



HAL
open science

Approche multifonctionnelle mitochondriale par puce à ADN dédiée

Matthieu Arvier

► **To cite this version:**

Matthieu Arvier. Approche multifonctionnelle mitochondriale par puce à ADN dédiée. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00347977

HAL Id: tel-00347977

<https://theses.hal.science/tel-00347977>

Submitted on 17 Dec 2008

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

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

APPROCHE MULTIFONCTIONNELLE MITOCHONDRIALE PAR PUCE Á ADN DÉDIÉE

Thèse de doctorat

Spécialité : Biochimie, biologie moléculaire

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 31/01/2008

à : Angers

par : ARVIER Matthieu

Devant le jury ci-dessous :

M. Rémi Burcelin (Rapporteur), Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse
M. Rémi Houlgatte (Rapporteur), Directeur de recherche INSERM U533, Nantes
M. Yves Malthièry (Examineur), Professeur, Université d'Angers
M. Vincent Rohmer (Examineur), Professeur, Université d'Angers

Personne invitée

M. Gilles Simard, Docteur, Université d'Angers

Directeur de thèse : RITZ Patrick

Nom et coordonnées du Laboratoire : Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire –
CHU d'Angers – INSERM U694 (Pr. Yves MALTHIÈRY)

ED 363

Si les faits ne correspondent pas à la théorie, changez les faits.

Albert Einstein

Je tiens à adresser mes remerciements aux personnes suivantes :

Messieurs *Rémi Burcelin* et *Rémi Houlgatte* pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Recevez ici toute ma gratitude et ma reconnaissance pour le temps et l'énergie que vous avez consacrés à l'évaluation de ce travail.

Messieurs *Yves Malthièry*, *Vincent Rohmer* pour avoir accepté de prendre part au jury et pour l'attention que vous avez portée à ce travail de thèse. Je tiens également à remercier particulièrement monsieur *Yves Malthièry* pour son accueil au sein de son équipe de recherche.

Monsieur *Patrick Ritz* pour avoir dirigé ce travail de thèse avec sympathie et disponibilité. Je tiens également à le remercier pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse mais également pour m'avoir accompagné dans la réalisation de mon projet professionnel.

Monsieur *Gilles Simard* pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté tout au long de ma thèse et pour ces longues discussions au sujet des articles issus de ces trois années de collaboration.

La région *Pays-de-Loire* pour avoir financé ce travail de thèse.

Messieurs *Jean-François Dumas, Gyasi Johnson* et *Jean-Fred Fontaine*, Mesdemoiselles *Laëtitia Lagoutte, Caroline Jacques* et *Virginie Guillet* pour leur aide technique, leur conseil mais avant tout pour les bons moments passés ensemble à faire avancer ses travaux de thèse.

Tous les membres de l'unité INSERM U694, *Mélissa, Valérie, Julie, Julien, Delphine, Soazig, Marion, Arnaud, Chadi, Jocelyne, Dominique, Marie-anne, Françoise, Pierre-henri, Pascal et Frederique*. Merci pour vos conseils, votre bonne humeur et tous ces moments inoubliables passés sur la paillasse ou autour d'un café.

Tout le *personnel du Laboratoire de biochimie et de Biologie moléculaire du CHU d'Angers* pour son accueil et son aide tout au long de ces trois années de thèse.

Tout le *personnel de la plate forme transcriptome de Ouest Genopôle* à Nantes pour leur accueil et leur aide lors de la réalisation et de l'exploitation de Mitoligos. Je tiens à remercier particulièrement Madame *Catherine Chevallier* et Monsieur *Jean Léger* sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été réalisable.

Enfin, j'aimerais remercier particulièrement *fanny, mes parents, mes grands-parents et mes frères* pour leur soutien et leur présence pendant ces trois années. Sans vous rien de tout ça n'aurait été possible.

Liste des abréviations

ADP : Adenosine Di-Phosphate
AMPK : Adenosine Monophosphate Kinase
ANT : Adenine Nucleotide Translocator
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
CCK : Cholécystokinine
COX : Cytochrome c oxidase
CPT-1 : Carnitine palmytoil transferase 1
DNP : Dinitrophenol
ERR- α : Estrogen related receptor alpha
e⁻ : électron
FADH₂ : flavin adenine dinucleotide
FCCP : Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
HK : Hexokinase
H⁺ : Proton
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide
MCAD : Malonyl-CoA Decarboxylase
NRF-1 : Nuclear Respiratory factor 1
NRF-2 : Nuclear respiratory factor 2
OXM : Oxmoduline
PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1 : PPAR γ coactivator 1
PTU : 6-propyl-thiouracil
PYY : Peptide YY
ROS : Reactive oxygene species
T2 : Di-iodo thyronine
T3 : Tri-iodi-thyronine
T4 : Thyroxine
TMPD : N-N-N'-N' Tetra Méthyl-p-Phenyl Diamine
TPMP : Triphenyl-methyl-phosphonium

UCP : Uncoupling protein

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
I) La fonction énergétique mitochondriale	9
1) La phosphorylation oxydative	9
2) Régulation du rendement de la conversion énergétique mitochondriale.	10
A. Découplage extrinsèque de la phosphorylation oxydative.....	11
1. Fuite de protons Basale.....	11
2. Fuite de protons inductible	13
B. Découplage intrinsèque de la phosphorylation oxydative.....	14
1) Stœchiométrie H ⁺ /e ⁻	14
2. Stœchiométrie H ⁺ /ATP	15
II) Régulation du métabolisme énergétique	16
1) Régulation Hormonale du métabolisme énergétique	16
a) Rôle des hormones thyroïdiennes	16
b) Leptine.....	17
c) Hormones Gastro-intestinales	19
<i>La ghreline</i>	19
<i>La cholecystokinine (CCK)</i>	21
<i>Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)</i>	21
<i>Peptide YY (PYY)</i>	22
<i>Oxyntomoduline (OXM)</i>	23
D) Régulation du métabolisme énergétique hépatique par le couple insuline/SREBP-1C	24
2) PGC-1 un co-activateur impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique	25
A. PGC-1 et le métabolisme des substrats	25
B. PGC-1 et biogénèse mitochondriale.....	27
C. PGC-1 et le découplage.....	29
III) Adaptations du métabolisme mitochondrial lors de stress énergétique	30
1) La restriction calorique	30
A. Restriction calorique et dépense énergétique de repos.....	30
B. Restriction calorique et métabolisme mitochondrial hépatique	31
C. Restriction calorique et le métabolisme des substrats énergétiques.....	32
2) L'hypermétabolisme : le rat traité par dexaméthasone	33
A. Les glucocorticoïdes et le métabolisme énergétique.....	34
B. Métabolisme mitochondrial hépatique chez le rat traité par dexaméthasone.....	35
IV) Etude à haut-débit du transcriptome : les puces à ADN	36
1) Les différentes puces à ADN	36
A. La technologie Affymetrix : les puces à oligonucléotides	37
B. Les microarrays sur lame de verre	37
2) Exploitation des données de puces à ADN	37
3) Une puce à ADN dédiée au métabolisme : la MitoLogo	40
PREMIER ARTICLE	41
Introduction	41
Résultats complémentaires	44
Discussion et perspectives	46
DEUXIÈME ARTICLE	56

Introduction	56
Synergy between glucocorticoids and thyroid hormone promotes oxidative phosphorylation in hypermetabolic rat	58
Discussion et perspectives	76
TROISIÈME ARTICLE	78
Introduction	78
Dexamethasone effects on energy metabolism in rat: switching the whole metabolism toward ATP synthesis.	80
Discussion et perspectives	96
QUATRIÈME ARTICLE	99
Introduction	99
Does short-term caloric restriction and fasting slow down the ageing process: a comparative study using both microarray and bioenergetics?	101
Discussion et perspectives	122
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	125
BIBLIOGRAPHIE	129
FICHES TECHNIQUES	153
Fiche Technique n°1	153
Fiche technique n°2 :.....	154
Fiche technique n°3 :.....	155
Fiche technique n°4	158
Fiche technique n°5 :.....	161
Fiche technique n°6 :.....	163
Fiche technique n°7 :.....	166
Fiche technique n°8 :.....	168
Fiche technique n°9	170
Fiche technique n°10 :.....	173
Fiche technique n°11 :.....	175
Fiche technique n°12 :.....	176

INTRODUCTION

I) La fonction énergétique mitochondriale

1) La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est la principale voie de synthèse d'ATP dans la cellule eucaryote. Cette réaction a lieu sur la membrane interne mitochondriale. La synthèse d'ATP est couplée à la consommation d'oxygène et représente 80% de la consommation d'oxygène, au niveau de la mitochondrie (Rolfe et Brown, 1997). D'autre part, 90% de la consommation d'oxygène de repos (métabolisme de base au niveau du corps entier), chez les mammifères, est d'origine mitochondriale (Rolfe et Brown, 1997). Ainsi, les deux éléments constitutifs de la phosphorylation oxydative que sont la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP sont au centre du métabolisme (cf. figure 1).

La respiration consiste en une série de réactions d'oxydo-réduction entre différents donneurs d'électrons ($\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2) provenant de la dégradation des métabolites issus de l'alimentation (carbohydrates, acides gras...), vers un accepteur final, l'oxygène. Ce transfert d'électrons est réalisé par les 4 complexes enzymatiques (la NADH déshydrogénase ou complexe I, la succinate déshydrogénase ou complexe II, la cytochrome c réductase ou complexe III et la cytochrome c oxydase ou complexe IV (COX) composant la chaîne respiratoire. Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert d'électron est couplé à un pompage de protons au travers de la membrane interne mitochondriale vers l'espace intermembranaire, aboutissant ainsi à la formation d'un gradient électrochimique de protons appelé aussi force proton-motrice (Δp), qui est la somme du potentiel de membrane ($\Delta \Psi$) et du gradient de pH (ΔpH) résultant du passage des protons au travers la membrane. La F₀-F₁ ATP-synthétase (ou complexe V), utilise l'énergie formée par la force proton-motrice pour coupler le retour de protons vers la matrice mitochondriale avec la phosphorylation d'ADP en ATP. Le phosphate inorganique (P_i), nécessaire pour cette réaction, est importé dans la mitochondrie par le transporteur de phosphate. L'ATP formé est exporté dans le cytosol, en échange d'ADP, par la translocase des nucléotides adényliques (ANT). L'ensemble de ces réactions est désigné sous le terme phosphorylation oxydative et explique la synthèse d'ATP à partir des nutriments selon la théorie du couplage chimiosmotique (Mitchell, 1961). Comme

toute réaction chimique, la phosphorylation oxydative est régie par les principes de la thermodynamique, l'énergie n'est ni créée, ni détruite, mais transformée, cette conversion d'énergie ne peut pas se faire avec un rendement de 100% (2^{ème} principe de la thermodynamique), une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur.

Ainsi, toutes les activités métaboliques de la mitochondrie doivent être régulées en tenant compte de cette notion de rendement de conversion d'énergie. De plus, toute activité métabolique s'accompagne inévitablement d'une dissipation d'énergie sous forme de chaleur appelée thermogénèse.

Cependant, les demandes en énergie dépendent de l'état physiologique et pathologique de l'organisme. La phosphorylation oxydative est donc régulée de manière à assurer le taux de synthèse d'ATP (et par conséquent l'intensité de la respiration) mais également l'efficacité de la synthèse d'ATP. Ainsi, le taux de synthèse d'ATP en fonction de la consommation d'oxygène associée (mesuré par le rapport ATP/O) est une mesure de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Quand on ne considère que le taux de synthèse d'ATP, on parle alors de rendement de la phosphorylation oxydative. Enfin, Stucki et al. (1980) ont montré que la mitochondrie doit remplir des « missions physiologiques » ainsi, pour produire une quantité maximale d'énergie la mitochondrie doit réduire l'efficacité de la phosphorylation oxydative, ou au contraire, augmenter l'efficacité pour économiser la réserve d'énergie. Il est donc fondamental pour la mitochondrie d'être capable d'ajuster son efficacité et/ou son rendement de manière à combler les besoins énergétiques de l'organisme tout en limitant au maximum le gaspillage d'énergie.

Ainsi, tous les phénomènes affectant les besoins ou les apports en énergie cellulaire entraînent inévitablement une réponse de la part de la mitochondrie qui devra adapter son rendement ou son efficacité de manière à subvenir aux besoins ou à optimiser l'utilisation des ressources dont elle dispose. Il est donc important de bien comprendre tous les moyens dont dispose la phosphorylation oxydative pour ajuster son rendement et/ou son efficacité.

2) Régulation du rendement de la conversion énergétique mitochondriale.

L'efficacité de la phosphorylation oxydative dépend essentiellement du couplage de la réaction évalué par le rapport ATP/O. Ainsi, tous les phénomènes pouvant modifier le couplage (et donc l'efficacité) de la phosphorylation oxydative permettent de réguler le fonctionnement de la conversion énergétique et donc son rendement. Tous les phénomènes affectant la capacité du complexe V à phosphoryler l'ADP et/ou tous les phénomènes

affectant le fonctionnement de la chaîne respiratoire entraînent des modifications du rapport ATP/O. On distingue ainsi deux types de découplages, celui qui affecte le maintien du gradient de protons, le « découplage extrinsèque » et celui affectant l'efficacité du pompage des protons, le « découplage intrinsèque ». Le découplage extrinsèque concerne ainsi tous les phénomènes agissant sur la fuite de protons alors que le découplage intrinsèque concerne ceux agissant sur la stœchiométrie des pompes à protons (H^+/e^- ou H^+/ATP).

A. Découplage extrinsèque de la phosphorylation oxydative

Le découplage extrinsèque concerne tout les phénomènes pouvant d'une façon ou d'une autre augmenter la perméabilité membranaire aux protons. La membrane ainsi « perméabilisée » permettra une fuite plus importante des protons vers l'espace inter membranaire, diminuant ainsi le gradient de protons, entraînant par conséquent une diminution du rendement et de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. L'augmentation de la fuite de protons peut être de deux types, basale ou inducible.

1. Fuite de protons Basale.

En condition non-phosphorylante, le retour des protons pompés par la chaîne respiratoire dans la matrice est lié uniquement à l'imperméabilité partielle de la membrane interne. C'est Nicholls (1974) qui le premier montra que cette fuite de protons augmentait de façon non-linéaire en fonction de l'intensité du potentiel de membrane. De nombreux facteurs peuvent influencer cette fuite de protons. Le statut thyroïdien influence l'intensité de la fuite de protons dans les mitochondries de foie, la fuite de protons corrèle avec le taux circulant d'hormones thyroïdiennes, elle est par exemple plus importante chez le rat hyperthyroïdien. Il a également été montré que l'importance de la fuite basale de protons variait selon les espèces (Hafner et al. 1988 ; Brand et al. 1991). La fuite de protons basale de l'ensemble des organes représenterait 20 à 25% de la dépense énergétique de repos chez le rongeur (Rolfe et Brand 1996). Il apparaît alors essentiel de s'intéresser aux mécanismes pouvant faire varier la perméabilité de la membrane aux protons. De telles variations pourraient alors expliquer une partie des variations constatées de la dépense énergétique de repos dans certaines situations physiologiques mais également constituer un moyen de régulation du rendement de la synthèse d'ATP.

De nombreux paramètres peuvent influencer la fuite de protons. Celle-ci pourrait notamment varier sous l'influence d'une modification de la surface de la membrane interne de la mitochondrie. Ainsi, plus la surface membranaire est importante (évaluée par le rapport mg phospholipides totaux/mg protéines mitochondriales), plus la fuite de protons est élevée (flux protons par mg protéines mitochondriales). Il semble également que les modifications des propriétés intrinsèques de la membrane interne pourraient jouer un rôle dans les variations de la fuite de protons, et notamment le contenu en acide gras de cette membrane et la composition de ces acides gras (Fontaine et al. 1996; Porter et al. 1996; Brand et al. 2003). La fuite de protons mitochondriale hépatique corrèle positivement avec la concentration d'acides gras polyinsaturés mais également avec l'index d'insaturation des acides gras composant les phospholipides de cette membrane. A l'inverse elle corrèle négativement avec le taux en acides gras monoinsaturés et le taux d'acide linoléique (18:2 n-6) (Fontaine et al., 1996; Porter et al., 1996; Brand et al., 2003). Ainsi, les différences dans la composition de la membrane mitochondriale expliquent les différences d'intensité de fuite de protons entre différentes espèces (Brand et al, 2003). Parmi les phospholipides, une catégorie joue un rôle déterminant dans les variations de la fuite de protons, les cardiolipines. En effet, l'ajout *in vitro* de cardiolipines dans des mitochondries isolées de foie entraîne une fuite de protons augmentée associée avec un léger découplage de la phosphorylation oxydative (Bobyleva et al. 1997). De la même façon, Hoch a répertorié de nombreuses études montrant que la fuite de protons constatée à l'état 4 (cf. figure 2) de la respiration corrèle avec le taux de cardiolipines dans le foie et le cœur de rat (Hoch 1998).

