et Lenaz, G. 2004.** The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279(35):36562-9.
- Bjorge, J. D., Pang, A. et Fujita, D. J. 2000.** Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 275(52):41439-46.

- Blake, R. A., Broome, M. A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L. et Courtneidge, S. A. 2000.** SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 20(23):9018-27.
- Bode, B. P., Fuchs, B. C., Hurley, B. P., Conroy, J. L., Suetterlin, J. E., Tanabe, K. K., Rhoads, D. B., Abcouwer, S. F. et Souba, W. W. 2002.** Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(5):G1062-73.
- Boerner, J. L., Demory, M. L., Silva, C. et Parsons, S. J. 2004.** Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol Cell Biol* 24(16):7059-71.
- Boggon, T. J. et Eck, M. J. 2004.** Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23(48):7918-7927.
- Bosca, L., Mojena, M., Ghysdael, J., Rousseau, G. G. et Hue, L. 1986.** Expression of the v-src or v-fps oncogene increases fructose 2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts. Novel mechanism for the stimulation of glycolysis by retroviruses. *Biochem J* 236(2):595-9.
- Boveris, A. et Cadenas, E. 2000.** Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50(4-5):245-50.
- Boveris, A., Oshino, N. et Chance, B. 1972.** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128(3):617-30.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L. et Parker, N. 2004.** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37(6):755-67.
- Branden, G., Gennis, R. B. et Brzezinski, P. 2006.** Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1757(8):1052-63.
- Brandon, M., Baldi, P. et Wallace, D. C. 2006.** Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25(34):4647-62.
- Brandt, U. 2006.** Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69-92.
- Brown, M. T. et Cooper, J. A. 1996.** Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287(2-3):121-49.
- Burlacu, A. 2003.** Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 7(3):249-57.
- Bustamante, E., Morris, H. P. et Pedersen, P. L. 1981.** Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256(16):8699-704.
- Bustamante, E. et Pedersen, P. L. 1977.** High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9):3735-9.
- Bustamante, E. et Pedersen, P. L. 1980.** Mitochondrial hexokinase of rat hepatoma cells in culture: solubilization and kinetic properties. *Biochemistry* 19(22):4972-7.



- Bykova, N. V., Egsgaard, H. et Moller, I. M. 2003.** Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes. *FEBS Lett* 540(1-3):141-6.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I. et Stoppani, A. O. 1977.** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180(2):248-57.
- Cantatore, P., Flagella, Z., Fracasso, F., Lezza, A. M., Gadaleta, M. N. et de Montalvo, A. 1987.** Synthesis and turnover rates of four rat liver mitochondrial RNA species. *FEBS Lett* 213(1):144-8.
- Capitano, N., Capitano, G., De Nitto, E., Villani, G. et Papa, S. 1991.** H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome c oxidase vesicles. *FEBS Lett* 288(1-2):179-82.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R. F. et Remacle, C. 2004.** Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1658(3):212-24.
- Cardone, L., Carlucci, A., Affaitati, A., Livigni, A., DeCristofaro, T., Garbi, C., Varrone, S., Ullrich, A., Gottesman, M. E., Avvedimento, E. V. et al. 2004.** Mitochondrial AKAP121 binds and targets protein tyrosine phosphatase D1, a novel positive regulator of src signaling. *Mol Cell Biol* 24(11):4613-26.
- Carlucci, A., Adornetto, A., Scorziello, A., Viggiano, D., Foca, M., Cuomo, O., Annunziato, L., Gottesman, M. et Feliciello, A. 2008.** Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during cellular hypoxia and brain ischaemia. *EMBO J* 27(7):1073-84.
- Cervený, K. L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R. E. et Sesaki, H. 2007.** Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol* 17(11):563-9.
- Chacinska, A., Pfanner, N. et Meisinger, C. 2002.** How mitochondria import hydrophilic and hydrophobic proteins. *Trends Cell Biol* 12(7):299-303.
- Chan, J. Y., Chang, A. Y., Wang, L. L., Ou, C. C. et Chan, S. H. 2007.** Protein kinase C-dependent mitochondrial translocation of proapoptotic protein Bax on activation of inducible nitric-oxide synthase in rostral ventrolateral medulla mediates cardiovascular depression during experimental endotoxemia. *Mol Pharmacol* 71(4):1129-39.
- Chance, B. et Williams, G. R. 1955.** A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176(4475):250-4.
- Chang, C. R. et Blackstone, C. 2007.** Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282(30):21583-7.
- Chatterjee, A., Mambo, E. et Sidransky, D. 2006.** Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 25(34):4663-74.
- Chen, Q., Lin, R. Y. et Rubin, C. S. 1997.** Organelle-specific targeting of protein kinase AII (PKAII). Molecular and in situ characterization of murine A kinase anchor proteins that recruit regulatory subunits of PKAII to the cytoplasmic surface of mitochondria. *J Biol Chem* 272(24):15247-57.

- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. et Lesnefsky, E. J. 2003.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278(38):36027-31.
- Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y. et Walker, J. E. 2004.** The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 279(25):26036-45.
- Chen, X. J. et Butow, R. A. 2005.** The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6(11):815-25.
- Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P. et Stepien, G. 2011.** Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1807(6):562-7.
- Clark, J. B. et Nicklas, W. J. 1970.** The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J Biol Chem* 245(18):4724-31.
- Collinson, I. R., Runswick, M. J., Buchanan, S. K., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., van Raaij, M. J., Griffiths, D. E. et Walker, J. E. 1994a.** Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33(25):7971-8.
- Collinson, I. R., van Raaij, M. J., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Orriss, G. L., Miroux, B. et Walker, J. E. 1994b.** ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F1-ATPase and in its absence. *J Mol Biol* 242(4):408-21.
- Cross, R. L. 2004.** Molecular motors: turning the ATP motor. *Nature* 427(6973):407-8.
- Cuezva, J. M., Ortega, A. D., Willers, I., Sanchez-Cenizo, L., Aldea, M. et Sanchez-Arago, M. 2009.** The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*.
- D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C. D., Kwong, J. Q., Bruno, C., Beal, M. F. et Manfredi, G. 2001.** In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem* 276(50):46925-32.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. et Thompson, C. B. 2008.** The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7(1):11-20.
- Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G. et Parsons, S. J. 2009.** Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J Biol Chem* 284(52):36592-604.
- Deng, N., Zhang, J., Zong, C., Wang, Y., Lu, H., Yang, P., Wang, W., Young, G. W., Korge, P., Lotz, C. et al. 2010.** Phosphoproteome analysis reveals regulatory sites in major pathways of cardiac mitochondria. *Mol Cell Proteomics*.
- Di Pancrazio, F., Bisetto, E., Alverdi, V., Mavelli, I., Esposito, G. et Lippe, G. 2006.** Differential steady-state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial F0F1ATP synthase: a structural proteomic analysis. *Proteomics* 6(3):921-6.
- Diaz, F. et Moraes, C. T. 2008.** Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44(1):24-35.

- Distler, A. M., Kerner, J. et Hoppel, C. L. 2007.** Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1774(5):628-36.
- Donovan, M. et Cotter, T. G. 2004.** Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3):133-47.
- Dussmann, H., Rehm, M., Kogel, D. et Prehn, J. H. 2003.** Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J Cell Sci* 116(Pt 3):525-36.
- Dyson, M. T., Jones, J. K., Kowalewski, M. P., Manna, P. R., Alonso, M., Gottesman, M. E. et Stocco, D. M. 2008.** Mitochondrial A-kinase anchoring protein 121 binds type II protein kinase A and enhances steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis in MA-10 mouse leydig tumor cells. *Biol Reprod* 78(2):267-77.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S. *et al.* 2002.** Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415(6867):96-9.
- Engen, J. R., Wales, T. E., Hochrein, J. M., Meyn, M. A., 3rd, Banu Ozkan, S., Bahar, I. et Smithgall, T. E. 2008.** Structure and dynamic regulation of Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 65(19):3058-73.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G. et Gustafsson, C. M. 2002.** Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 31(3):289-94.
- Falkenberg, M., Larsson, N. G. et Gustafsson, C. M. 2007.** DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:679-99.
- Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A. L., Leoni, S., Ohnishi, T. et Lenaz, G. 2009.** Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1787(5):384-92.
- Feliciello, A., Gottesman, M. E. et Avvedimento, E. V. 2001.** The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol* 308(2):99-114.
- Feng, J., Lucchinetti, E., Enkavi, G., Wang, Y., Gehrige, P., Roschitzki, B., Schaub, M. C., Tajkhorshid, E., Zaugg, K. et Zaugg, M. 2010.** Tyrosine phosphorylation by Src within the cavity of the adenine nucleotide translocase 1 regulates ADP/ATP exchange in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 298(3):C740-8.
- Ferguson-Miller, S. et Babcock, G. T. 1996.** Heme/Copper Terminal Oxidases. *Chem Rev* 96(7):2889-2908.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. et Montoya, J. 2003.** Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88(1):41-56.
- Festjens, N., van Gurp, M., van Loo, G., Saelens, X. et Vandenabeele, P. 2004.** Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. *Acta Haematol* 111(1-2):7-27.
- Finkel, T. et Holbrook, N. J. 2000.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-47.

- Finucane, D. M., Waterhouse, N. J., Amarante-Mendes, G. P., Cotter, T. G. et Green, D. R. 1999.** Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp Cell Res* 251(1):166-74.
- Follstad, B. D., Wang, D. I. et Stephanopoulos, G. 2000.** Mitochondrial membrane potential differentiates cells resistant to apoptosis in hybridoma cultures. *Eur J Biochem* 267(22):6534-40.
- Forman, H. J. et Kennedy, J. 1976.** Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 173(1):219-24.
- Frazier, A. E., Kiu, C., Stojanovski, D., Hoogenraad, N. J. et Ryan, M. T. 2006.** Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol Chem* 387(12):1551-8.
- Friedrich, T. et Bottcher, B. 2004.** The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1608(1):1-9.
- Friedrich, T., Vanheek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzschkienast, W., Hofle, G., Reichenbach, H. et al. 1994.** 2 BINDING-SITES OF INHIBITORS IN NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE (COMPLEX-I) - RELATIONSHIP OF ONE-SITE WITH THE UBIQUINONE-BINDING SITE OF BACTERIAL GLUCOSE-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE. *European Journal of Biochemistry* 219(1-2):691-698.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T. et al. 2009.** c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458(7239):762-5.
- Garcia, J. J., Morales-Rios, E., Cortes-Hernandez, P. et Rodriguez-Zavala, J. S. 2006.** The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry* 45(42):12695-703.
- Garesse, R. et Vallejo, C. G. 2001.** Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263(1-2):1-16.
- Gaspari, M., Larsson, N. G. et Gustafsson, C. M. 2004.** The transcription machinery in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3):148-52.
- Geissler, A., Krimmer, T., Bomer, U., Guiard, B., Rassow, J. et Pfanner, N. 2000.** Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell* 11(11):3977-91.
- Genova, M. L., Baracca, A., Biondi, A., Casalena, G., Faccioli, M., Falasca, A. I., Formiggini, G., Sgarbi, G., Solaini, G. et Lenaz, G. 2008.** Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):740-6.
- Gerits, N., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M. et Moens, U. 2008.** Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 20(9):1592-607.
- Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G. et Chiarugi, P. 2005.** Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol Cell Biol* 25(15):6391-403.