Récemment, Brand et al. (2005) ont montré que l'intensité de la fuite de protons était directement corrélée à la quantité d'ANT présent sur la membrane mitochondriale (Brand et al. 2005). Ainsi, dans des modèles animaux où la quantité d'ANT variait, la fuite de protons basale était proportionnelle aux variations de quantité d'ANT. De plus, cette variation de la fuite de protons était présente également lorsque l'ANT était inactivée en présence de carboxyatractylate. Ainsi, la seule présence à la membrane de la protéine expliquait la présence de la fuite de protons et ses variations. Il est important de noter que l'ANT n'est pas le seul transporteur impliqué dans des mécanismes de variations de la fuite de protons, mais contrairement aux autres transporteurs (tel que les UCPs) c'est le seul dont la présence et non l'activité influence la perméabilité membranaire.

La fuite de protons pourrait également prendre part à l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générés par l'activité de la chaîne respiratoire. La diminution du potentiel de membrane aurait pour conséquence de diminuer la génération de ROS au sein de

la mitochondrie (Brand, 2000). Il a ainsi été montré qu'une diminution de 10% du potentiel de membrane résulte en une diminution de 75% du taux de production de radicaux libres dans la mitochondrie (Korshunov et al. 1997). De même, dans la levure $MnSOD^{-/-}$, l'ajout de CCCP, un agent chimique découplant, protège les levures contre l'augmentation du stress oxydatif (Longo 1999). Enfin, dans le foie de rat perfusé, l'infusion d'un découplant (DnP) induit une diminution de la synthèse de H_2O_2 (Okuda et al. 1992).

2. Fuite de protons inductible

Contrairement à la fuite de protons basale, la fuite de protons inductible n'est pas naturellement présente dans toutes les mitochondries de tous les tissus. De plus, cette fuite de protons n'est pas non plus présente dans toutes les situations physiopathologiques. La fuite de protons inductible regroupe tous les phénomènes faisant intervenir des protéines pour mettre en place un transport facilité des protons au travers de la membrane interne mitochondriale. Parmi les protéines susceptibles d'avoir une telle activité de transport des protons, on peut citer les UCPs. Depuis la découverte d'UCP1, protéine découplante spécifique du tissu adipeux brun est impliquée dans la thermogénèse adaptative chez le rongeur, d'autres protéines aux séquences homologues ont été découvertes (UCP2, 3, 4 et 5; Fleury et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997; Sanchis et al., 1998; Mao et al., 1999). Hormis UCP1, aucune autre protéine découplante n'a été impliquée dans un processus de thermogénèse dans aucun autre organe que le tissu adipeux brun. En revanche, de nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle de ces protéines découplantes dans la régulation de la production de radicaux libres.

Il a été montré que l'inactivation d'UCP2 ou d'UCP3 par différentes techniques entraînait une augmentation de la production d' H_2O_2 chez les rongeurs (Negre-Salvayre et al. 1997, Skulachev 1999, Arsenijevic et al. 2000; Vidal-Puig et al. 2000; Brand et al. 2002, Duval et al. 2002). D'autre part, les travaux d'Echtay ont montré que les ROS étaient des coactivateurs obligatoires des UCPs (Echtay et al. 2002; Echtay et al. 2003; Talbot et al. 2004). En effet, bien que le découplage modéré semble diminuer la production de ROS, il apparaît que les ROS sont nécessaires à l'induction du découplage par les UCPs. Ainsi, bien que les fonctions physiologiques d'UCP2 et d'UCP3 restent discutées, il semblerait que ces protéines soient au cœur d'une boucle de régulation impliquant un équilibre entre le taux de fuite de protons (basale et inductible) et la production de ROS (Echtay 2007). Parmi les coactivateurs identifiés, on peut citer les dérivés lipidiques de peroxydation dont le 4-hydroxynonanal, (Echtay et al, 2003).

Enfin, on peut également signaler qu'une fuite de protons induite par les acides gras a aussi été suggérée pour d'autres transporteurs d'anions mitochondriaux tels que l'ANT et l'antiport glutamate/aspartate (Samartsev et Mokhova, 1997, 2001; Wojtczak et Wieckowski, 1999).

B. Découplage intrinsèque de la phosphorylation oxydative

Le découplage intrinsèque concerne tout les phénomènes qui entraînent une diminution de l'efficacité du pompage de protons au travers de la membrane par les complexes de la chaîne respiratoire (stœchiométrie H^+/e^-) ou qui diminuent l'efficacité du retour des protons au travers de la F1-F0 ATP Synthase (rapport H^+/ATP). A la différence du découplage extrinsèque, le découplage intrinsèque n'est pas couplé à une diminution de la force proton-motrice. On distingue 1) le "slip-redox" (ou « patinage » des pompes à protons au sein de la chaîne respiratoire) qui résulte en un pompage d'un nombre réduit de protons pour un même taux de transport d'électrons dans la chaîne respiratoire, conduisant ainsi à une augmentation de l'oxydation de donneurs réduits (perte d'énergie redox) pour le maintien d'un même gradient de protons, 2) le découplage de l'ATP synthétase (ou « patinage » de la pompe à protons au sein du complexe ATP-synthétase) qui résulte en une stœchiométrie H^+/ATP augmentée conduisant ainsi à une diminution de la synthèse d'ATP pour un nombre donné de protons pompés.

1) Stœchiométrie H^+/e^-

Ce découplage résulte d'une diminution du nombre de protons pompés par un complexe de la chaîne respiratoire pour un nombre d'électron donné transféré sur la chaîne respiratoire. Un tel découplage est en théorie possible au niveau de tout les complexes capables de pomper des protons au travers la membrane interne mitochondriale. Cependant, *In vivo* il semble que seule la Cytochrome c oxidase (COX) soit sujet à de telles variations de sa stœchiométrie (Azzone 1985, Murphy 1989, Papa 1994). Il est admis chez les eucaryotes, comme chez les procaryotes, que la stœchiométrie H^+/e^- de la COX soit de 1 (Babcock et Wikstrom 1992). Il est intéressant de noter que si la stœchiométrie de la COX diminuerait de 1 à 0, le degré de couplage de la chaîne (q) serait également diminué, à 0.8 (soit 80% de l'efficacité maximale théorique possible), car le nombre de protons pompés pour 2 électrons transférés sur la chaîne passerait de 10 à 8. Or, cette valeur de q correspondrait au q théorique

calculé par Stucky pour une situation où la synthèse d'ATP serait maximale ($q_t=0.786$). De la même manière, si la stœchiométrie de la COX était diminuée à 0.5, la valeur de q correspondrait une nouvelle fois au q théorique calculé par Stucky ($q=0.90$ pour $q_t=0.91$) pour une « mission » physiologique consistant à synthétiser le maximum d'ATP avec une efficacité optimale (Kadenbach 2003). Ce constat permet donc d'affirmer qu'une variation de la stœchiométrie H^+/e^- pourrait se révéler une stratégie très efficace pour la mitochondrie dans le but d'adapter son rendement et son efficacité à la situation physiologique à laquelle elle est confrontée.

Il existe de nombreuses situations pour lesquelles une variation de la stœchiométrie de la COX a été montrée. La stœchiométrie de la Cox serait ainsi diminuée par l'augmentation du potentiel de membrane (Murphy and Brand 1988). De même, elle serait fonction de l'isoforme de la sous-unité VIA présente dans le complexe enzymatique qui est elle-même tissu spécifique (Kadenbach 2003). Enfin, il a été montré que les variations du nombre de cytochrome (notamment $a+a_3$) constituant la COX étaient associées à des variations de son activité ou de sa stœchiométrie (Piquet et al. 2000, Nogueira et al 2001).

2. Stœchiométrie H^+/ATP

Dans certaines situations physiologiques, il a été montré que le nombre de molécules d'ADP phosphorylées par proton passant dans le complexe ATP-synthétase n'est pas constant (stœchiométrie H^+/ATP ; Kadenbach, 2003). Par conséquent, bien qu'il n'y ait pas de diminution du taux de la respiration mitochondriale, l'efficacité de la phosphorylation est diminuée et un tel mécanisme est susceptible d'affecter le rapport ATP/O car pour une consommation d'oxygène donnée, il faudra le retour de plus de protons pour synthétiser une même quantité d'ATP. Une telle variation de la stœchiométrie H^+/ATP est théoriquement possible et a été montrée diminuée *in vitro*. Le traitement de mitochondries isolées de foie de rat avec de l'almitrine induit une augmentation du rapport H^+/ATP tout en diminuant le rapport ATP/O (Rigoulet et al, 1990). Cependant, l'importance *in vivo* d'une telle régulation sur l'ATP demeure discutée et reste très méconnue à ce jour.

De nombreux mécanismes peuvent affecter l'efficacité et/ou le rendement de la phosphorylation oxydative. Ainsi, la mitochondrie dispose de nombreux outils pour répondre aux besoins de la cellule en ATP mais également pour s'adapter à des diminutions des apports énergétiques à ces mêmes cellules. C'est pourquoi, il apparaît tout à fait intéressant de penser

que la mitochondrie peut être le centre régulateur de la réponse à différents stress énergétiques que l'on rencontre classiquement dans les situations de restrictions caloriques ou d'hypermétabolisme. Il est donc tout à fait concevable de tenter d'expliquer les adaptations à ces situations de stress énergétiques par des adaptations métaboliques axées autour du fonctionnement du métabolisme mitochondrial.

II) Régulation du métabolisme énergétique

1) Régulation Hormonale du métabolisme énergétique

a) Rôle des hormones thyroïdiennes

Les deux formes principales d'hormones thyroïdiennes sont la thyroxine (T4) et la tri-iodo-thyronine (T3). Elles résultent de l'iodation de la tyrosine. Ces deux composés, sont synthétisés par la thyroïde. La thyroïdostimuline (TSH), hypophysaire sous l'action de la thyrolibérine (TRH) hypothalamique, est capable de stimuler le mécanisme d'iodation.

La T3 est l'hormone thyroïdienne la plus active (Samuels, 1988). La T4, considérée comme une pro-hormone, peut constituer un stock périphérique car elle est métabolisée en T3 par une monodésiodation au niveau du foie et des reins (70 à 80% de la T3 aurait cette origine).

Les hormones thyroïdiennes ont longtemps été considérées comme le régulateur principal du métabolisme énergétique mitochondriale mais également comme un régulateur majeur du métabolisme des protéines, des lipides et des glucides (Soboll, 1993). Les hormones thyroïdiennes sont particulièrement actives dans le foie, le cœur, les reins et le cerveau.

Il est également connu que les hormones thyroïdiennes augmentent la biogenèse mitochondriale chez les mammifères (Gross, 1971) et que les changements induits par les hormones thyroïdiennes corrélent avec l'augmentation du nombre de mitochondries.

Les effets des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme énergétique mitochondrial sont de différents types ; des effets immédiats qui ne passent pas par la synthèse de protéines et des effets à moyen et long-terme qui eux sont médiés par la synthèse de protéines (Soboll, 1993 ; Goglia 1999 ; Nelson, 1990). En effet, *in vivo*, il faut moins de 15 minutes pour

observer les effets d'une injection de T3, à savoir une stimulation rapide de la phosphorylation oxydative, de la consommation d'oxygène et de l'activité des translocateurs des composés nucléotides adényliques (Palacios Romero and Mowbray, 1979). Ces effets sont observables en moins de 2 minutes sur des mitochondries isolées, et ce sans nécessiter la synthèse de protéines (Sterling et al, 1986). Ces effets sont principalement médiés par la di-iodo-thyronine (T2).

Les effets à moyens et long-terme des hormones thyroïdiennes impliquent l'activation de gènes nucléaires et mitochondriaux et la synthèse de protéines. L'injection de T3 augmente le taux d'ARN mitochondriaux de 2 à 8 fois (Mutvei et al, 1989), en particulier celui des sous-unités de la cytochrome c oxydase (COX). Il a été montré que les variations plasmatiques de T3 induisent des modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane mitochondriale. Ainsi, on rapporte une augmentation de la surface de la membrane interne mitochondriale (Joste et al, 1989) sous l'effet de la T3, ainsi qu'une altération de la composition en phospholipides (notamment les cardiolipines) entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons (Brand et al, 1992, Harper et al. 1994). Ces phénomènes ont pour effet de modifier le couplage de la phosphorylation oxydative. Enfin, il est également connu que le statut thyroïdien est étroitement corrélé avec l'expression des protéines découplantes (surtout UCP1 et UCP3 ; Barbe, 2000), suggérant que l'expression des protéines découplantes serait fortement impliqué dans la régulation du couplage de la phosphorylation oxydative par les hormones thyroïdiennes. Enfin, certaines études ont montrées que l'excès ou le défaut d'hormone thyroïdienne influence l'efficacité de la conversion énergétique de la mitochondrie hépatique. Il apparaît que chez des rats rendus hypothyroïdiens (traitement au 6-propyl-2-thiouracile, PTU), le rapport ATP/O est augmenté par rapport à celui de rats euthyroïdiens. A l'inverse, chez des rats rendus hyperthyroïdiens (injection de T3), l'efficacité de la phosphorylation oxydative est inférieure à celle des rats contrôles (Nogueira et al. 2002).

b) Leptine

Depuis sa découverte, la leptine, produit du gène *ob* (Zhang 1994), a été l'objet de nombreuses études sur son éventuelle implication dans la régulation du métabolisme énergétique (voir Porter 1998 pour revue). Parmi ces études, la plupart ont montré que la leptine agissait sur 2 paramètres fondamentaux de la balance énergétique, la prise alimentaire et la dépense énergétique (Halaas, 1995 ; Pellemounter et al. 1995). D'une part, les

récepteurs hypothalamiques à la leptine sont impliqués dans la régulation de la satiété en jouant sur la synthèse du neuropeptide Y (Tartaglia et al 1995, Campfield et 1995, Stephens 1995). D'autre part, certaines études ont montré que le récepteur de la leptine était présent à la surface des cellules de nombreux tissus (Caro et al. 1996) et qu'elle jouait un rôle prépondérant dans la régulation intracellulaire de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras (Koyama et al 1997, Shimabukuro 1997), influençant ainsi le métabolisme énergétique.

Il apparaît ainsi clairement que la leptine est au centre de régulations pouvant influencer le métabolisme énergétique en jouant sur ses 2 aspects fondamentaux, les apports en nutriments et la dépense énergétique. Or, bien que le mode d'action de la leptine sur la mitochondrie reste discuté, certains effets ont été clairement mis en évidence dans différents modèles de rongeurs, notamment au niveau des mitochondries hépatiques.

Melia et al (1999) ont ainsi montré que la fuite de protons était supérieure chez des souris ob/ob, déficientes en leptine fonctionnelle, comparées à des souris contrôles sur des mitochondries isolées de foie. De plus, l'administration de leptine à ces souris permet de rétablir le niveau de fuite de protons pour le ramener à un niveau comparable à celui des souris témoins. Il est également intéressant de noter, que cet effet sur la fuite de protons est indépendant d'une éventuelle activation d'une protéine découplante par des acides gras. Cette amélioration de l'efficacité de la phosphorylation oxydative dans le foie est d'autant plus intéressante qu'elle n'est à priori pas compatible avec l'augmentation constatée de la dépense énergétique suivant l'administration de leptine. Cette constatation s'explique très probablement par le fait que la leptine possède d'autres effets au niveau du muscle squelettique, organe qui occupe une place importante dans le métabolisme énergétique de base. Ainsi, l'administration de leptine chez le rongeur induirait une surexpression d'UCP2 et d'UCP3 dans le muscle qui serait associée à une augmentation de la fuite de protons dans cet organe (Zhou 1997, Gong 1997, Porter 1998).

L'influence de la leptine sur les gènes codant pour les enzymes de la chaîne respiratoire au niveau du foie est assez peu étudiée. Barazzoni et al. (2004) montrent que l'injection de doses physiologiques de leptine à des rats âgés de 6 mois n'entraîne pas d'effet sur la transcription ou l'activité de gènes liés à l'oxydation des acides gras ou au métabolisme énergétique mitochondrial. Cependant, bien que l'injection de leptine ne semble pas avoir d'effet sur le profil d'expression des gènes au niveau hépatique, l'absence de signalisation par la leptine a une influence sur ce profil (Ferrante 2001, Liang 2001, Cohen 2002). Enfin, une étude menée récemment sur le rat *Zucker*, qui présente une déficience en récepteur à la

leptine, a montrée que l'absence de signalisation par la leptine entraîne une diminution du contenu en ANT dans le foie (Teodoro 2006).