- Gringeri, E., Carraro, A., Tibaldi, E., D'Amico, F. E., Mancon, M., Toninello, A., Pagano, M. A., Vio, C., Cillo, U. et Brunati, A. M. 2010.** Lyn-mediated mitochondrial tyrosine phosphorylation is required to preserve mitochondrial integrity in early liver regeneration. *Biochem J* 425(2):401-12.
- Grubb, D. R., Ly, J. D., Vaillant, F., Johnson, K. L. et Lawen, A. 2001.** Mitochondrial cytochrome c release is caspase-dependent and does not involve mitochondrial permeability transition in didemnin B-induced apoptosis. *Oncogene* 20(30):4085-94.
- Guarino, M. 2010.** Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 223(1):14-26.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B. et Gupte, S. S. 1986.** The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18(5):331-68.
- Hales, K. G. 2004.** The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion* 4(4):285-308.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D. et Korsmeyer, S. J. 1999.** Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3(4):413-22.
- Harris, K. F., Shoji, I., Cooper, E. M., Kumar, S., Oda, H. et Howley, P. M. 1999.** Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24):13738-43.
- Harrison, S. C. 2003.** Variation on an Src-like theme. *Cell* 112(6):737-40.
- Hatefi, Y. 1985.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-69.
- Hatefi, Y., Haavik, A. G. et Griffiths, D. E. 1962.** Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* 237:1676-80.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A. et Thompson, C. B. 2005.** ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8(4):311-21.
- Hebert Chatelain, E., Dupuy, J. W., Letellier, T. et Dachary-Prigent, J. 2010.** Functional impact of PTP1B-mediated Src regulation on oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria. *Cell Mol Life Sci*.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A. et Augenlicht, L. H. 2005.** The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. *Cancer Res* 65(21):9861-7.
- Helling, S., Vogt, S., Rhiel, A., Ramzan, R., Wen, L., Marcus, K. et Kadenbach, B. 2008.** Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol Cell Proteomics* 7(9):1714-24.
- Herst, P. M. et Berridge, M. V. 2007.** Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1767(2):170-7.
- Hervouet, E., Cizkova, A., Demont, J., Vojtiskova, A., Pecina, P., Franssen-van Hal, N. L., Keijer, J., Simonnet, H., Ivanek, R., Kmoch, S. *et al.* 2008.** HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer. *Carcinogenesis* 29(8):1528-37.

- Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J. et Walker, J. E. 2003.** The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1604(3):135-150.
- Hochli, M. et Hackenbrock, C. R. 1976.** Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(5):1636-40.
- Hollenbeck, P. J. et Saxton, W. M. 2005.** The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23):5411-9.
- Hopper, R. K., Carroll, S., Aponte, A. M., Johnson, D. T., French, S., Shen, R. F., Witzmann, F. A., Harris, R. A. et Balaban, R. S. 2006.** Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* 45(8):2524-36.
- Horbinski, C. et Chu, C. T. 2005.** Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic Biol Med* 38(1):2-11.
- Horsefield, R., Iwata, S. et Byrne, B. 2004.** Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* 5(2):107-18.
- Hunte, C., Palsdottir, H. et Trumpower, B. L. 2003.** Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett* 545(1):39-46.
- Huttemann, M., Jaradat, S. et Grossman, L. I. 2003a.** Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb--the counterpart to testes-specific cytochrome c? *Mol Reprod Dev* 66(1):8-16.
- Huttemann, M., Kadenbach, B. et Grossman, L. I. 2001.** Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 267(1):111-23.
- Huttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H. et Doan, J. W. 2007.** Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1773(12):1701-20.
- Huttemann, M., Schmidt, T. R. et Grossman, L. I. 2003b.** A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene* 312:95-102.
- Iborra, F. J., Kimura, H. et Cook, P. R. 2004.** The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* 2:9.
- Ingle, E. 2008.** Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784(1):56-65.
- Ishizawa, R. et Parsons, S. J. 2004.** c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 6(3):209-14.
- Isidoro, A., Martinez, M., Fernandez, P. L., Ortega, A. D., Santamaria, G., Chamorro, M., Reed, J. C. et Cuezva, J. M. 2004.** Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378(Pt 1):17-20.
- Itoh, S., Lemay, S., Osawa, M., Che, W., Duan, Y., Tompkins, A., Brookes, P. S., Sheu, S. S. et Abe, J. 2005.** Mitochondrial Dok-4 recruits Src kinase and regulates NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 280(28):26383-96.
- Jacobs, L. J., de Wert, G., Geraedts, J. P., de Coo, I. F. et Smeets, H. J. 2006.** The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. *Hum Reprod Update* 12(2):119-36.