Toutes ces études montrent que l'hyperleptinémie ne semble pas avoir d'effet sur la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial hépatique, contrairement à ses effets dans le muscle. Il semble cependant, qu'une diminution du taux circulant de leptine, ou de l'efficacité de transduction, de son signal entraîne une altération du métabolisme mitochondrial dans le foie. Parmi ces études, les dernières montrent clairement le rôle central de l'ANT dans cette régulation. En influençant la synthèse de cette protéine, la leptine pourrait contrôler le taux d'activité de la chaîne respiratoire mais également le taux de fuite de protons. Ainsi, la leptine s'avérerait une protéine essentielle dans le maintien du bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative au niveau du foie.

c) Hormones Gastro-intestinales

Les hormones gastro-intestinales sont un régulateur essentiel de la prise alimentaire. Ces hormones agissent en stimulant l'appétit ou en provoquant le sentiment de satiété. De telles hormones ont ainsi un rôle clé à jouer dans la régulation des apports nutritionnels et donc sont les régulateurs des apports en substrats au niveau de la mitochondrie. De nombreuses études font état d'une corrélation entre le taux circulant de ces hormones lors de perte de poids ou de restriction calorique chez l'homme ou le rongeur (Heijboer 2006 pour revue). Cependant, très peu d'études font état d'une action des hormones gastro-intestinales sur le métabolisme mitochondrial directement. Parmi toutes ces hormones, nous allons principalement nous intéresser aux actions sur le métabolisme de la ghreline, de la cholecystokinine (CCK), du glucagon-like peptide 1 (GLP-1) et dans une moindre mesure du peptide YY (PYY) et de l'oxyntomoduline (OXM).

La ghreline

Identifiée depuis 1999, la ghreline est l'hormone gastro-intestinale la plus étudiée à ce jour. Cette hormone est sécrétée par les cellules X/A-like de l'estomac juste avant un repas et son administration chez les rongeurs et chez l'homme entraîne une stimulation de l'appétit (Cummings 2001, Wren 2000). L'action orexygénique de la ghreline passe par la stimulation de l'expression du neuropeptide Y et de l'orexine (Heijboer 2006). Le taux circulant de ghreline est influencé par de nombreux paramètres physiologiques tels que la prise

alimentaire, l'âge mais également les taux circulants de glucose et d'insuline (Klok 2006). Sur le plan métabolique, la ghreline est impliquée dans la régulation du métabolisme du glucose en agissant notamment sur son absorption au niveau de l'intestin lors de la digestion. En effet, la ghreline stimule l'activité de l'estomac et de l'intestin grêle (Masuda 2000, Kitazawa 2006, Tack 2005). Par ce biais, la ghreline est susceptible de réguler le taux circulant de glucose et ainsi, se pose comme un régulateur potentiel de la disponibilité en substrat pour le métabolisme énergétique. D'autres parts, certaines études montrent que la ghreline joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline chez l'homme et chez le rongeur (Lee 2002, Broglio 2001, Reimer 2003) mais également dans la régulation de la production de glucose par le foie en bloquant l'effet inhibiteur de l'insuline sur certains gènes clés de la néoglucogenèse comme la glucose-6-phosphatase (Gauna 2005, Murata 2002).

En plus de son action sur le métabolisme des glucides, il semblerait que la ghreline joue un rôle de régulateur sur le métabolisme des lipides. Chez le rongeur, l'injection chronique de ghreline induirait une prise de masse grasse en inhibant l'oxydation des acides gras et leur utilisation comme substrats pour le métabolisme énergétique (Tschop 2000). De plus, les taux circulants de ghreline corrèlent négativement avec l'indice de masse corporelle chez l'homme, et il a été montré que le taux circulant de ghreline augmentait chez des obèses qui perdent du poids alors qu'il diminuait chez des personnes anorexiques qui prennent du poids (Otto 2001, Hansen 2002). Barazzoni et al (2004) ont récemment montré que chez le rongeur, la ghreline était un régulateur majeur du métabolisme des lipides notamment au niveau du foie. Ainsi, après administration de ghreline chez la souris, ces auteurs montrent que le taux circulant de glucose est augmenté, mais également que le taux de triglycérides dans le foie est augmenté. Cette étude montre également que la ghreline stimule l'expression de gènes responsables du stockage des acides gras dans le foie notamment l'acetylCoa carboxykinase et la fatty acid synthase. De plus, la ghreline inhibe l'expression de la CPT1 qui est une enzyme majeure dans la voie d'oxydation des acides gras. Enfin, il faut noter qu'aucune différence d'activité de la citrate synthase ou de la COX n'a été constatée chez les souris traitées (Barazzoni et al 2004).

L'ensemble de ces données montre que la ghreline joue un rôle régulateur extrêmement important sur la disponibilité des substrats pour la mitochondrie, mais qu'elle influence également le métabolisme mitochondrial pour orienter l'utilisation de ces substrats pour favoriser la synthèse d'ATP. La ghreline apparait ainsi comme un acteur majeur de l'équilibre énergétique par sa faculté à contrôler le flux des substrats. Cependant, il faut noter que, contrairement à la leptine, l'absence de ghreline n'induit pas de phénotype présentant un

déséquilibre énergétique. Ainsi, les souris *ghrelin* *-/-* ont un poids normal, une composition corporelle normale, un appétit identique à des souris contrôles et répondent au jeun de la même façon que des souris contrôles sur le plan de la sécrétion d'insuline et de leptine (De Smet 2006). La ghreline ne serait donc pas une hormone exerçant une régulation sur le métabolisme énergétique à long terme contrairement à la leptine. Cependant, il est indéniable que la ghreline agit comme un régulateur rapide de ce métabolisme et que cette hormone s'impose alors comme un régulateur majeur de l'adaptation du métabolisme énergétique à des situations de stress ou des situations pathologiques telles que la restriction calorique, le jeun ou encore l'hypermétabolisme.

La cholecystokinine (CCK)

La CCK, une hormone sécrétée par l'intestin grêle, est décrite comme une hormone qui diminue la prise alimentaire (Gibbs 1973). La CCK est connue depuis les années 1980 comme une hormone régulant la glycémie chez l'homme (Liddle 1988). Chez le rat, la CCK amplifie l'action du glucose sur la sécrétion d'insuline (Hermansen 1984). Chez l'homme par contre, il semblerait que la CCK stimule la sécrétion d'insuline dépendante des acides aminés et non du glucose (Rushakoff 1987). Les effets de la CCK sur la sensibilité à l'insuline et sur ces effets sur le métabolisme des glucides restent cependant à ce jour très peu étudiés.

On dénombre également peu d'études sur l'influence de la CCK sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Il faut malgré tout noter que récemment, une étude a mis en évidence que l'absence de signalisation par la CCK (chez des souris dont le gène codant pour le récepteur à la CCK a été inactivé) entraînait une augmentation de la prise alimentaire conjuguée à une augmentation de la dépense énergétique sur 24 heures (Miyasaka 2002). Or étant donné que la dépense énergétique est directement lié à la consommation d'oxygène mitochondriale, cette étude impliquerait que la CCK influencerait d'une manière ou d'une autre le métabolisme énergétique mitochondrial.

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)

GLP-1 est une hormone dérivée du preproglucagon, connu pour son action sur la prise alimentaire chez le rongeur et l'homme (Heijboer 2006). GLP-1 est fortement impliqué dans la régulation de taux circulant de glucose. Un des mécanismes d'action de cette hormone est médié par la régulation de la vitesse d'absorption du glucose au niveau de l'intestin (Miki

2005). D'autre part, GLP-1 agirait sur la transcription du gène de l'insuline, mais également sur la stabilité de l'ARNm de l'insuline pour réguler la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Drucker 1987). Une étude récente de Lee et al. (2007) met en évidence une action directe de GLP-1 sur le métabolisme énergétique au niveau du foie. Dans le but d'étudier le potentiel de cette hormone dans le traitement du diabète de type 2, ces auteurs ont montré que le GLP-1 agissait directement sur la production de glucose hépatique via une inhibition de l'expression de 2 enzymes clés de la néoglucogenèse et de la glycolyse, la Glucose-6-phosphatase et la PEPCK. Cette régulation du flux de glucose hépatique montre que cette hormone est capable d'influencer le métabolisme énergétique au niveau du foie en modifiant l'utilisation du glucose par la cellule. De plus, GLP-1 possède une action inhibitrice sur l'expression de la fatty acid synthase et le taux circulant de triglycérides (Lee 2007). Cette étude montre bien que GLP-1 joue un rôle primordial dans l'orientation du métabolisme hépatique et dans l'utilisation des substrats énergétiques par la cellule. Il a également été montré récemment que dans les cellules MIN6 du pancréas, la stimulation de GLP-1, par de faible concentration de glucose, était susceptible d'induire une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et de la synthèse d'ATP mitochondriale (Tsuboi 2003). Ces effets étant complètement inhibés par la chélation du calcium intracellulaire, les auteurs en ont conclu que l'action de GLP-1 sur la synthèse d'ATP passait par une stimulation de la libération du calcium. D'autre part, dans cette étude, il est montré que l'inhibition de la signalisation par l'insuline (via IP3) entraînait une diminution des effets de la stimulation de la synthèse d'ATP par GLP-1. Les résultats de cette étude mettent en évidence que l'action de GLP-1 est fortement liée à celle de l'insuline et que cette hormone pourrait jouer un rôle clé dans la régulation du rendement de synthèse d'ATP mitochondrial (Tsuboi 2003).

L'ensemble de ces résultats montre encore une fois que la disponibilité des ressources énergétiques au niveau du foie dépend de l'action de nombreuses hormones dont GLP-1. Même si aucune action directe de cette hormone n'est prouvée sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative au niveau du foie, son action sur les métabolismes du glucose et des lipides est une régulation en amont du fonctionnement de la mitochondrie et de son efficacité à fournir l'ATP dont l'organisme à besoin.

Peptide YY (PYY)

Le peptide YY appartient à la même famille de peptide que le neuropeptide Y et le polypeptide pancréatique. C'est un peptide court de 36 acides aminés sécrété notamment dans

les cellules L du colon. Il existe deux formes endogènes du PYY, la forme PYY1-36 et la forme PYY3-36 résultant d'un clivage post-traductionnel. Chez l'homme, la forme PYY3-36 est la forme la plus abondante et son taux circulant augmente après un repas. PYY inhibe de nombreuses fonctions, notamment la sécrétion et la sensibilité à l'insuline (Boey 2007 pour revue). L'action la plus connue du peptide YY est son pouvoir inhibiteur sur la sécrétion d'insuline dépendant du glucose (Bertrand 1992). Parmi les autres fonctions étudiées du PYY, il a été montré que l'injection de PYY chez le rat diminuait la prise alimentaire de manière dose dépendante. Cet effet sur la prise alimentaire passait par une diminution du volume ingéré mais également une action sur le sentiment de satiété (Chelikani 2005). Une autre étude a également mis en évidence la présence de récepteur au peptide YY dans le tissu adipeux chez l'homme. Cette étude montre aussi que le peptide YY inhibe la lipolyse proportionnellement à la quantité de récepteur au PYY observé dans le tissu adipeux chez l'homme (Castan 1993).

Une étude d'Adams et al. (2006) rapporte cependant que l'administration de PYY chez la souris n'a pas d'effet sur la dépense énergétique. Ce résultat indique très certainement que le PYY ne possède pas d'effet sur l'activité du métabolisme énergétique et donc que des variations du PYY dans certaines situations physiologiques n'expliquent pas les variations éventuelles du métabolisme énergétique mitochondrial. Quoiqu'il en soit, une action de cette hormone sur la lipolyse agirait tout de même sur la disponibilité des substrats pour la mitochondrie et pourrait, sans modifier son activité, modifier le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Oxyntomoduline (OXM)

L'OXM est une hormone gastro-intestinale issue de la modification post-traductionnelle du preproglucagon. Cette hormone est sécrétée par l'intestin en réponse à l'ingestion de nourriture. Sa sécrétion est proportionnelle au contenu calorique de la prise alimentaire (Heijboer 2006). L'injection d'OXM chez l'homme et le rongeur induit une diminution de la prise alimentaire (Dakin 2004). Les études menées sur les effets de l'OXM montrent que cette hormone stimule la sécrétion d'insuline chez l'homme (Schjoldager 1988). Chez le rat, Dakin et al. (2002) ont montrés que l'OXM induisait une réduction de la masse des tissus adipeux brun et blanc associée à une augmentation de la température centrale suggérant une augmentation de la dépense énergétique. Cependant, il a été montré plus

récemment que l'OXM n'entraînait pas chez la souris de modification de la consommation d'oxygène au niveau du corps entier (Baggio et al 2004).

D) Régulation du métabolisme énergétique hépatique par le couple insuline/SREBP-1C

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Les effets de cette hormone sur l'expression de certains gènes clés du métabolisme hépatiques sont une part intégrante des mécanismes d'adaptation aux stress énergétiques. Au niveau du foie, l'action de l'insuline sur la transcription de certains gènes est bien connue. L'insuline stimule la synthèse de protéines impliquées dans la glycolyse telle que l'hexokinase ou la pyruvate kinase. L'insuline stimule également la synthèse de protéines liées à la lipogenèse telle que la fatty-acid synthase ou acetyl-CoA carboxylase. Enfin, l'insuline inhibe la synthèse de gènes impliqués dans la néoglucogenèse telle que la phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) (Ferre 2001 pour revue).

Il a été montré que l'action de l'insuline sur ces différentes voies métaboliques était médiée par un même facteur de transcription : SREBP-1C (Foufelle 2002). Une étude menée sur des hépatocytes en culture a ainsi mis en évidence que l'insuline possédait une action stimulante directe sur l'expression de ce facteur (Ryazanov 1997). Kim et al. (1998) ont ensuite montré que la surexpression de SREBP-1C dans l'adipocyte entraînait une surexpression de la fatty acid synthase comme le fait l'insuline. SREBP-1C apparaît ainsi comme un cofacteur prépondérant de l'insuline au niveau du foie. Son action permettrait ainsi de prédisposer le foie à un afflux de carbohydrate (Ferre 2001). SREBP-1C va alors favoriser la glycogénolyse, en activant la phosphorylation du glucose, mais également stimuler la synthèse *de novo* de lipides à partir des hydrates de carbones (Foufelle 2002 pour revue). SREBP-1C serait alors, au niveau du foie, un pivot majeur dans la réponse aux variations de disponibilité des substrats ou dans la réponse à la variation de qualité des substrats disponibles par l'alimentation (glucides ou lipides).

2) PGC-1 un co-activateur impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique

PGC-1 est une protéine nucléaire de 91 kDa appartenant à une famille de cofacteur comprenant PGC-1 α , PGC-1 β et PRC. PGC-1 est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions liées au métabolisme mitochondrial. Cependant, il est nécessaire que PGC-1 soit recruté par un facteur de transcription pour co-activer la transcription d'un gène (Tiraby 2005 pour revue). Ainsi, PGC-1 s'associe à de nombreux co-activateurs, parmi ceux-ci on peut citer entre autres : PPAR γ , le récepteur aux estrogènes ER α , le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur à l'acide rétinoïque RXR, le récepteur aux hormones thyroïdiennes, le liver X receptor et les récepteurs orphelins ERR α et ERR γ . PGC-1 peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que HNF4 α , Foxo1 et NRF1.

PGC-1 joue de nombreux rôles dans la régulation du métabolisme, notamment dans le cadre de l'adaptation à certaines situations physiologiques (exposition au froid, jeun, exercice physique...). PGC-1 est souvent présenté comme le coordinateur de l'adaptation du métabolisme mitochondrial aux variations des apports en substrats et des besoins en énergie (ou des besoins en thermogénèse) de la cellule. Ainsi, PGC-1 est impliqué dans la régulation de la biogénèse mitochondriale lors de l'adaptation au froid (Puigserver 1998), dans la régulation de l'oxydation des acides gras lors de la restriction calorique ou de jeune (Lehmann 2000, Vega 2000) mais également dans la régulation de la néoglucogénèse hépatique en cas de restriction calorique ou de jeune (Yoon 2001).

A. PGC-1 et le métabolisme des substrats

Le rôle principal de la mitochondrie est de synthétiser de l'ATP en utilisant l'oxydation de cofacteurs comme source d'énergie. Ces cofacteurs (NADH et FADH $_2$) sont issus du métabolisme des sucres et des acides gras issus de l'alimentation et/ou neosynthétisés. La disponibilité des différents substrats mais également leur origine sont des éléments déterminants dans le fonctionnement optimal de la chaîne respiratoire et donc dans l'efficacité de synthèse de l'ATP. Les voies principales pour fournir ces substrats sont la glycolyse et la néoglucogénèse pour le métabolisme du glucose, et la beta oxydation des

acides gras pour le métabolisme des lipides. Ces trois voies métaboliques fonctionnent en équilibre pour répondre aux besoins en substrat de la cellule mais également pour combler d'éventuels manques dans l'un des substrats.

PGC-1 joue un rôle primordial dans la régulation de la capture du glucose par les cellules. En effet, il a été mis en évidence que PGC-1 α stimulait l'expression du transporteur au glucose sensible à l'insuline (Glut-4) dans le muscle (Michael 2001). Au niveau du foie, le rôle de PGC-1 α est encore plus intéressant. Le foie est le producteur principal de glucose notamment de synthèse *de novo* de glucose par la néoglucogenèse. Le rendement de la néoglucogenèse est contrôlé principalement par l'activité (et la quantité) de trois enzymes : la PEPCK, la fructose 1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase. Il a été montré dans différents modèles de souris que l'activité de la néoglucogenèse corrélait parfaitement avec l'expression de PGC-1 α (Puigserver 2003 pour revue). De plus, PGC-1 α stimule l'expression des trois gènes clés de la néoglucogenèse. Ainsi, lors des situations de jeune ou de restriction calorique, où PGC-1 α est particulièrement surexprimé, les adaptations du métabolisme énergétique semblent coordonnées par l'action de ce cofacteur.

La bêta oxydation des acides gras est l'autre source majeure de cofacteurs réduits pour la phosphorylation oxydative. L'activité de cette voie métabolique est principalement contrôlée par une enzyme, la carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT-1) (Eaton 2002). Récemment, Sadana et al. (2007) ont montrés que le cofacteur PGC-1 β avait la capacité de stimuler l'expression de CPT-1. Cette isoforme de l'enzyme CPT-1 est exprimée entre autre dans le foie, laissant supposer que PGC-1 β pourrait jouer un rôle dans le switch métabolique entre les glucides et les lipides lors de certaines situations physiologiques. En effet, il avait déjà été montré que dans le cœur, PGC-1 α possédait également la capacité à stimuler l'expression de gènes liés à la beta oxydation des acides gras (CPT-1 et MCAD) (Vega 2000). De plus PGC-1 α joue un rôle dans l'expression hépatique de CPT-1 dans le foie, en s'associant avec le facteur de transcription HNF-4 (Louet 2002).

En régulant l'expression de gènes liés à la néoglucogenèse et à la beta oxydation des acides gras, PGC-1 s'avère être un régulateur central dans l'équilibre métabolique de la disponibilité des substrats énergétiques pour la mitochondrie. De nombreuses études ont fait état de variation de l'expression de PGC-1 dans les situations de jeun et/ou de restriction calorique (Tiraby 2005 pour revue). Dans ces conditions de diminution de disponibilité des substrats, PGC-1 semble jouer un rôle primordial de régulateur de l'utilisation des substrats par la cellule. Lors d'une diminution de la disponibilité en sucre, PGC-1 serait le cofacteur qui régule le basculement du métabolisme vers l'utilisation des lipides comme substrats ou vers la

synthèse *de novo* de glucose dans le foie. Par son action sur le métabolisme situé en amont de la phosphorylation oxydative, PGC-1 apparait comme un régulateur essentiel de l'efficacité de la synthèse de l'ATP mais également du rendement énergétique de la cellule.

B. PGC-1 et biogénèse mitochondriale

Lors de l'augmentation des besoins cellulaires en énergie, la cellule répond parfois par une augmentation de la masse mitochondriale cellulaire (Butow 1999). Une telle biogénèse mitochondriale suppose la production des protéines codées par le noyau de la cellule mais également à partir du génome mitochondrial. Par exemple, la thermogénèse adaptative (suite à l'exposition au froid), entraîne dans le tissu adipeux brun, une augmentation du nombre de mitochondries mais également une augmentation de la respiration mitochondriale et un découplage de la phosphorylation oxydative pour produire de la chaleur. Une telle adaptation nécessite la présence de nombreux cofacteur pour coordonner la synthèse des différentes protéines impliquées dans ces mécanismes (Tiraby 2005 pour revue).

Environ 100 gènes participent à la mise en place de la chaîne respiratoire et du système de phosphorylation de l'ADP, mais on dénombre également 1000 autres gènes impliqués dans la constitution de la mitochondrie. L'expression des gènes de la chaîne respiratoire présents dans le génome nucléaire sont sous le contrôle de multiples facteurs de transcription (Scarpulla 2006 pour revue).

Il a été montré que NRF-1 était particulièrement impliqué dans la régulation de l'expression de la COX mais aussi dans la régulation de la voie de synthèse de l'hème. Un deuxième facteur de transcription nucléaire, NRF-2, est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme mitochondrial, notamment une sous unité du complexe IV de la chaîne respiratoire (COXIV) (Scarpulla 2006 pour revue). $ERR\alpha$ est également un facteur de transcription impliqué dans la régulation du métabolisme oxydatif cellulaire. $ERR\alpha$ est surtout présent dans les tissus hautement oxydatifs comme le rein, le cœur ou le tissu adipeux brun. Il a été montré que $ERR\alpha$ contrôlait l'expression de la MCAD une enzyme de la bêta oxydation des acides gras (Huss and Kelly 2004). Cependant, la

régulation de la synthèse des protéines mitochondriales par différents facteurs de transcription implique qu'il existe un facteur prépondérant qui contrôle à lui seul l'activité de ces différents facteurs de transcription.

PGC-1 apparaît comme le co-activateur le plus approprié tant son expression est modifiée par les situations physiologiques qui induisent une biogénèse mitochondriale. La surexpression de PGC-1 α dans le tissu adipeux brun suivant une exposition au froid et précédant une forte biogénèse mitochondriale (Lin et al 2005, Puigserver et al 2005) suggèrent son implication dans la régulation de la masse mitochondriale cellulaire. D'autre part, Wu et al. ont montré (1999) que la surexpression de PGC-1 α dans des myoblastes induisait une biogénèse mitochondriale. Toujours dans cette étude, il a été montré que PGC-1 α induisait une surexpression de la COX et du cytochrome c. Il semblerait que le rôle de PGC-1 β soit moins prépondérant que celui de PGC-1 α . Cependant, PGC-1 β possède la capacité d'interagir avec NRF-1 et donc est un régulateur potentiel de l'activité de facteur de transcription de NRF-1 (Lin et al 2003). De plus, la surexpression de PGC-1 β entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et de la biogénèse mitochondriale dans le muscle (St-pierre et al 2003).

Parmi l'ensemble des co-activateurs associés à PGC-1, NRF-1 et NRF-2 sont ceux qui sont le plus impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Le couple de co-activateurs NRF-1 et NRF-2 est ainsi associé à la régulation de gènes concernant tous les complexes de la chaîne respiratoire et ce chez le rat, la souris mais également l'homme (Scarpulla 2002 pour revue).

En résumé, la biogénèse mitochondriale est régulée par de nombreux co-activateurs, il semblerait cependant que PGC-1 ait un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de ces cofacteurs. PGC-1 se trouve ainsi au centre d'un système complexe de régulation du métabolisme énergétique. Son action sur de nombreux co-activateurs permet de réguler l'expression de gènes liés à de nombreuses fonctions métaboliques impliquées dans la réponse aux besoins énergétique cellulaire. PGC-1 est ainsi au centre de la régulation de l'apport en substrat et de leur utilisation au sein de la cellule. PGC-1 est également au centre de la régulation de l'expression de protéines constitutives de la chaîne respiratoire et donc régule par ce biais l'utilisation des substrats et la synthèse de l'ATP. Par cette faculté PGC-1 apparaît ainsi comme l'acteur central de l'adaptation du métabolisme énergétique aux besoins énergétiques cellulaires.

C. PGC-1 et le découplage

Le métabolisme mitochondrial est un système dynamique qui peut être influencé par de nombreux facteurs tel que l'exposition au froid (Nicholls 1984, Lowell 2000, Klingenberg 1999). Par exemple, lors de l'exposition au froid, le découplage de la phosphorylation oxydative est plus important permettant ainsi d'augmenter la formation de chaleur par le tissu adipeux brun. Il a été montré, qu'un tel phénomène de découplage pouvait entraîner des modifications d'expression de gènes ou augmenter la biogenèse mitochondriale (Butow 2004, Biswas 1999). Ce processus de signalisation est appelé signalisation rétrograde (Spiegelman 2007).

Récemment, Spiegelman et al. (2007) ont mis en évidence une partie des mécanismes impliqués dans cette signalisation rétrograde en utilisant un découplant chimique et en étudiant la réponse de la cellule à la diminution de concentration en ATP. Leur étude a montré que la cellule possédait un mécanisme de compensation de la chute du taux de synthèse d'ATP et que ce mécanisme était coordonné par PGC1- α . L'augmentation de l'expression de PGC1- α en réponse à la chute du taux cellulaire d'ATP entraîne une stimulation de l'expression de PGC-1 β qui à son tour stimule l'expression des gènes du métabolisme mitochondrial et de la biogénèse mitochondriale (Spiegelman 2007). D'autre part, cette étude montre également que l'AMP-kinase (AMPK) serait fortement impliquée dans cette signalisation rétrograde.

L'AMPK est le senseur majeur du niveau d'AMP dans la cellule. Cette enzyme joue ainsi un rôle clé dans la réponse aux diminutions de concentration d'ATP intracellulaire et dans la réponse à cette diminution du taux d'ATP. Dans ce contexte, une relation étroite entre PGC-1 et l'AMPK n'est pas surprenante pour coordonner la régulation du métabolisme énergétique. Certaines études rapportent que l'AMPK stimule l'expression de PGC-1 notamment dans le muscle (Suwa 2003), d'autre part, l'utilisation d'ARN interférent montre que PGC-1 α serait le médiateur de certains effets de l'AMPK sur l'expression des gènes de l'oxydation des acides gras. Enfin, Spiegelman et al (2007) ont montré que l'AMPK pouvait lier et activer PGC-1 α dans le muscle et ainsi, réguler son action sur les gènes du métabolisme mitochondrial. L'AMPK apparaît, au vu de toutes ces études, comme un senseur de l'environnement métabolique de la mitochondrie et pourrait jouer avec PGC-1 un rôle déterminant dans la régulation des grandes fonctions métaboliques mitochondriales lors de situations de stress énergétique.

III) Adaptations du métabolisme mitochondrial lors de stress énergétique

Une perte de poids résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique, c'est-à-dire que la dépense énergétique n'est plus compensée par les apports alimentaires. Il faut cependant distinguer la perte de poids volontaire causée par une restriction calorique consciente (amaigrissement chez l'obèse ou le sportif...), de celle involontaire causée par une dégradation de l'état physiologique (dénutrition de la personne âgée, cachexie cancéreuse, syndromes infectieux...). Cette perte de poids est associée soit à des apports alimentaires diminués (anorexie) soit à une augmentation de la dépense énergétique basale (hypermétabolisme et/ou hypercatabolisme) soit à l'association de ces deux phénomènes.

La situation de perte de poids, qu'elle soit volontaire ou involontaire, est une parfaite illustration de stress énergétique. Dans ce contexte, l'organisme doit s'adapter de manière à répondre à des besoins importants en énergie sans pour autant disposer de plus de ressources, ou au contraire, l'organisme doit adapter ses besoins et optimiser son utilisation des ressources disponibles car celles-ci sont diminuées. Il est donc intéressant dans ce contexte de positionner la mitochondrie comme un élément central de cette régulation et d'étudier son fonctionnement ainsi que le contexte métabolique qui l'entoure pour comprendre comment l'organisme organise sa réponse face au stress énergétique.

1) La restriction calorique

A. Restriction calorique et dépense énergétique de repos

La dépense énergétique de repos est proportionnelle à la consommation d'oxygène par le corps entier d'un individu à jeun au repos. Ce paramètre est un bon indicateur de l'état physiologique de l'organisme et notamment de l'utilisation de ses ressources énergétiques. De nombreuses études ont montré que la restriction calorique induisait une diminution de la dépense d'énergie de repos chez l'homme et chez le rongeur (Astrup et al. 1999, Thompson et al 1996, Blanc et al. 2003). Le foie et le muscle contribuent pour 50% de la dépense énergétique de repos. Les études chez l'animal ont montré que la restriction calorique s'accompagnait d'une diminution relative de la masse de foie relativement plus importante

que la perte totale de poids (Ramsey et al. 2000). Cela montre à quel point cet organe semble jouer un rôle prépondérant dans l'adaptation à la restriction calorique. D'autre part, de nombreuses études montrent que la restriction calorique entraîne des modifications du métabolisme mitochondrial. Étant donné que 90% de la consommation d'oxygène au niveau du corps entier est d'origine mitochondriale, il semble logique de penser qu'une adaptation active à la restriction calorique au sein de la mitochondrie peut expliquer une variation de la dépense énergétique de repos.

B. Restriction calorique et métabolisme mitochondrial hépatique

De nombreuses études rapportent des effets de la restriction calorique à long ou moyen terme sur les mitochondries hépatiques. Ces études montrent que la restriction calorique s'accompagne d'une diminution de la consommation d'oxygène en condition non phosphorylante et en condition phosphorylante. Il faut cependant noter que si les études réalisées à moyen terme (15 jours de restriction) montrent une diminution de la consommation d'oxygène à l'état 3, seule la diminution de consommation d'oxygène à l'état 4 persiste lors d'une restriction à plus long terme (Gold et Costello 1975, Ferreira et Gil 1984, Lambert et Merry 2004, Bevilacqua 2005).

Cette diminution de la consommation d'oxygène s'expliquerait par une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire. Ainsi, plusieurs études rapportent des effets de la restriction calorique sur de nombreux paramètres influençant l'activité de la chaîne respiratoire, notamment au niveau du complexe IV. Les restrictions caloriques à long terme (> 7 semaines) mettent ainsi en évidence une diminution d'activité de ce complexe (Ramanadham et Kaplay 1978). Plus intéressant encore, ces mêmes études rapportent une diminution des cytochromes a+a₃ constitutifs de la COX (Ferreira et Gil, 1984), mais également des cytochromes constituant les autres complexes de la chaîne respiratoire (a+a₃, b et c+c₁) (Ramanadham et Kaplay 1978). Ainsi, une telle diminution dans la quantité de cytochromes constituant la chaîne respiratoire peut très bien expliquer la diminution de consommation d'oxygène constatée chez le rat restreint.

Il n'est cependant pas exclu que la diminution de consommation d'oxygène à l'état 4 s'explique par une diminution de la fuite de protons. Ce phénomène adaptatif de la mitochondrie est encore présent lors de restriction à long terme (Ramsey 2004). Il est intéressant de noter qu'à ce jour, les mécanismes expliquant cette variation de la fuite de protons chez le rat restreint ne sont pas identifiés. Il a été proposé que cette fuite de protons ait

pour but une diminution la production de ROS lors de la phosphorylation oxydative, que ce soit par le biais de l'activation d'UCP2, ou de l'ANT comme transporteurs transmembranaires de protons (Ramsey 2004).

C. Restriction calorique et le métabolisme des substrats énergétiques

Chez le mammifère, le foie joue un rôle clé dans la coordination de la réponse à des situations nutritionnelles particulières. Le foie joue un rôle de régulateur de l'utilisation et de la disponibilité des substrats pour les autres organes (Bauer 2004). Ainsi, il a été proposé que le foie joue un rôle prépondérant dans les effets « anti-âge » de la restriction calorique en modifiant l'utilisation des substrats au sein de l'organisme (Masoro 1995). Dhahbi et al ont ainsi réalisé une étude très complète sur les effets de la restriction calorique sur les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des hydrates de carbone (Dhahbi et al 2001). Cette étude montre que chez des souris en restriction calorique, le taux de néoglucogénèse et de protéolyse est très élevé, notamment à cause d'une stimulation par la restriction calorique d'enzymes clés de ces voies métaboliques, la PEPCK et la glutamine synthase. Il est également montré dans cette étude que la restriction calorique inhibe la glycolyse en agissant via l'hexokinase et la pyruvate kinase. Il ressort ainsi que chez la souris restreinte, la restriction calorique induit un basculement du métabolisme vers une utilisation des protéines comme substrats pour la synthèse *de novo* de glucose (Dhahbi 2001).