- Jenuth, J. P., Peterson, A. C., Fu, K. et Shoubridge, E. A. 1996.** Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 14(2):146-51.
- Jose, C., Hebert-Chatelain, E., Bellance, N., Larendra, A., Su, M., Nouette-Gaulain, K. et Rossignol, R. 2010.** AICAR inhibits cancer cell growth and triggers cell-type distinct effects on OXPHOS biogenesis, oxidative stress and Akt activation. *Biochim Biophys Acta*.
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L. et Vogt, S. 2010.** New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim Biophys Acta* 1800(3):205-12.
- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., Kini, V., Amoscato, A. A. et Fujii, Y. 2004.** Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic Biol Med* 37(12):1963-85.
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V. et al. 2005.** Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 1(4):223-32.
- Kang, D. et Hamasaki, N. 2005.** Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. *Ann N Y Acad Sci* 1042:101-8.
- Karni, R., Dor, Y., Keshet, E., Meyuhas, O. et Levitzki, A. 2002.** Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression under normoxia. *J Biol Chem* 277(45):42919-25.
- Keilhack, H., David, F. S., McGregor, M., Cantley, L. C. et Neel, B. G. 2005.** Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* 280(35):30984-93.
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. et Dang, C. V. 2006.** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3):177-85.
- Ko, Y. H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W. et Pedersen, P. L. 2003.** Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 278(14):12305-9.
- Ko, Y. H., Pan, W., Inoue, C. et Pedersen, P. L. 2002.** Signal transduction to mitochondrial ATP synthase: evidence that PDGF-dependent phosphorylation of the delta-subunit occurs in several cell lines, involves tyrosine, and is modulated by lysophosphatidic acid. *Mitochondrion* 1(4):339-48.
- Koehler, C. M., Lindberg, G. L., Brown, D. R., Beitz, D. C., Freeman, A. E., Mayfield, J. E. et Myers, A. M. 1991.** REPLACEMENT OF BOVINE MITOCHONDRIAL-DNA BY A SEQUENCE VARIANT WITHIN ONE GENERATION. *Genetics* 129(1):247-255.
- Krasnowska, E. K., Pittaluga, E., Brunati, A. M., Brunelli, R., Costa, G., De Spirito, M., Serafino, A., Ursini, F. et Parasassi, T. 2008.** N-acetyl-l-cysteine fosters inactivation and transfer to endolysosomes of c-Src. *Free Radic Biol Med* 45(11):1566-72.

- Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y., Vielhaber, S., Elger, C. E. et Kunz, W. S. 2004.** Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279(6):4127-35.
- Kuhajda, F. P., Jenner, K., Wood, F. D., Hennigar, R. A., Jacobs, L. B., Dick, J. D. et Pasternack, G. R. 1994.** Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14):6379-83.
- Kumar, S., Bharti, A., Mishra, N. C., Raina, D., Kharbanda, S., Saxena, S. et Kufe, D. 2001.** Targeting of the c-Ab1 tyrosine kinase to mitochondria in the necrotic cell death response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 276(20):17281-17285.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N. et Andreyev, A. 2002.** Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* 368(Pt 2):545-53.
- Lambert, A. J. et Brand, M. D. 2004a.** Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279(38):39414-20.
- Lambert, A. J. et Brand, M. D. 2004b.** Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 382(Pt 2):511-7.
- Landis, G. N. et Tower, J. 2005.** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126(3):365-79.
- Lazarou, M., Thorburn, D. R., Ryan, M. T. et McKenzie, M. 2009.** Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1793(1):78-88.
- Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Neel, B. G., Araki, T., Kucherlapati, R., Roberts, A. E. et Huttemann, M. 2010.** A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1802(2):275-83.
- Lee, I., Salomon, A. R., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, L. I. et Huttemann, M. 2005.** cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* 280(7):6094-100.
- Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K., Doan, J. W., Grossman, L. I. et Huttemann, M. 2006.** New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo. *Biochemistry* 45(30):9121-8.
- Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K., Samavati, L., Pecina, P., Pecinova, A. et Huttemann, M. 2009.** Isolation of regulatory-competent, phosphorylated cytochrome C oxidase. *Methods Enzymol* 457:193-210.
- Lee, J., Xu, Y., Chen, Y., Sprung, R., Kim, S. C., Xie, S. et Zhao, Y. 2007.** Mitochondrial phosphoproteome revealed by an improved IMAC method and MS/MS/MS. *Mol Cell Proteomics* 6(4):669-76.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G. et Genova, M. L. 2007.** The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 7 Suppl:S8-33.
- Lerner, E. C. et Smithgall, T. E. 2002.** SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat Struct Biol* 9(5):365-9.