Une autre étude montre que lors de restriction calorique à long terme chez la souris, on constate une modification de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs (Hagopian 2004). Les effets de la restriction calorique sur le cycle de Krebs permettent de distinguer deux blocs d'enzymes différemment affectés par le statut nutritionnel. Un premier bloc d'enzyme (citrate synthase, aconitase et Isocitrate-dehydrogenase) voit son activité et son expression diminuée tandis que le second bloc (Keto-glutarate-dehydrogenase, Succinate-thio-kinase, Succinate-dehydrogenase, Malate-dehydrogenase) est stimulé par la restriction. Ce profil montre que le cycle de Krebs adapte son fonctionnement à la restriction calorique. D'une part, le premier bloc d'enzyme est dépendant de l'activité de la glycolyse car il utilise des substrats provenant de la glycolyse pour son fonctionnement. Or, comme la glycolyse est inhibée par la restriction, il est logique que ces enzymes soient affectées de la même façon (Hagopian 2003, Dhahbi 2001, Hagopian 2004). D'autre part le second bloc d'enzyme fournit des substrats pour la néoglucogénèse qui est stimulée lors de la restriction calorique (Dhahbi 2001). Il est donc également logique de

constater que ce bloc d'enzyme va être stimulé par la restriction calorique de manière à subvenir au besoin en substrat de la néoglucogenèse de concert avec l'augmentation de la protéolyse. La dichotomie ainsi mise en évidence dans l'adaptation du cycle de Krebs montre à quel point l'intégralité du métabolisme est affectée par la restriction calorique. Le profil métabolique mis en évidence montre bien que tout est mis en œuvre pour optimiser l'utilisation des substrats dans une situation nutritionnelle où ceux-ci se font rares.

Les travaux menés au sein de notre laboratoire se sont concentrés sur la restriction calorique à court terme (3 jours). Ces études se sont focalisées sur l'impact de la restriction calorique sur l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale (travaux de thèse de Jean-François Dumas). Les résultats obtenus confirment qu'il existe une adaptation du métabolisme énergétique mitochondrial et ce dès 3 jours de restriction calorique. Ainsi, nous avons noté une diminution de la respiration en condition phosphorylante probablement liée à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire (Dumas 2003). Ces résultats montrent également une diminution de la fuite de protons en condition non phosphorylante qui concorde avec les diminutions de fuite de protons précédemment trouvées dans les restrictions à plus long terme (Ramsey 2004). Il est intéressant de noter que ces modifications du fonctionnement de la chaîne respiratoire n'ont pas d'effet sur l'efficacité ou sur le taux de synthèse de l'ATP (Dumas 2003).

La restriction calorique entraîne une adaptation du métabolisme mitochondrial dès 3 jours. Cependant, nous disposons actuellement de peu d'études décrivant l'impact de telle restriction calorique sur le métabolisme énergétique en amont de la phosphorylation oxydative. Or cette situation nutritionnelle est assez fréquente en médecine hospitalière, notamment dans le cadre de protocoles préopératoires. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'impact de la restriction calorique sur le profil d'expression génique du foie de rat. Il est en effet très difficile d'avoir une idée physiologique du fonctionnement d'une voie métabolique. L'étude de l'activité d'une enzyme isolée ne permettant pas de caractériser son action *In vivo*. L'étude du transcriptome va ainsi nous permettre de voir quels sont les mécanismes mis en jeu dans la restriction calorique à court terme et permettre de déterminer si le switch métabolique observé dans le cadre de restriction à plus long terme se met en place dès 3 jours de restriction.

2) L'hypermétabolisme : le rat traité par dexaméthasone

Le rat traité par dexaméthasone a été choisi comme modèle de dénutrition. En effet, c'est un animal anorexique, hypermétabolique, hypercatabolique, non inflammatoire, insulino-résistant, présentant ainsi de nombreuses caractéristiques de certaines situations pathologiques humaines. C'est aussi un modèle très reproductible pour ces phénotypes.

A. Les glucocorticoïdes et le métabolisme énergétique

Les glucocorticoïdes sont connus pour réguler de nombreux aspects du développement et du métabolisme énergétique et jouent un rôle majeur lors de la réponse au stress (Miller and O'Callaghan, 2002). De nombreuses études ont montré que les glucocorticoïdes étaient impliqués dans la régulation de la respiration mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, d'une part par l'activation de gènes nucléaires ou mitochondriaux et d'autre part en affectant le nombre ou la taille des mitochondries. Les glucocorticoïdes possèdent également des effets rapides non-génomiques pouvant moduler aussi la production d'énergie mitochondriale (Brillon et al. 1995).

On sait que l'augmentation du taux de glucocorticoïdes plasmatiques observée après un stress opératoire, une infection ou un choc traumatique entraîne un état d'hypermétabolisme et d'hypercatabolisme (Woodward et Emery, 1989 ; Brillon et al, 1995 ; Minet-quinard et al, 1999 ; Marone et al, 1994). Cet état est caractérisé par une augmentation de la dépense énergétique basale en dépit d'une diminution de la prise alimentaire, une accélération de la protéolyse musculaire ubiquitine-protéasome dépendante et une augmentation de la néoglucogenèse au niveau du foie (Minet-quinard et al, 1999 ; Max et al, 1988 ; Souba et al, 1985). Les mécanismes biochimiques précis de ce déséquilibre négatif de la balance énergétique sont cependant toujours méconnus à l'heure actuelle.

Un des mécanismes possibles pourrait être une altération du métabolisme énergétique mitochondrial en particulier au niveau du foie et du muscle qui participent à eux deux pour 50% de la dépense énergétique du corps entier (Wakat et Haynes, 1977 ; Kerppola, 1960 ; Kimura et Rasmussen, 1977 ; Weber et al, 2002). Cependant des études précédentes montrent que si le métabolisme hépatique est sujet à des variations, le métabolisme musculaire semble quant à lui moins altéré par les glucocorticoïdes (Roussel et al, 2003 ; Dumas et al., 2003, 2004). Compte-tenu le fait que le foie représente à lui seul 17 à 25% de la dépense énergétique de repos totale (Rolfe et Brand, 1997), une action des glucocorticoïdes sur le foie semble donc prépondérante.

B. Métabolisme mitochondrial hépatique chez le rat traité par dexaméthasone

De nombreuses études rapportent des effets des glucocorticoïdes sur l'activité mitochondriale hépatique (Jani 1991, Kerpolla 1960, Kimberg 1968). Ces études montrent que les glucocorticoïdes entraînent une diminution de l'efficacité de synthèse d'ATP chez le rat. En effet, toutes ces études font état d'une diminution du rapport ATP/O consécutif au traitement par les glucocorticoïdes chez le rat. Il est cependant intéressant de noter que ces mesures du rapport ATP/O sont réalisées dans des conditions qui ne correspondent pas à l'état physiologique de fonctionnement de la mitochondrie. En effet, ces rapports ATP/O sont mesurés en utilisant une dose saturante d'ADP pour stimuler la respiration en condition phosphorylante.

Les différentes études menées au sein de notre laboratoire (Roussel et al. 2003 ; Dumas et al, 2003) ont montré que la dexaméthasone entraînait une augmentation de la respiration en condition non-phosphorylante. Cette augmentation de la respiration concerne les substrats des complexes I (glutamate), II (succinate) et IV (ascorbate- TMPD) au niveau de la mitochondrie du foie, et ceci est associé à une augmentation de la fuite basale de protons. Cependant, ces études ne montraient pas de variation de la respiration en condition phosphorylante.

L'augmentation de la fuite de protons au niveau des mitochondries hépatiques peut s'expliquer par différents mécanismes. La composition de la membrane interne mitochondriale est, par exemple, un des facteurs déterminant du taux de fuite de protons. Kaur et al. (1989) ont montré qu'il n'existait pas de différence de composition membranaire chez le rat traité par dexaméthasone. Cependant, aucune étude concernant la composition en acide gras des différents phospholipides n'a été réalisée à ce jour à notre connaissance. Cette augmentation de la fuite de protons est susceptible de jouer un rôle essentiel dans l'augmentation constatée de la dépense énergétique chez le rat traité par dexaméthasone. Il semble donc essentiel de comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu, lors du traitement par dexaméthasone, expliquant cette augmentation de la fuite de protons.

D'autre part, dans une situation d'hypercatabolisme, comme celle induite par les glucocorticoïdes chez le rat, la demande en ATP cellulaire est très augmentée. En effet, de nombreuses voies métaboliques fortement consommatrices en ATP sont mises en œuvre pour assurer le recyclage des substrats. Ainsi, certaines études font état d'une augmentation d'activité de la néoglucogenèse, de la glycolyse mais également du cycle de l'urée et de la protéolyse (Wolfe et al 1987, Yu et al 1999). Or, jusqu'à présent, aucune étude n'a permis

d'identifier la réponse de la mitochondrie à ces demandes accrues en ATP. En effet, nos études se sont focalisées jusqu'à présent sur l'importance de la fuite de protons et sur la part de l'état 4 de la respiration dans les effets physiologiques constatés chez le rat traité par dexaméthasone. De plus, les études précédentes, ayant étudié les effets des glucocorticoïdes sur la respiration en condition phosphorylante, n'ont jamais été réalisées en se plaçant dans des conditions physiologiques. C'est pour cela qu'il nous a semblé primordial d'orienter la suite de nos études sur ce modèle en essayant de comprendre au maximum l'adaptation globale du métabolisme énergétique et en particulier l'adaptation du métabolisme mitochondrial lors du traitement par dexaméthasone, en se plaçant dans des conditions physiologiques, et en étudiant les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des gènes au niveau du foie de rat.

IV) Etude à haut-débit du transcriptome : les puces à ADN

Les puces à ADN permettent d'étudier simultanément le niveau d'expression d'un grand nombre de gènes. Cet outil repose sur la capacité de l'ADN à former une double hélice lorsque 2 brins complémentaires sont mis en présence l'un de l'autre. Des oligonucléotides spécifiques correspondant aux gènes d'intérêt sont ainsi déposés sur un support solide (nylon, verre...). La population d'acides nucléiques à tester est marquée (fluorophore ou radioactivité) et hybridée sur la matrice des sondes. La spécificité des sondes permet d'assurer que seul les ARNs correspondant à la séquence complémentaire du gène d'intérêt viendront s'apparier sur la sonde correspondante à ce gène. Après hybridation, la lecture au scanner permet de mesurer le signal correspondant à chaque sonde et permet ainsi de mesurer la quantité d'ARN s'étant appariée à chaque sonde.

1) Les différentes puces à ADN

Initialement, les premières puces à ADN ont été développées sur des membranes de nylon de plusieurs centimètres carrés (macroarray) sur lesquelles étaient déposées des séquences d'ADNc. De par leur taille, ces membranes nécessitaient une quantité importante d'ARN à hybrider (Gress 1992, Nguyen 1995, Zhao 1995, Pietu 1996). Par la suite, la technique a évolué vers la miniaturisation du support permettant d'utiliser une quantité moindre de cible à tester (Granjeaud 1999, Bertucci et al. 1999).

A. La technologie Affymetrix : les puces à oligonucléotides

Développées par la société américaine Affymetrix (Santa Clara, Cal, USA) ces microarrays sont à l'origine de l'appellation puce à ADN. Ce nom vient du mode de fabrication de ces puces qui est inspiré de celui utilisés dans le domaine de l'informatique pour les microprocesseurs. Les oligonucléotides sont synthétisés *in situ* directement sur la surface solide par un processus de photolithographie grâce à un système de masque (Lipshutz 1999). La miniaturisation est poussée à l'extrême sur ces puces puisque les puces actuelles atteignent plus d'un million d'oligonucléotides sur un même support.

B. Les microarrays sur lame de verre

Cette technique consiste à déposer (spotting) des ADNc ou des oligonucléotides sur des lames de verres. Cette technique présente l'avantage de permettre l'analyse simultanée de deux populations d'ARN différentes en utilisant deux marqueurs fluorescents différents. On utilise traditionnellement la cyanine 3 et la cyanine 5 pour ainsi, après lecture au scanner 2 images distinctes et superposables permettant d'étudier le profil d'expression d'un nombre important de gènes dans un échantillon par rapport à une référence. Les signaux d'hybridation ainsi générés sont analysés grâce à un lecteur capable de générer deux images dont le niveau de couleur verte pour la première image et rouge pour la seconde correspondent chacune à un fluorochrome. On obtient alors en les superposant une image en fausses couleurs composée de spots allant du vert au rouge en passant par le jaune. Un excès du gène 1 dans l'échantillon marqué en rouge donnera un signal rouge ; un excès du gène 2 dans l'échantillon en vert donnera un signal vert ; une expression équivalente du gène 3 dans les deux échantillons donnera un signal jaune.

2) Exploitation des données de puces à ADN

Les images obtenues à partir du scanner sont analysées à l'aide d'un logiciel permettant d'extraire les données de fluorescence et de les convertir en données numériques. Le logiciel (dans notre cas Genepix Pro 5) permet ainsi de générer une série de données numériques correspondant aux valeurs moyennes du signal émis par chaque spot présent sur

la lame. Le logiciel d'extraction permet également un premier filtrage des données car il donne la possibilité de repérer visuellement les spots de mauvaise qualité qui ne sont pas exploitables pour la suite de l'analyse. Il est également possible d'exclure de l'analyse les spots dont l'intensité est trop faible où dont le rapport signal/bruit de fond est trop faible. Il est ensuite nécessaire de normaliser les ratios d'expression ainsi obtenus de manière à ajuster l'intensité globale des différentes images obtenues à partir des deux canaux rouge et vert. Cette normalisation permet de corriger les éventuels biais techniques causés par les différences d'incorporation, de fluorescence des fluorochromes mais également les différences dues aux paramétrages des lasers pendant la lecture des lames. Il existe différentes méthodes pour normaliser les données dont notamment la normalisation par rapport à la moyenne globale des intensités, la normalisation par rapport à des gènes de références présent sur la lame ou encore, la normalisation de Lowess. C'est après normalisation que les données d'une lame peuvent être exploitées pour réaliser des statistiques et ainsi convertir les données obtenues à partir de la lecture des lames en phénomènes biologiques notables (Waka Lin 2004 pour revue).

Les puces à ADN permettent de mesurer le niveau d'expression relatif de chaque gène dans un échantillon d'ARN donné comparé à un contrôle de référence. Plus le ratio d'expression entre l'échantillon et la référence est élevé, plus la quantité d'ARN correspondant au gène d'intérêt est importante dans l'échantillon considéré. Il existe deux approches pour analyser des données d'expression issues d'expérience de microarray. La première, l'approche exploratoire qui permet de comparer des échantillons présentant un profil d'expression similaire, la meilleure illustration de cette méthode est le clustering hiérarchique qui permet de regrouper les gènes et les classes d'échantillons selon la similarité de leur profil d'expression (Lyer 1999). La seconde approche permet de comparer les échantillons de manière discriminante en les comparant sur la base de leur appartenance à une classe définie (Mount and Pandey 2005).

L'analyse statistique est un point clé dans l'exploitation de données issues de microarray. Etant donné les nombreuses sources de variations qu'il est possible d'induire à chaque étape de l'expérience (extraction de l'ARN, amplification et marquage de l'ARN, hybridation sur la lame, lecture de la lame au scanner, sélection manuelle des spots...), il est essentiel que l'analyse statistique soit la plus adaptée au design de l'expérience. Par exemple, le clustering hiérarchique se prête mal à l'analyse des différences d'expression entre les gènes de deux groupes de rats bien identifiés. Il existe de nombreux logiciels permettant de réaliser l'analyse statistique complète de données de puces à ADN. Ces logiciels permettent de traiter

les données dès leur normalisation et offrent la possibilité de réaliser de nombreux tests statistiques sur les données après normalisation. Parmi ces différents logiciels on peut citer Bioconductor, BRB-Arraytools ou encore Genecluster. Dans nos différentes études, les analyses statistiques des données ont été effectuées avec le logiciel développé par la société Agilent, Genespring GX. Ces tests statistiques regroupent la plupart des méthodes connues et permettent notamment l'exploitation différentielle des données soit par le test-t pour comparer 2 classes d'échantillons, soit par la méthode ANOVA lorsque l'on souhaite comparer plus de deux classes d'échantillons. Il existe d'autres méthodes pour comparer les classes d'échantillons entre elles, par exemple, il est possible de comparer le ratio d'expression directement et ainsi de déterminer le « fold change » qui permet d'évaluer la différence d'expression d'un gène donné par rapport à ce même gène dans une autre classe d'échantillon (Cui 2003 pour revue).

L'une des plus importantes difficultés dans l'exploitation des données de microarray est de déterminer la pertinence biologique des différences statistiques constatées lors de l'analyse. Au-delà de simplement identifier quels sont les gènes différentiellement exprimés dans un groupe de rat comparés à un autre par exemple, il est fondamental de comprendre comment ces différences d'expression agissent ensemble pour aboutir à une réponse phénotypique complexe. Une approche pour réaliser une telle analyse est d'associer les gènes en fonction de leurs ontologies. Ainsi, si un groupe de gènes regroupés au sein d'une même ontologie est différemment exprimé dans une classe d'échantillon d'intérêt comparé à la classe témoin, il est possible que cette fonction soit impliquée dans la réponse phénotypique observée dans cette classe d'intérêt (Armstrong et Van de Wiel 2004). Il est également possible avec les outils disponibles actuellement d'associer les listes de gènes différentiellement exprimés entre classe d'échantillon à différentes voie métaboliques pour créer ainsi des réseaux de gènes dont l'expression varie dans une situation physiologique donnée (Mount and Pandey 2005). De nombreux outils ont été développés pour permettre la construction de ses réseaux de gènes à partir des voies métaboliques, parmi ceux-ci, on peut citer Pathway Miner ou Ingenuity Pathways Analysis.

En résumé, l'exploitation des données de puces à ADN dépend de nombreux facteurs. Il est en effet possible d'induire des différences entre les échantillons d'intérêts à toutes les étapes du protocole. Il est également important de mettre au point un design d'expérience correct. Il est plus simple de découvrir des différences d'expression fiables et censées lorsque l'on cherche à comparer deux groupes d'échantillons différenciés par une seule variable (par exemple un groupe de rat traité versus un groupe de rat non traité) plutôt que lorsque l'on

compare des échantillons très différents entre eux. L'analyse statistique doit également être intelligemment menée. Une approche différentielle n'est en effet pas judicieuse lorsque les échantillons auxquels on s'intéresse sont mal classifiés. Tous ses éléments font que l'utilisation de la technologie microarray reste, malgré les innovations technologiques, assez lourde à mettre en œuvre et compliquée à exploiter. Cependant, les logiciels disponibles aujourd'hui permettent de réaliser des analyses assez fiables des données obtenues. Il est même également possible d'aller au-delà de la simple comparaison de l'expression entre les gènes, on peut comparer les voies métaboliques entre elles et les associer en réseaux de gènes différentiellement exprimés dans une condition physiologique donnée comparée à une situation physiologique normale.

3) Une puce à ADN dédiée au métabolisme : la Mitoligo

Depuis 2000, l'implantation d'un groupe nutrition dans l'équipe d'Yves Malthiery a mis l'accent sur les anomalies du métabolisme énergétique mitochondrial dans les situations hypercataboliques. Cela se positionne dans un contexte de santé où l'hypercatabolisme affecte 20 à 40% des patients hospitalisés, et 30 à 80% des patients atteints de cancer. Le développement d'une alimentation fonctionnelle et susceptible de moduler certaines de ces anomalies mitochondriales, tout particulièrement par la qualité des lipides (acides gras de la série n-3, produit de la mer et de la filière lin-colza-soja) est la finalité de ces recherches.

Les principaux résultats obtenus au sein de notre laboratoire montrent que dans un modèle de rat hypercatabolique (rat traité par dexaméthasone), une partie de la perte d'énergie est induite par un dysfonctionnement mitochondrial (Dumas 2003 ; Roussel 2003,2004). L'origine de ce dysfonctionnement n'est pas clairement établie et nous envisageons dans ce contexte qu'il puisse être soit à l'origine de perturbation de grandes fonctions cellulaires (protéolyse, protéosynthèse, glycolyse, néoglucogenèse, production et épuration des radicaux libres), soit être la conséquence d'une demande d'énergie accrue pour ces grandes fonctions. L'analyse multi-fonctionnelle par puce à ADN dédiée permettrait d'apporter une réponse à cette question. Dans cette optique, la construction d'une DNA microarray thématique « Mitoligo » rassemblant les gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique de plusieurs organismes s'est imposée comme le meilleur outil pour analyser simultanément l'évolution du transcriptome dans des situations physiologiques d'intérêt et ainsi d'obtenir une vision globale de la dynamique des fonctions mitochondriales.

La Mitoligo a donc été développée dans le but de permettre l'étude du transcriptome de l'homme et du rat en se focalisant sur les grandes fonctions énergétiques. Cet outil nous permet d'étudier le métabolisme mitochondrial dans sa globalité. Il est ainsi possible d'établir un profil transcriptomique de la chaîne respiratoire mais également de toutes les fonctions du métabolisme périphérique et notamment des voies métaboliques impliqués dans la production de substrats pour la chaîne respiratoire. Enfin, la Mitoligo permet également d'étudier le profil transcriptomique de nombreux facteurs de transcription mais également de facteurs hormonaux liés à la régulation du métabolisme énergétique. Dans cette optique, toutes les protéines constitutives des 5 complexes de la chaîne respiratoire ainsi que l'ANT et des complexes d'assemblages de la COX (Surf1, Surf4) sont présents sur la Mitoligo. Nous avons également choisi d'implémenter tous les gènes codant pour des protéines impliqués dans les réactions de la néoglucogénèse, la glycolyse, la protéolyse ubiquitine-dépendante, la beta oxidation des acides gras, la lipogénèse et la glycogénolyse.

La Mitoligo permettra ainsi de caractériser sur le plan transcriptomique les modèles animaux et humains que nous avons déjà caractérisés sur le plan fonctionnel au laboratoire.

PREMIER ARTICLE

“Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment.”

Introduction

Le rat traité par dexaméthasone est un modèle que nous avons développé car il possède de nombreuses particularités fréquemment retrouvées dans certaines situations cliniques. C'est un modèle qui associe une diminution des apports alimentaires, un hypercatabolisme, une insulino-résistance et une augmentation de la dépense d'énergie au niveau du corps entier. Ces symptômes sont fréquemment associés à des situations pathologiques tel que le sepsis où la cachexie cancéreuse.

Le traitement aux glucocorticoïdes chez le rat induit une diminution de la masse corporelle caractérisée par une diminution de la masse musculaire et une diminution de la

masse grasse (Woodward et Emery, 1989). Cette perte de poids s'explique en partie par le caractère anorexigène dû au traitement par glucocorticoïdes chez le rat (Minet-quinard et al. 1999, Kaur et al. 1989). On peut également expliquer cette perte de poids par l'augmentation de la dépense d'énergie au niveau du corps entier (Woodward and Emery 1989, Brillon et al. 1995). Parmi les mécanismes pouvant être impliqués dans cet état d'hypermétabolisme, il apparaît que de nombreuses voies métaboliques très consommatrices en énergie sont activées. Parmi ces voies métaboliques, on peut citer entre autres la néoglucogénèse dans le foie (Souba et al, 1985).

D'autre part, les modifications du profil hormonal constatées chez des rats traités par dexaméthasone (Roussel 2003 cf. résultats complémentaires), laissent à penser que de nombreuses fonctions métaboliques sont perturbées et peuvent expliquer l'augmentation de la dépense d'énergie au niveau du corps entier chez ces rats. Ainsi, l'augmentation significative du taux circulant de T3 ou de leptine est susceptible, comme nous l'avons vu en introduction, de participer aux variations du métabolisme énergétique chez le rat traité par dexaméthasone.

Les précédentes études que nous avons menées au laboratoire ont confirmées que le traitement par dexaméthasone induisait une perte de poids chez le rat et ont également montrées des modifications au niveau du métabolisme énergétique mitochondrial (Dumas 2003). Ainsi, nous avons rapporté une augmentation de la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante mais pas en condition phosphorylante au niveau de la mitochondrie de foie (Dumas et al. 2003). Cette étude complète parfaitement les données précédemment connues qui avaient fait état de variations de la consommation d'oxygène en condition phosphorylante dépendante des substrats utilisés et de l'âge des rats (Kerpolla 1960, Kimberg 1968, Kimura et Rasmussen 1977, Jani et al. 1991). Ces études ont également montré que les modifications du métabolisme mitochondrial constatées chez les rats traités aux glucocorticoïdes ne sont dues ni à la diminution de la prise alimentaire ni à la diminution de masse corporelle (Dumas 2004, Arvier M. Travaux de maîtrise).

Nos résultats montraient une augmentation de la fuite de protons dans les mitochondries de foie de rats (Dumas 2004), cependant, ils ne permettaient pas de comprendre la cause de cette augmentation de la fuite de protons. Etant donné nos conditions de travail (i.e. en présence de BSA), nous pouvons exclure que l'augmentation constatée de la fuite de protons soit le fait de l'augmentation de l'activité d'une protéine découplante. De plus nos résultats permettaient de mettre en évidence une altération du fonctionnement de la mitochondrie à l'état 4 mais ne nous donnaient pas d'indication sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative chez le rat traité par dexaméthasone. C'est pour cela qu'il nous a

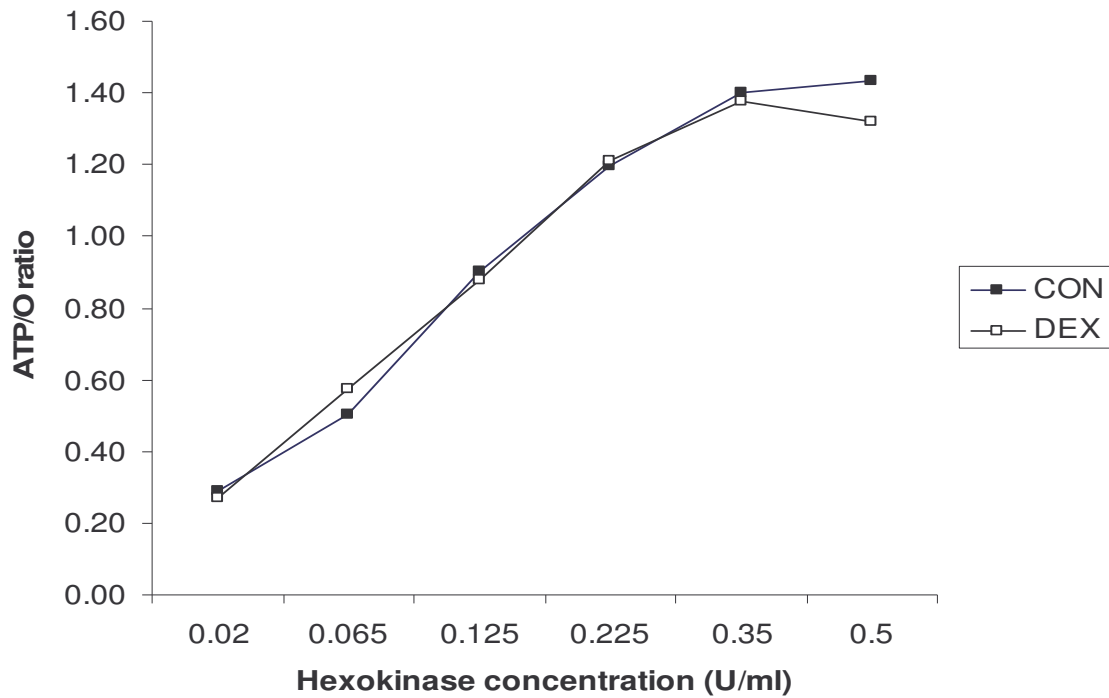
semblé nécessaire de poursuivre ces études en utilisant une approche plus physiologique et en s'intéressant d'avantage aux protéines liées à la phosphorylation de l'ADP qui jouent un rôle essentielles dans la régulation de la production mitochondriale d'ATP.

Dans ce premier article, nous nous sommes intéressés à l'évolution du rapport ATP/O dans les conditions physiologiques, i.e. entre l'état 4 et l'état 3 de la respiration. Pour cela, nous avons utilisé une technique permettant de mesurer la consommation d'oxygène mitochondriale en parallèle de la synthèse d'ATP. Cette technique consiste à faire respirer les mitochondries dans un système générant de l'ADP en condition non-saturante à partir d'un système enzymatique impliquant l'hexokinase en présence de glucose et d'ATP. Cette méthode permet d'induire différents états 3 dont l'intensité dépend de la concentration en hexokinase. Il est ainsi possible d'évaluer la consommation d'oxygène à différentes étapes entre l'état 4 et l'état 3. Cette technique nous permet de mesurer le rapport ATP/O dans des conditions physiologiques et ainsi de comprendre les phénomènes mis en jeu dans la régulation de la phosphorylation oxydative dans une situation physiologique donnée (Groen 1982, Nogueira et al 2001, Rigoulet 1998).

D'autre part, nous voulions également découvrir (et c'était par ailleurs le but premier de cette étude) quels étaient les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de la fuite protons que les études précédentes avaient mis en évidence chez le rat traité par dexaméthasone. De nombreux facteurs peuvent expliquer une variation de la fuite de protons (variations du contenu en phospholipides, présence de protéines découplantes à la membrane...), c'est pourquoi nous avons utilisé des techniques d'étude des lipides et des protéines pour comprendre quels phénomènes étaient mis en jeu chez le rat traité par dexaméthasone.

Résultats complémentaires

ATP/O ratio kinetics depending on hexokinase concentration



Cette figure montre l'évolution du rapport ATP/O en fonction de la concentration en hexokinase. Dans les concentrations que nous avons utilisé, la concentration de 0.5 U/ml s'est avérée être saturante, nous avons donc utilisés les concentrations comprises entre 0.02 et 0.35 U/ml pour réaliser le tableau 1 de l'article 1. Le point correspondant à 0.5 U/ml à été réalisé à partir des moyennes des mesures réalisées pour la mise au point du protocole (travaux de maîtrise Arvier M.).

	CON	DEXA
Leptine	3.6 ± 0.5	5.3 ± 0.4 *
Adiponectine	5.0 ± 0.3	3.21 ± 0.3 *
Insuline	2.3 ± 0.6	6.1 ± 0.4 *
T3	1.33 ± 0.03	1.55 ± 0.06 *

Ce tableau montre les résultats de dosages hormonaux effectués sur des rats traités par dexaméthasone (1.5 mg/kg/jour) pendant 5 jours (Roussel 2003, Données non publiées). Les résultats sont exprimés en nM ; * : différent de CON (p<0.01).

	CON	DEXA
SommeAGPI (omega -3)	0.45	0.40
SommeAGPI (omega -6)	49.39	51.87
Rapport n-6/n-3	110.37	128.86
Index Insaturation	1.46	1.51
16:1	3.93	3.08
18:1	16.50	19.69
18:2 n-6c	46.07	48.88
18:2 n-6t	0.36	0.47
18:3 n-3	0.16	0.15
20:4 n-6	1.13	0.69
22:5 n-3	0.04	0.03
22:6 n-3	0.19	0.16

Ce tableau montre les quantités d'acides gras constitutifs des phospholipides de la membrane interne mitochondriale de rats contrôle et de rats traités par dexaméthasone (n=4).
AGPI : Acide gras polyinsaturés.

Matthieu Arvier, Laëtitia Lagoutte, Gyasi Johnson, Jean-François Dumas, Benoit Sion, Genevieve Grizard, Yves Malthiery, Gilles Simard and Patrick Ritz

Am J Physiol Endocrinol Metab 293:1320-1324, 2007. First published Aug 14, 2007;
doi:10.1152/ajpendo.00138.2007

You might find this additional information useful...

This article cites 30 articles, 11 of which you can access free at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/293/5/E1320#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/293/5/E1320>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

This information is current as of November 26, 2007 .

AJP - Endocrinology and Metabolism publishes results of original studies about endocrine and metabolic systems on any level of organization. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0193-1849, EISSN: 1522-1555. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment

Matthieu Arvier,¹ Laëticia Lagoutte,¹ Gyasi Johnson,¹ Jean-François Dumas,¹ Benoit Sion,² Genevieve Grizard,² Yves Malthiery,¹ Gilles Simard,¹ and Patrick Ritz¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 694, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; and ²Université de Clermont-Ferrand EA 975, Clermont-Ferrand, France

Submitted 1 March 2007; accepted in final form 1 August 2007

Arvier M, Lagoutte L, Johnson G, Dumas J-F, Sion B, Grizard G, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1320–E1324, 2007. First published August 14, 2007; doi:10.1152/ajpendo.00138.2007.—The composition of the mitochondrial inner membrane and uncoupling protein [such as adenine nucleotide translocator (ANT)] contents are the main factors involved in the energy-wasting proton leak. This leak is increased by glucocorticoid treatment under nonphosphorylating conditions. The aim of this study was to investigate mechanisms involved in glucocorticoid-induced proton leak and to evaluate the consequences in more physiological conditions (between states 4 and 3). Isolated liver mitochondria, obtained from dexamethasone-treated rats (1.5 mg · kg⁻¹ · day⁻¹), were studied by polarography, Western blotting, and high-performance thin-layer chromatography. We confirmed that dexamethasone treatment in rats induces a proton leak in state 4 that is associated with an increased ANT content, although without any change in membrane surface or lipid composition. Between states 4 and 3, dexamethasone stimulates ATP synthesis by increasing both the mitochondrial ANT and F1-F0 ATP synthase content. In conclusion, dexamethasone increases mitochondrial capacity to generate ATP by modifying ANT and ATP synthase. The side effect is an increased leak in nonphosphorylating conditions.