- Lewandrowski, U., Sickmann, A., Cesaro, L., Brunati, A. M., Toninello, A. et Salvi, M. 2008.** Identification of new tyrosine phosphorylated proteins in rat brain mitochondria. *FEBS Lett* 582(7):1104-10.
- Li, L., Lorenzo, P. S., Bogi, K., Blumberg, P. M. et Yuspa, S. H. 1999.** Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 19(12):8547-58.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. et Robinson, J. P. 2003.** Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278(10):8516-25.
- Linn, T. C., Pettit, F. H. et Reed, L. J. 1969.** Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62(1):234-41.
- Lithgow, T. 2000.** Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett* 476(1-2):22-6.
- Liu, Y., Fiskum, G. et Schubert, D. 2002.** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80(5):780-7.
- Livigni, A., Scorziello, A., Agnese, S., Adornetto, A., Carlucci, A., Garbi, C., Castaldo, I., Annunziato, L., Avvedimento, E. V. et Feliciello, A. 2006.** Mitochondrial AKAP121 links cAMP and src signaling to oxidative metabolism. *Mol Biol Cell* 17(1):263-71.
- Lluis, J. M., Buricchi, F., Chiarugi, P., Morales, A. et Fernandez-Checa, J. C. 2007.** Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- $\kappa$ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* 67(15):7368-77.
- Ly, J. D., Grubb, D. R. et Lawen, A. 2003.** The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8(2):115-28.
- Maklashina, E., Kotlyar, A. B. et Cecchini, G. 2003.** Active/de-active transition of respiratory complex I in bacteria, fungi, and animals. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1606(1-3):95-103.
- Marchand, M. J., Maisin, L., Hue, L. et Rousseau, G. G. 1992.** Activation of 6-phosphofructo-2-kinase by pp60v-src is an indirect effect. *Biochem J* 285 ( Pt 2):413-7.
- Marchetti, P., Susin, S. A., Decaudin, D., Gamen, S., Castedo, M., Hirsch, T., Zamzami, N., Naval, J., Senik, A. et Kroemer, G. 1996.** Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res* 56(9):2033-8.
- Martin, G. S. 2001.** The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(6):467-75.
- Martin, J., Mahlke, K. et Pfanner, N. 1991.** Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import.  $\Delta\psi$  drives the movement of presequences. *J Biol Chem* 266(27):18051-7.
- McCarty, R. E. 1992.** A PLANT BIOCHEMIST'S VIEW OF H<sup>+</sup>-ATPases AND ATP SYNTHASES. *J Exp Biol* 172(Pt 1):431-441.
- Medes, G., Thomas, A. et Weinhouse, S. 1953.** Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res* 13(1):27-9.

- Milgraum, L. Z., Witters, L. A., Pasternack, G. R. et Kuhajda, F. P. 1997.** Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3(11):2115-20.
- Miller, J. L., Cimen, H., Koc, H. et Koc, E. C. 2009.** Phosphorylated proteins of the mammalian mitochondrial ribosome: implications in protein synthesis. *J Proteome Res* 8(10):4789-98.
- Mills, D. A. et Ferguson-Miller, S. 2003.** Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome c oxidase: lessons from other proteins. *FEBS Lett* 545(1):47-51.
- Mitchell, P. 1961.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-8.
- Miwa, S. et Brand, M. D. 2005.** The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1709(3):214-9.
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L. et Brand, M. D. 2003.** Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35(8):938-48.
- Miyazaki, T., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C. et Baron, R. 2003.** Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 160(5):709-18.
- Miyazaki, T., Tanaka, S., Sanjay, A. et Baron, R. 2006.** The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 16(2):68-74.
- Mohamed, A. S., Rivas-Plata, K. A., Kraas, J. R., Saleh, S. M. et Swope, S. L. 2001.** Src-class kinases act within the agrin/MuSK pathway to regulate acetylcholine receptor phosphorylation, cytoskeletal anchoring, and clustering. *J Neurosci* 21(11):3806-18.
- Moon, Y., Lee, K. H., Park, J. H., Geum, D. et Kim, K. 2005.** Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem* 93(5):1199-208.
- Mulkidjanian, A. Y. 2005.** Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim Biophys Acta* 1709(1):5-34.
- Murphy, M. P. 1989.** Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 977(2):123-41.
- Murphy, M. P. 2009.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1-13.
- Nakamoto, R. K., Baylis Scanlon, J. A. et Al-Shawi, M. K. 2008.** The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch Biochem Biophys* 476(1):43-50.
- Napiwotzki, J. et Kadenbach, B. 1998.** Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol Chem* 379(3):335-9.
- Navarro, A., Bandez, M. J., Gomez, C., Repetto, M. G. et Boveris, A. 2010.** Effects of rotenone and pyridaben on complex I electron transfer and on mitochondrial nitric oxide synthase functional activity. *J Bioenerg Biomembr* 42(5):405-12.
- Navarro, A. et Boveris, A. 2007.** The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2):C670-86.

- Neet, K. et Hunter, T. 1996.** Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells* 1(2):147-69.
- Neupert, W. et Herrmann, J. M. 2007.** Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:723-49.
- Newman, D. K. 2009.** The Y's that bind: negative regulators of Src family kinase activity in platelets. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:195-9.
- Niebisch, A. et Bott, M. 2003.** Purification of a cytochrome bc-aa3 supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa3 oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c1. *J Biol Chem* 278(6):4339-46.
- Nika, K., Tautz, L., Arimura, Y., Vang, T., Williams, S. et Mustelin, T. 2007.** A weak Lck tail bite is necessary for Lck function in T cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 282(49):36000-9.
- Nishikawa, Y., Ohi, N., Yagisawa, A., Doi, Y., Yamamoto, Y., Yoshida, M., Tokairin, T., Yoshioka, T., Omori, Y. et Enomoto, K. 2009.** Suppressive effect of orthovanadate on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Am J Pathol* 174(3):881-90.
- O'Brien, T. W. 2003.** Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life* 55(9):505-13.
- Ola, M. S., Nawaz, M. et Ahsan, H. 2011.** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351(1-2):41-58.
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A. et Dang, C. V. 2000.** Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275(29):21797-800.
- Pagliarini, D. J. et Dixon, J. E. 2006.** Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 31(1):26-34.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. et Klein, R. 2002.** EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 9(4):725-37.
- Papa, S., Guerrieri, F. et Capitanio, N. 1997.** A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell. *Biosci Rep* 17(1):23-31.
- Papa, S., Sardanelli, A. M., Cocco, T., Speranza, F., Scacco, S. C. et Technikova-Dobrova, Z. 1996.** The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 379(3):299-301.
- Papa, S., Scacco, S., Sardanelli, A. M., Vergari, R., Papa, F., Budde, S., van den Heuvel, L. et Smeitink, J. 2001.** Mutation in the NDUFS4 gene of complex I abolishes cAMP-dependent activation of the complex in a child with fatal neurological syndrome. *FEBS Lett* 489(2-3):259-62.
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. et Denko, N. C. 2006.** HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3(3):187-97.
- Pecina, P., Borisenko, G. G., Belikova, N. A., Tyurina, Y. Y., Pecinova, A., Lee, I., Samhan-Arias, A. K., Przyklenk, K., Kagan, V. E. et Huttemann, M. 2010.** Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration

- and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry* 49(31):6705-14.
- Perez-Martinez, X., Funes, S., Camacho-Villasana, Y., Marjavaara, S., Tavares-Carreón, F. et Shingu-Vazquez, M. 2008.** Protein Synthesis and Assembly in Mitochondrial Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8(15):1335-1350.
- Petruzzella, V., Vergari, R., Puzziferri, I., Boffoli, D., Lamantea, E., Zeviani, M. et Papa, S. 2001.** A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet* 10(5):529-35.
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B. et Richter, O. M. 1998.** Cytochrome c oxidase (heme aa<sub>3</sub>) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J Bioenerg Biomembr* 30(1):89-97.
- Phillips, D., Aponte, A. M., Covian, R. et Balaban, R. S. 2011.** Intrinsic protein kinase activity in mitochondrial oxidative phosphorylation complexes. *Biochemistry* 50(13):2515-29.
- Pocaly, M., Lagarde, V., Etienne, G., Dupouy, M., Lapaillerie, D., Claverol, S., Vilain, S., Bonneau, M., Turcq, B., Mahon, F. X. et al. 2008.** Proteomic analysis of an imatinib-resistant K562 cell line highlights opposing roles of heat shock cognate 70 and heat shock 70 proteins in resistance. *Proteomics* 8(12):2394-406.
- Poderoso, C., Converso, D. P., Maloberti, P., Duarte, A., Neuman, I., Galli, S., Maciel, F. C., Paz, C., Carreras, M. C., Poderoso, J. J. et al. 2008.** A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS One* 3(1):e1443.
- Prabu, S. K., Anandatheerthavarada, H. K., Raza, H., Srinivasan, S., Spear, J. F. et Avadhani, N. G. 2006.** Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 281(4):2061-70.
- Prochaska, L. J. et Fink, P. S. 1987.** On the role of subunit III in proton translocation in cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 19(2):143-66.
- Rashid, A., Pizer, E. S., Moga, M., Milgraum, L. Z., Zahurak, M., Pasternack, G. R., Kuhajda, F. P. et Hamilton, S. R. 1997.** Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150(1):201-8.
- Rehling, P., Pfanner, N. et Meisinger, C. 2003.** Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *J Mol Biol* 326(3):639-57.
- Reitzer, L. J., Wice, B. M. et Kennell, D. 1979.** Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254(8):2669-76.
- Remacle, C., Barbieri, M. R., Cardol, P. et Hamel, P. P. 2008.** Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Molecular Genetics and Genomics* 280(2):93-110.
- Rich, P. 2003.** The cost of living. *Nature* 421(6923):583-583.

- Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiard, B., Pfanner, N. et Chacinska, A. 2005.** The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* 353(3):485-92.
- Roskoski, R., Jr. 2004.** Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324(4):1155-64.
- Roskoski, R., Jr. 2005.** Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331(1):1-14.
- Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. et Capaldi, R. A. 2004.** Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64(3):985-93.
- Sabine, J. R., Abraham, S. et Chaikoff, I. L. 1967.** Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res* 27(4):793-9.
- Salvi, M., Brunati, A. M., Bordin, L., La Rocca, N., Clari, G. et Toninello, A. 2002.** Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1589(2):181-95.
- Salvi, M., Brunati, A. M. et Toninello, A. 2005.** Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 38(10):1267-77.
- Salvi, M., Morrice, N. A., Brunati, A. M. et Toninello, A. 2007.** Identification of the flavoprotein of succinate dehydrogenase and aconitase as in vitro mitochondrial substrates of Fgr tyrosine kinase. *FEBS Lett* 581(29):5579-85.
- Salvi, M., Stringaro, A., Brunati, A. M., Agostinelli, E., Arancia, G., Clari, G. et Toninello, A. 2004.** Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 61(18):2393-404.
- Samavati, L., Lee, I., Mathes, I., Lottspeich, F. et Huttemann, M. 2008.** Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 283(30):21134-44.
- Sardanelli, A. M., Signorile, A., Nuzzi, R., Rasmø, D. D., Technikova-Dobrova, Z., Drahota, Z., Occhiello, A., Pica, A. et Papa, S. 2006.** Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 580(24):5690-6.
- Sato, H., Sato, M., Kanai, H., Uchiyama, T., Iso, T., Ohyama, Y., Sakamoto, H., Tamura, J., Nagai, R. et Kurabayashi, M. 2005.** Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 67(4):714-22.
- Schagger, H. 1995.** Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol* 260:190-202.
- Schagger, H. 2001.** Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52(3-5):119-28.
- Schapira, A. H. 1998.** Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):225-33.
- Schleyer, M. et Neupert, W. 1985.** Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43(1):339-50.