ATP production efficiency; glucocorticoids; mitochondrial proton leak

GLUCOCORTICOID HORMONES ARE known to regulate various biological functions such as carbohydrate, protein, and fat metabolism (28). Glucocorticoid treatment, particularly with dexamethasone, induces a hypercatabolic state characterized by accelerated protein turnover in skeletal muscle and gluconeogenesis in the liver, leading finally to augmented energy expenditure. Indeed, dexamethasone administration in healthy humans is associated with an increase in the resting energy expenditure (5, 16, 22, 29), which corresponds to a higher oxygen consumption at the whole body level. We have suggested that the increased energy expenditure may be linked to the effect of glucocorticoids on mitochondria (8, 27, 28). Because 20% of the resting metabolism is due to futile proton cycles across the inner mitochondrial membrane (26), we focused on the proton leak, and our group recently reported that dexamethasone treatment increases nonphosphorylating respiration (8) and basal proton conductance (27) in rat liver mitochondria. Roussel and colleagues (8, 27) have estimated that these phenomena explain a 3% increase in whole-body oxygen consumption.

The exact mechanism of basal proton conductance in mitochondria is not completely understood. Many studies have reported consistent correlations between proton conductance and the inner membrane surface area or the phospholipid composition in mitochondria from different tissues and different species (7, 12, 23). A close relationship has also been established between the basal proton leak and the adenine nucleotide translocator (ANT) content (3). Taking these findings into account, we were led to hypothesize that dexamethasone promotes the proton leak by increasing the mitochondrial ANT content.

In nonphysiological conditions, such as saturating ADP concentrations, dexamethasone is known to lower the ATP-to-oxygen atom ratio (ATP/O) (15, 17, 19) and may reduce the efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation (28). However, mitochondria usually work between state 4 and state 3, conditions that have never been investigated in previous studies. This can be assessed by generating different steady states of ADP concentrations with hexokinase titration. By using such an approach, we conclude that, in this more physiological state, mitochondria from dexamethasone-treated rats exhibit a higher capacity for ATP production. This is probably achieved by an increase in both ANT and ATP synthase content.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and standards. Chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except for Tris and Tris · HCl, which were obtained from Eurobio (Les Ulis, France). Triphenylmethylphosphonium and methanol were purchased from Merck (VWR International, Strasbourg, France), BSA and NADH were from Roche-Boehringer (Meylan, France), bicinchoninic acid assay kit and phospholipids standards were from Interchim (Montluçon, France), and chloroform and hexane were from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

Animals. All investigations were performed according to the guidelines for the care and use of animals from the French Department of Animal and Environmental Protection. These investigations were conducted in a facility approved by The Direction des Services Vétérinaires, by investigators approved by the DSV. Sixteen male Sprague-Dawley rats, born and bred in our animal facilities, were housed in individual cages from the age of 13 wk (330–400 g). Animals were provided with water ad libitum and a standard diet (U-A-R A04) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate, and 21% water, fiber, vitamins, and minerals. The metabolizable energy content was 2.9 kcal/day. Rats were randomly

Address for reprint requests and other correspondence: P. Ritz, Médecine B, CHU, F-49033 Angers Cedex 01, France (e-mail: patrick.ritz@wanadoo.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

allocated into two groups (8 rats per group) as follows: the control group and the dexamethasone-treated group. Dexamethasone-treated rats received a daily intraperitoneal injection of 1.5 mg/kg of dexamethasone for 5 days. All rats were fasted during the night following the 5th day. On the 6th day, animals were killed by decapitation.

Preparation of liver mitochondria. Liver mitochondria were prepared as previously described (21) in a medium containing (in mM) 100 sucrose, 50 KCl, 5 EGTA, and 50 Tris·HCl (pH 7.4). Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid assay kit (Interchim) with BSA used as a standard.

Mitochondrial respiration, membrane potential, and ATP synthesis. Oxygen consumption and membrane potential were measured simultaneously in a closed, stirred Perspex chamber fitted with a Clark oxygen electrode (Rank Brothers, Cambridge, UK) and an electrode sensitive to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP). Mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 5 μM rotenone, 80 ng/ml nigericin, and 3 mM HEPES (pH 7.4, 30°C) supplemented with 0.3% (wt/vol) BSA and saturated with room air. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μM additions up to 2 μM TPMP, after which 5 mM succinate was added to start the reaction. After each run, 2 μM FCCP was added to dissipate the membrane potential and release all of the TPMP back into the medium for baseline correction, if needed. Membrane potentials were calculated as previously described (25), assuming a TPMP binding correction of $0.42 \cdot \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{mg}$ of protein⁻¹ for liver mitochondria (26).

The proton leak kinetics was established by carrying out titrations with nonphosphorylating mitochondria. The respiration and the inner membrane potential were progressively inhibited through successive steady states induced by the addition of malonate (up to 5 mM) in the presence of oligomycin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

In phosphorylating mitochondria, the kinetic response of substrate oxidation and the ATP/O were measured in the respiratory reaction medium supplemented with 20 mM glucose and 125 μM ATP, with increasing concentrations of hexokinase ranging from 0.01 to 0.225 U/ml, in the absence of oligomycin.

Mitochondrial enzyme activities. The activity of citrate synthase was measured in a reaction medium consisting of 100 mM Tris·HCl, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 1 mM oxaloacetate, 0.3 mM acetyl CoA, and 4% Triton X-100 (pH 8.1). After 3 min of incubation, the reaction was initiated by adding the homogenate (20–50 μg protein), and the change in optical density at 412 nm was recorded for 3 min.

Fractionation of mitochondria with the use of Percoll gradients. For lipid analysis and to avoid contamination with broken plasma membrane or endoplasmic reticulum, a portion of the isolated mitochondria was further fractionated on a discontinuous Percoll gradient (60, 30, and 18% Percoll). Mitochondria were charged on the top of the gradient and centrifuged at 8,700 g for 1 h. After centrifugation, mitochondria were collected at the 30–60% interface and washed two times with an isolation buffer (10,000 g for 10 min). The pellet was dissolved in a small volume of the isolation buffer and stored at -80°C . Whole mitochondria from the Percoll gradient isolations were used to determine the mitochondrial phospholipid and fatty acid composition.

Preparation of samples for lipid analysis. Lipids were extracted by the method of Folch et al. (10). Briefly, 5 mg of mitochondrial protein were extracted with a mixture of CHCl_3 -MeOH (1:2 vol/vol) containing 0.005% butylated hydroxyl-toluene to avoid the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. After vortex mixing, 1 ml of water was added to the mixture, which was again vortex mixed and allowed to stand at room temperature for 1 h before centrifugation at 500 g for 10 min. The organic layer was then collected, and the pellet was reextracted. All of the organic layers were pooled and dried in a solvent evaporator. The dry material was dissolved in 500 μl of CHCl_3 -MeOH (2:1, vol/vol) and stored at -80°C awaiting analysis.

Identification of phospholipids by high-performance thin-layer chromatography. High-performance thin-layer chromatography plates were used after prewashing with a mixture of chloroform-methanol (1:1, vol/vol), followed by heating at 130°C for 1 h. The plates were developed with hexane-diethyl ether-glacial acetic acid (80:20:2, vol/vol) or with chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (7:8:1:2:1, vol/vol). The plates were then sprayed with 10% (wt/vol) copper sulfate in 8% (vol/vol) phosphoric acid solution and heated at 160°C for 15 min to stain all of the phospholipids, which were finally identified by reference to standards.

Western blotting. Equal amounts of mitochondrial proteins (15 μg) from each sample (control and dexamethasone-treated rats, $n = 8$) were boiled in the loading buffer and resolved by 12.5% SDS polyacrylamide gels. For immunoblotting, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Hybond-P; Amersham Biosciences) with Tris-glycine electroblotting buffer for 1 h at 260 mA. The blot was blocked for 3 h in a blocking reagent [3% BSA (wt/vol) in $1 \times$ PBS], washed two times in $1 \times$ Tris-buffered saline-Tween 20 for 10 min, and probed overnight at room temperature with a monoclonal antibody, anti-ANT and anti-HSP60 (1:1,000 and 1:1,000 dilution; Calbiochem and Stressgen Reagent), or with anti-porin and anti-ATP synthase β -subunit antibodies (1:2,500 and 1:500 dilution; Calbiochem and Molecular Probes). The blot was washed three times for 10 min in $1 \times$ Tris-buffered saline-Tween 20 and probed for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:20,000; Interchim). Signals were visualized on high-performance chemiluminescence film (Kodak X-Omat) using an enhanced chemiluminescence procedure (Amersham France, Les Ulis, France). The membranes were scanned with the GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA), and the signals were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

Statistical analysis. All results are expressed as mean values \pm SE. All comparisons between dexamethasone-treated rats and controls were made with the Mann-Whitney test. A value of $P \leq 0.05$ was considered significant in all cases. The statistical analyses were performed with SPSS for Windows, version 13.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Mitochondrial membrane potential and oxygen consumption in state 4 respiration. Figure 1 shows the relationship between oxygen consumption and the mitochondrial membrane potential in the nonphosphorylating condition. The generation of a given membrane potential required greater oxygen consumption in dexamethasone-treated rats than in controls. Thus, for a membrane potential of 190 mV, the oxygen consumption was significantly higher in dexamethasone-treated than in control

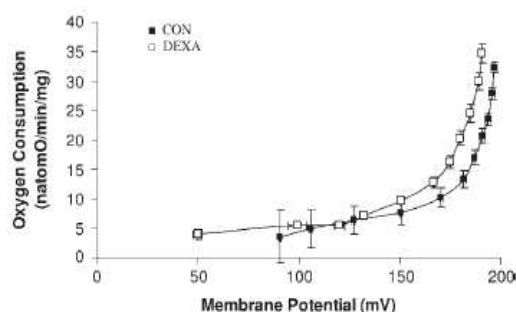


Fig. 1. Relationship between the oxygen consumption rate and the mitochondrial membrane potential in the presence of oligomycin. ■, Control (CON) rats; □, dexamethasone-treated (DEXA) rats. Results are mean values \pm SE; $n = 8$ rats.

rats (23.4 ± 7.4 vs. 17.8 ± 2.8 nanoatoms $O \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ protein $^{-1}$; $P < 0.05$).

Mitochondrial membrane potential and oxygen consumption between state 4 and state 3 of respiration. The relationship between the mitochondrial membrane potential and oxygen consumption was linear for dexamethasone-treated and for control rats (Fig. 2); the mitochondrial membrane potentials were significantly lower in dexamethasone-treated than in control rats.

Relationship between ATP synthesis and oxygen consumption between state 4 and state 3 of the respiration. The relationship between ATP synthesis and oxygen consumption stimulated by increasing hexokinase concentrations is summarized in Table 1. Without any addition of hexokinase (i.e., state 4), oxygen consumption was significantly higher for dexamethasone-treated rats than for control rats ($P < 0.05$). At maximal oxygen consumption (i.e., close to state 3, corresponding to ~90% of the classical state 3), ATP synthesis was significantly higher in dexamethasone-treated rats than in control rats ($P < 0.05$). There was a slight increase (but not significant) in oxygen consumption and ATP synthesis in dexamethasone-treated rats for the other values of hexokinase concentration. However, no differences in ATP/O were observed between dexamethasone-treated and control rats at any hexokinase addition value.

Mitochondrial citrate synthase activity. There was no difference in citrate synthase activity between dexamethasone-treated and control rats (294.4 ± 45.1 vs. 323.0 ± 85.4 nmol $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ of protein $^{-1}$).

Mitochondrial phospholipid composition. Our results show that neither the mitochondrial phospholipid content nor the phospholipid composition was modified by dexamethasone treatment (Table 2). The total amount of phospholipid (expressed as mg of mitochondrial protein) was also unaffected by the treatment (0.146 ± 0.054 vs. 0.128 ± 0.024 mg of total phospholipids/mg of protein for dexamethasone-treated and control rats, respectively). This suggests a similarity of the mitochondrial membrane surface area in dexamethasone-treated and control rats.

Analysis of the ATP synthase β -subunit and ANT content by Western blotting. The relative content of the ATP synthase β -subunit protein (Fig. 3) was significantly higher in dexametha-

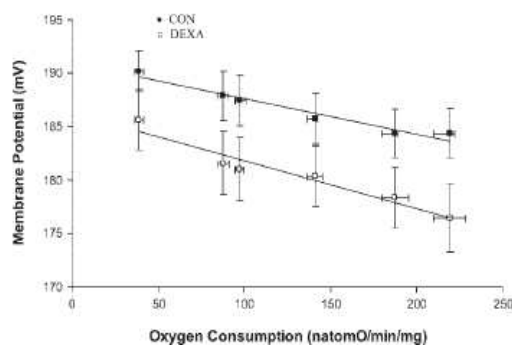


Fig. 2. Relationship between the oxygen consumption rate and the mitochondrial membrane potential. The respiration rate was modulated by subsaturating ADP concentrations generated by hexokinase (0.01–0.225). ■, CON rats; □, DEXA rats. Results are mean values \pm SE; $n = 8$ rats.

Table 1. Oxygen consumption, ATP synthesis, and ATP/O in DEXA-treated rats, at different concentrations of hexokinase, vs. control rats

	Rats	
	Control	DEXA Treated
0 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	59.59 \pm 5.19	84.91 \pm 7.38*
ATP synthesis	ND	ND
ATP/O	ND	ND
0.02 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	76.08 \pm 3.36	89.08 \pm 6.75
ATP synthesis	24.78 \pm 4.17	21.12 \pm 4.95
ATP/O	0.32 \pm 0.05	0.24 \pm 0.07
0.065 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	110.36 \pm 4.91	116.36 \pm 11.63
ATP synthesis	67.46 \pm 5.93	101.28 \pm 13.64
ATP/O	0.5 \pm 0.07	0.76 \pm 0.09
0.125 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	137.46 \pm 4.25	156.72 \pm 21.01
ATP synthesis	123.99 \pm 16.17	119.6 \pm 14.37
ATP/O	0.92 \pm 0.14	0.79 \pm 0.01
0.225 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	178.45 \pm 14.26	183.35 \pm 23.43
ATP synthesis	172.32 \pm 12.52	200.35 \pm 17.56
ATP/O	0.98 \pm 0.06	1.09 \pm 0.27
0.35 U/ml hexokinase		
Oxygen consumption	157.68 \pm 16.46	192.88 \pm 22.01
ATP synthesis	236.58 \pm 13.17	331.63 \pm 40.9*
ATP/O	1.51 \pm 0.26	1.72 \pm 0.25

Values are means \pm SE. Oxygen consumptions values are expressed in nanoatoms $O \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ of protein $^{-1}$, and ATP synthesis values are expressed in nmol ATP $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ of protein $^{-1}$. ATP/O, ATP-to-oxygen atom ratio; DEXA, dexamethasone; ND, not determined. * $P < 0.05$.

sone-treated than in control rats (0.86 ± 0.04 vs. 0.60 ± 0.05 ; $P < 0.05$). The absolute mitochondrial ANT content (Fig. 4) was also significantly higher in dexamethasone-treated than in control rats (0.22 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.01 ; $P < 0.001$).

DISCUSSION

This study gives evidence for a direct impact of glucocorticoids on the efficiency of oxidative phosphorylation. We have previously shown that dexamethasone treatment in rats increased the proton leak (27). In the present study, we confirm this result and show that, in more physiological conditions, i.e., between state 4 and state 3, the ATP synthesis was significantly

Table 2. Phospholipid content of the mitochondrial membrane in dexamethasone-treated vs. control rats

	Rats	
	Control	DEXA Treated
Phospholipid content, %		
Cardiolipin	12.2 \pm 2.1	12.9 \pm 3.8
Phosphoethanolamine	30.4 \pm 2.7	31.2 \pm 2.9
Phosphatidylcholine	57.4 \pm 3.6	55.9 \pm 4.7

Values are means \pm SE.