- Schleyer, M., Schmidt, B. et Neupert, W. 1982.** Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem* 125(1):109-16.
- Schmidt, H., Siems, W., Muller, M., Dumdey, R. et Rapoport, S. M. 1991.** ATP-producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases. *Exp Cell Res* 194(1):122-7.
- Schulenberg, B., Aggeler, R., Beechem, J. M., Capaldi, R. A. et Patton, W. F. 2003.** Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *J Biol Chem* 278(29):27251-5.
- Selivanov, V. A., Zeak, J. A., Roca, J., Cascante, M., Trucco, M. et Votyakova, T. V. 2008.** The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* 283(43):29292-300.
- Semenza, G. L. 2007.** HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):231-4.
- Shani, V., Bromberg, Y., Sperling, O. et Zoref-Shani, E. 2009.** Involvement of Src tyrosine kinases (SFKs) and of focal adhesion kinase (FAK) in the injurious mechanism in rat primary neuronal cultures exposed to chemical ischemia. *J Mol Neurosci* 37(1):50-9.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R. et Dang, C. V. 1997.** c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6658-63.
- Shoubridge, E. A. et Wai, T. 2007.** Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol* 77:87-111.
- Simon, M., Spahr, P. F. et Dainous, F. 1989.** The proteins associated with the soluble form of p36, the main target of the src oncogene product in chicken fibroblasts, are glycolytic enzymes. *Biochem Cell Biol* 67(10):740-8.
- Simonnet, H., Demont, J., Pfeiffer, K., Guenaneche, L., Bouvier, R., Brandt, U., Schagger, H. et Godinot, C. 2003.** Mitochondrial complex I is deficient in renal oncocytomas. *Carcinogenesis* 24(9):1461-6.
- Smolkova, K., Bellance, N., Scandurra, F., Genot, E., Gnaiger, E., Plecita-Hlavata, L., Jezek, P. et Rossignol, R. 2010.** Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *J Bioenerg Biomembr* 42(1):55-67.
- Sondhi, D., Xu, W., Songyang, Z., Eck, M. J. et Cole, P. A. 1998.** Peptide and protein phosphorylation by protein tyrosine kinase Csk: insights into specificity and mechanism. *Biochemistry* 37(1):165-72.
- Sone, N., Sekimachi, M. et Kutoh, E. 1987.** Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc1 complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *J Biol Chem* 262(32):15386-91.
- Song, C., Vondriska, T. M., Wang, G. W., Klein, J. B., Cao, X., Zhang, J., Kang, Y. J., D'Souza, S. et Ping, P. 2002.** Molecular conformation dictates signaling module formation: example of PKCepsilon and Src tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(3):H1166-71.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. et Brand, M. D. 2002.** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277(47):44784-90.

- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S. et Beal, M. F. 2004.** Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24(36):7779-88.
- Steiner, A. W. et Smith, R. A. 1981.** Endogenous protein phosphorylation in rat brain mitochondria: occurrence of a novel ATP-dependent form of the autophosphorylated enzyme succinyl-CoA synthetase. *J Neurochem* 37(3):582-93.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G. et Walker, J. E. 2000.** The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10(6):672-9.
- Stover, D. R., Furet, P. et Lydon, N. B. 1996.** Modulation of the SH2 binding specificity and kinase activity of Src by tyrosine phosphorylation within its SH2 domain. *J Biol Chem* 271(21):12481-7.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. et Schagger, H. 2004.** Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 279(6):5000-7.
- Sutovsky, P. 2003.** Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microscopy Research and Technique* 61(1):88-102.
- Szabadkai, G., Simoni, A. M. et Rizzuto, R. 2003.** Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake requires sustained Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278(17):15153-61.
- Taanman, J. W. 1999.** The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410(2):103-23.
- Takehige, K. et Minakami, S. 1979.** NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J* 180(1):129-35.
- Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A. M., Speranza, F., Scacco, S., Signorile, A., Lorusso, V. et Papa, S. 2001.** Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of mammalian mitochondrial proteins: enzyme and substrate characterization and functional role. *Biochemistry* 40(46):13941-7.
- Thomas, S. M. et Brugge, J. S. 1997.** Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:513-609.
- Tibaldi, E., Brunati, A. M., Massimino, M. L., Stringaro, A., Colone, M., Agostinelli, E., Arancia, G. et Toninello, A. 2008.** Src-Tyrosine kinases are major agents in mitochondrial tyrosine phosphorylation. *J Cell Biochem* 104(3):840-9.
- Tretter, L., Takacs, K., Hegedus, V. et Adam-Vizi, V. 2007.** Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in brain mitochondria. *J Neurochem* 100(3):650-63.
- Trezeguet, V., Pelosi, L., Lauquin, G. J. et Brandolin, G. 2008.** The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J Bioenerg Biomembr* 40(5):435-43.
- Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M. et al. 2003.** The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26):15304-9.

- Turrens, J. F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(Pt 2):335-44.
- Ushakova, A. V., Duarte, M., Vinogradov, A. D. et Videira, A. 2005.** The 29.9 kDa subunit of mitochondrial complex I is involved in the enzyme active/de-active transitions. *Journal of Molecular Biology* 351(2):327-333.
- van der Geer, P., Hunter, T. et Lindberg, R. A. 1994.** Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337.
- van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. et Vandenabeele, P. 2003.** Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3):487-97.
- Videira, A. 1998.** Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 1364(2):89-100.
- Villani, G. et Attardi, G. 1997.** In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4):1166-71.
- Villani, G., Greco, M., Papa, S. et Attardi, G. 1998.** Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem* 273(48):31829-36.
- Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. et Gygi, S. P. 2007.** Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5):1488-93.
- Vinogradov, A. D. et Grivennikova, V. G. 2001.** The mitochondrial complex I: Progress in understanding of catalytic properties. *IUBMB Life* 52(3-5):129-134.
- Vogel, R. O., Smeltink, J. A. M. et Nijtmans, L. G. J. 2007.** Human mitochondrial complex I assembly: A dynamic and versatile process. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767(10):1215-1227.
- Vosseller, K., Hansen, K. C., Chalkley, R. J., Trinidad, J. C., Wells, L., Hart, G. W. et Burlingame, A. L. 2005.** Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics* 5(2):388-98.
- Votyakova, T. V. et Reynolds, I. J. 2001.** DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79(2):266-77.
- Wallace, D. C. 2001.** Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(3):158-66.
- Wallace, D. C. 2005.** Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:363-74.
- Warburg, O. 1956.** On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309-14.
- Warburg, O., Wind, F. et Negelein, E. 1927.** The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8(6):519-30.
- Watmough, N. J. et Frerman, F. E. 2010.** The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1797(12):1910-6.
- Wheeler, D. L., Iida, M. et Dunn, E. F. 2009.** The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 14(7):667-78.



- Wiesmann, C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. A., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M. et al. 2004.** Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol* 11(8):730-7.
- Williams, S. L., Valnot, I., Rustin, P. et Taanman, J. W. 2004.** Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem* 279(9):7462-9.
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B. et al. 2008.** Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):18782-7.
- Wise, D. R. et Thompson, C. B. 2010.** Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* 35(8):427-33.
- Wittig, I., Braun, H. P. et Schagger, H. 2006.** Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1(1):418-28.
- Wojtczak, L. et Wieckowski, M. R. 1999.** The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31(5):447-55.
- Yamaguchi, H. et Hendrickson, W. A. 1996.** Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384(6608):484-9.
- Yeatman, T. J. 2004.** A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4(6):470-80.
- Yu, H., Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K. et Huttemann, M. 2008.** Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):1066-71.
- Yu, M., Shi, Y., Wei, X., Yang, Y., Zhou, Y., Hao, X., Zhang, N. et Niu, R. 2007.** Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 170(1):83-93.
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. et Kroemer, G. 1996.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183(4):1533-44.
- Zhang, F. X., Pan, W. et Hutchins, J. B. 1995.** Phosphorylation of F1F0 ATPase delta-subunit is regulated by platelet-derived growth factor in mouse cortical neurons in vitro. *J Neurochem* 65(6):2812-5.
- Zhang, J., Xing, D. et Gao, X. 2008.** Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol* 217(2):518-28.
- Zhang, L., Yu, L. et Yu, C. A. 1998.** Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 273(51):33972-6.
- Zhang, Y. et Dong, C. 2007.** Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 64(21):2771-89.
- Zheng, X. M., Resnick, R. J. et Shalloway, D. 2000.** A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J* 19(5):964-78.
- Zhu, S., Bjorge, J. D. et Fujita, D. J. 2007.** PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res* 67(21):10129-37.

Je dois absolument remercier tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, durant ma thèse.

Bien sûr, un grand merci à mes deux directeurs de thèse: Jeanne, pour sa grande disponibilité et nos discussions passionnées, et Thierry, pour son aide, sa bonne humeur et ses nombreux conseils. J'ai grandement bénéficié de votre expérience et j'espère pouvoir perpétuer votre passion dans ma carrière.

De grands mercis à tous les collègues du laboratoire U688, pour nos nombreuses discussions, échanges, soirées... Amal, Denis, Claire, Elodie, Nicolas, Margit, Christophe, Nadège, Giovanni, Su, Rodrigue...

Bien que je m'en sois éloignée durant cette période, je dois aussi un grand merci à toute la famille, pour leur support et leur confiance inconditionnels... Je reviendrai un jour...

Et non les moindres, ma petite tribu, Caro et Louis, sans qui rien ne serait possible, qui ne se plaignent jamais de rien, qui me supportent... pour la vie...

Où que je serai, vous serez toujours les bienvenus à la maison...

A bientôt

Etienne