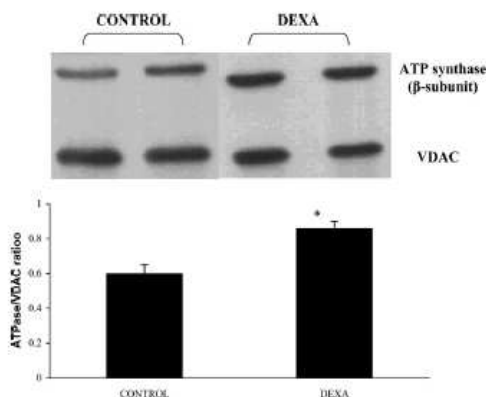


Fig. 3. Western blot. Total proteins were transferred from polyacrylamide gels to a polyvinylidene difluoride membrane with Tris-glycine electroblotting buffer. The blot was probed overnight at room temperature with anti-porin and anti-ATP synthase β -subunit. VDAC, voltage-dependent anion channel. The blot was then probed with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Signals were visualized on high-performance chemiluminescence film using the enhanced chemiluminescence procedure. * $P < 0.01$.

higher in dexamethasone-treated than in control rats. We also found that the ANT and the ATP synthase β -subunit contents were significantly increased by the dexamethasone treatment.

We recently reported that the basal proton conductance of the mitochondrial inner membrane is very different in liver mitochondria of rats given glucocorticoids (8, 27). Among the factors known to affect proton conductance, there is the phospholipid composition of the membrane (2, 4, 13). Many correlative studies comparing mitochondria from different tissues in different species with various thyroid hormonal states have demonstrated the importance of the mitochondrial inner membrane surface area and the phospholipid composition as determinants of the basal proton leak (6, 7). In our study, the evaluation of these factors was performed on whole mitochondria isolated on Percoll gradients, assuming that, at least in the rat liver, the phospholipid content of whole mitochondria reflects the composition of the inner membrane. Our results clearly indicate that dexamethasone treatment modifies neither the membrane surface area nor the phospholipid composition of mitochondria. Natural differences in basal proton conductance also correlate with differences in the fatty acyl composition of phospholipids, and dexamethasone has been reported to depress delta-6- and delta-5-desaturase while increasing delta-9-desaturase in the liver. However, it is unlikely that the increased proton leak that we observed in dexamethasone-treated rats was the result of modification of the fatty acid composition. The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids is almost unaffected by the phospholipid fatty acid composition, and the main effects of dexamethasone, i.e., the increase in oleic acid and the decrease in arachidonic acid, are generally associated with low proton conductance. Nevertheless, we cannot totally exclude the possibility that dexamethasone treatment may specifically modify the acyl composition of some classes of phospholipids. This point needs to be addressed in further studies.

Brand et al. (3) recently stated that there is a striking correlation between mitochondrial proton leak and ANT con-

tent of the mitochondrial inner membrane and suggested that ANT is a major catalyst of the basal fatty-acid-independent proton leak in mitochondria. We found that the dexamethasone treatment increased the ANT content; in fact, dexamethasone-treated rats showed a 100% increase in the ANT content compared with controls. This indicates that the increased ANT content is a major factor in increasing the mitochondrial proton leak in dexamethasone-treated rats. The shift to the left of the nonohmic part of the Nichol's curve confirms that mitochondria from dexamethasone-treated rats display an increase in proton leak. This accounts for the increase in state 4 respiratory rates together with the decrease in protonmotive force that we previously reported (8, 27). However, the ohmic part of the curve is clearly not affected. This led us to exclude a single protonophoric effect of the increased ANT content (24). Moreover, as discussed below, the greater ANT content does not deteriorate the efficiency of such mitochondria since control and dexamethasone-treated rats exhibit similar ATP/O, whereas the protonmotive forces are quite different (see Fig. 2). This clearly indicates that, in phosphorylating conditions, the energy wastage (proton leak and/or redox slip) is comparable in dexamethasone-treated rats and in control rats.

Many studies (15, 17, 20) showed that dexamethasone administration lowers ATP/O. In our present study, we found no significant differences in ATP/O between control and dexamethasone-treated rats. This discrepancy is explained by the fact that ATP/O was not assessed the same way. In the previous studies, ATP/O ratios were only measured using a saturating concentration of ADP. In our present study, ATP/O was measured with a nonsaturating ADP-generating system based on hexokinase, which is more physiological. This means that we can be trustful on the fact that the ATP/O results are not significantly different between dexamethasone-treated and control rats under physiological respiratory state (between state 4 and state 3). Furthermore, ATP/O results are different

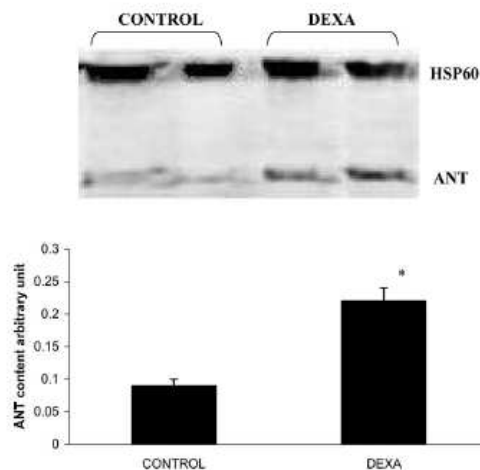


Fig. 4. Western blot. Total proteins were transferred from polyacrylamide gels to a PVDF membrane with Tris-glycine electroblotting buffer. The blot was probed overnight at room temperature with anti-porin and anti-adenine nucleotide translocator (ANT) antibodies. The blot was then probed with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Signals were visualized on high-performance chemiluminescence film using the enhanced chemiluminescence procedure. * $P < 0.01$.

between these two rat groups for higher oxygen consumption with the ADP saturating method (15, 17, 20, 28).

Because the ANT translocates ADP in the mitochondrial matrix, the higher ANT content is likely to increase the ADP flux, thereby enhancing the rate of oxidative phosphorylation (18). More ADP substrate will then be available for F1-FO ATP synthase. Furthermore, a decreased ATP-to-ADP concentration ratio stimulates oxygen consumption under phosphorylating conditions (14). F1-FO ATP synthase β -subunit, i.e., the catalytic subunit, is increased and directly linked to the efficiency of mitochondrial ATP synthesis (12, 13). These results show that dexamethasone improves ATP synthesis in rat mitochondria (Fig. 4 and Table 1). Together, these results indicate that dexamethasone treatment increases the capacity of rat liver mitochondria to phosphorylate ATP.

Glucocorticoid treatment increases gluconeogenesis, lipolysis, and proteolysis (1, 5, 9, 16, 30). These pathways are large-scale consumers of ATP. Our results suggest that the mitochondrial response to ATP requirements is an increase in both the ADP input capacity and of ATP output capacity mediated by ANT. However, the higher ANT content may have a side effect: the increase in the basal proton leak under state 4 of respiration.

Proton leak explains 20% of the whole-body oxygen consumption (25). An increase in proton leak probably increases oxygen consumption (estimated to 3%) at the whole-body level (27). Between state 4 and state 3, mitochondrial oxygen consumption is mildly increased to support higher ATP synthesis. Together, because mitochondria contribute to 90% of the whole-body oxygen consumption, dexamethasone induced changes in mitochondrial metabolism that participate in the increase in resting energy expenditure.

In conclusion, the present study shows that, under physiological conditions, mitochondria of dexamethasone-treated rats improve their ATP production efficiency. Increased ANT and ATP synthase membrane contents may participate in this improvement, the side effect being an increased proton leak under state 4.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pierre Legras, Jérôme Roux, and Dominique Gilbert for animal care and Kanaya Malkani for reviewing the English manuscript.

GRANTS

This work was supported by grants from Contrat de Plan Etat Region 2000–2004.

REFERENCES

- Bowes SB, Jackson NC, Papachristodoulou D, Umpleby AM, Sonksen PH. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Endocrinol* 148: 501–507, 1996.
- Brand MD. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* 33: 897–904, 2005.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 392: 353–362, 2005.
- Brand MD, Turner N, Ocloo A, Else PL, Hulbert AJ. Proton conductance, and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J* 376: 741–748, 2003.
- Brillon DJ, Zheng B, Campbell C, Matthews DE. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268: E501–E513, 1995.
- Brookes PS. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 38: 12–23, 2005.
- Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ, Brand MD. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B* 119: 325–334, 1998.
- Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br J Nutr* 90: 969–977, 2003.
- Feng B, Hilt BC, Max SR. Transcriptional regulation of glutamine synthetase gene expression by dexamethasone in L6 muscle cells. *J Biol Chem* 265: 18702–18706, 1990.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509, 1957.
- Guerrieri F, Kalous M, Adorasio E, Turturro N, Santoro G, Drahota Z, Cantatore P. Hypothyroidism leads to a decreased expression of mitochondrial F0F1-ATP synthase in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 30: 269–276, 1998.
- Hoch FL. Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. *J Bioenerg Biomembr* 30: 511–532, 1998.
- Izquierdo JM, Luis AM, Cuezva JM. Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J Biol Chem* 265: 9090–9097, 1990.
- Jacobus WE, Moreadith RW, Vandegaer KM. Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J Biol Chem* 257: 2397–2402, 1982.
- Jani MS, Telang SD, Katyare SS. Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38: 587–591, 1991.
- Kaur N, Sharma N, Gupta AK. Effects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs. *Indian J Biochem Biophys* 26: 371–376, 1989.
- Kerppola W. Uncoupling of the oxidative phosphorylation with cortisone in liver mitochondria. *Endocrinology* 67: 252–263, 1960.
- Kholodenko BN. Control of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Theor Biol* 107: 179–188, 1984.
- Kimberg DV, Loud AV, Wiener J. Cortisone-induced alterations in mitochondrial function and structure. *J Cell Biol* 37: 63–79, 1968.
- Kimura S, Rasmussen H. Adrenal glucocorticoids, adenine nucleotide translocation, and mitochondrial calcium accumulation. *J Biol Chem* 252: 1217–1225, 1977.
- Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19: 471–479, 1994.
- Minet-Quinard R, Moinard C, Villie F, Vasson MP, Chopineau J, Cynober L. Kinetic impairment of nitrogen and muscle glutamine metabolisms in old glucocorticoid-treated rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E558–E564, 1999.
- Porter RK, Hulbert AJ, Brand MD. Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R1550–R1560, 1996.
- Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E, Ouhabi R, Guerin B. Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces. *Mol Cell Biochem* 184: 5–52, 1998.
- Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731–758, 1997.
- Rolfe DF, Brand MD. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissue. *Biosci Rep* 17: 9–16, 1997.
- Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 541: 75–79, 2003.
- Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P. Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment. *Biochem J* 382: 491–499, 2004.
- Schacke H, Docke W, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96: 23–43, 2002.
- Woodward CJ, Emery PW. Energy balance in rats given chronic hormone treatment. 2. Effect of corticosterone. *Br J Nutr* 61: 445–452, 1989.

Discussion et perspectives

Notre étude confirme les résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire. Les rats traités par dexaméthasone montrent une augmentation de la fuite de protons en condition non phosphorylante (Dumas 2004). Cependant, nous n'avions alors pas pu établir quel paramètre était responsable de cette augmentation de la fuite de protons. Il est connu qu'une modification de la composition en phospholipides de la membrane mitochondriale et notamment de sa composition en cardiolipines influence la perméabilité membranaire de la membrane (Bobyleva et al. 1997). Or, notre étude montre qu'il n'existe aucune modification des taux de cardiolipines, phosphoéthanolamine ou phosphatidylcholine entre des rats traités par dexaméthasone et des rats témoins. De même, il a été montré que la composition en acide gras des phospholipides de la membrane influence la perméabilité membranaire. En effet, la fuite de protons hépatique corrèle positivement avec la concentration d'acides gras insaturés, avec l'index d'insaturation des acides gras composants les phospholipides et avec le taux d'acide linoléique (20 :3 n-6). Inversement, la fuite de protons mitochondriale corrèle négativement avec le taux d'acides gras monoinsaturés et le taux d'acide linoléique (18 :2 n-6) (Brand 1992, Fontaine 1996, Porter 1996, Brand 2003). Cependant, comme pour le taux de cardiolipines, les données dont nous disposons à partir d'une étude préliminaire (cf. résultats complémentaires) montrent qu'il n'existerait pas de différence significative au niveau de la composition en acide gras des différents phospholipides chez le rat traité par dexaméthasone. Cependant, ces résultats ayant été obtenus sur un nombre faible d'échantillons, il n'est pas exclu que la composition en acide gras soit modifiée par le traitement par dexaméthasone. Il existe cependant peu de données dans la littérature concernant les effets des glucocorticoïdes sur la composition de la membrane interne de la mitochondrie, il est donc nécessaire de poursuivre nos investigations dans ce domaine pour comprendre l'influence de la membrane sur la variation de fuite de protons constatée chez le rat traité par dexaméthasone.

Brand et al. ont montré que l'augmentation de la fuite basale de protons pouvait s'expliquer en partie par une augmentation de la quantité d'ANT (Brand 2005). Il était déjà connu que l'ANT pouvait servir de transporteur actif de protons et ainsi concourir à la régulation de la fuite inductible de protons (Samartsev 1997). Cependant, dans cet article, il est clairement établi que ce n'est pas l'activité de la protéine qui provoque des variations de la

fuite de proton mais bien sa présence à la membrane. C'est cette constatation qui nous a décidé à étudier l'expression de l'ANT chez le rat traité par dexaméthasone. Nos résultats de western-blot montrent clairement que le traitement par dexaméthasone entraîne une augmentation de l'expression de l'ANT, comme nous le verrons dans le troisième article de cette thèse, les résultats de puces à ADN confirment ce résultat. Dans ce contexte, il nous a semblé évident que l'augmentation de la fuite protons constatée chez ses rats s'expliquait par cette augmentation de la quantité d'ANT. Cependant, en étudiant les résultats obtenu à l'état 3 de la respiration il nous est apparu évident que cette augmentation de l'ANT n'était pas anodine et pouvait être au centre d'une adaptation complexe de la mitochondrie au traitement par dexaméthasone.

Nos précédentes études avaient montré, en utilisant comme outil le calcul du coefficient de couplage, que l'efficacité de la réaction de phosphorylation oxydative était diminuée chez les rats traités par dexaméthasone (Dumas et al, 2004). Une telle adaptation s'expliquerait par le fait que l'efficacité de la réaction de phosphorylation oxydative serait diminuée quand le rendement de la réaction augmente. C'est-à-dire que la synthèse d'une grande quantité d'ATP entraîne une diminution du rapport ATP/O. Ce phénomène est observé notamment chez des rats rendu hyperthyroïdien par injection de T3 ou le taux de synthèse d'ATP est augmenté mais où le rapport ATP/O est diminué (Nogueira 2002). Le traitement par dexaméthasone stimule de nombreuses voies métaboliques fortement consommatrices en ATP telles que la néoglucogenèse ou l'uréogenèse (Souba et al. 1985, Wolthers et al. 2000). Cet effet de stimulation sur le métabolisme va induire une demande accrue en ATP de la part des cellules, il semble donc logique de penser que la mitochondrie va augmenter son taux de synthèse d'ATP chez le rat traité par dexaméthasone de manière à subvenir aux besoins cellulaires.

C'est pour cela que nous avons décidé d'évaluer l'efficacité et le rendement de la réaction dans des conditions plus proche de l'état physiologique, c'est-à-dire entre l'état 3 et l'état 4. Nos résultats montrent que le rapport ATP/O n'est pas différent entre les rats traités par dexaméthasone et les rats témoins entre l'état 4 et l'état 3. Ce résultat est en contradiction avec ceux des précédentes études qui montraient que dans des conditions saturantes d'ADP, l'ATP/O était diminué chez le rat traité par des glucocorticoïdes (Kimberg 1968, Jani 1991, Roussel 2004). Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous ne stimulons pas l'activité de la chaîne respiratoire à ces limites comme lorsque l'on utilise une dose saturante d'ADP. Or nous avons constaté que le rapport ATP/O avait tendance à atteindre un plateau lorsque l'on utilisait des doses saturantes d'hexokinase voire qu'il avait tendance à diminuer

chez le rat traité par dexaméthasone (cf. figure complémentaire). Ces deux raisons expliquent probablement les différences entre notre étude et les précédentes études réalisées chez le rat traité par dexaméthasone. D'autre part, nous avons constaté que la quantité d'ATP synthétisé, à l'état 3 le plus fort que nous ayons atteint (i.e. avec la dose d'hexokinase maximale), était augmentée chez le rat traité par dexaméthasone. Ce résultat confirme notre hypothèse selon laquelle le rendement de la phosphorylation oxydative est augmenté pour subvenir aux besoins cellulaires en ATP. Cependant, il est intéressant de noter que nos résultats ne montrent pas de diminution de l'efficacité de la réaction chez le rat traité par dexaméthasone. Nos résultats montrent même clairement que l'augmentation du taux de la réaction dans le but d'augmenter la quantité d'ATP synthétisé ne se fait pas en dépit du rendement contrairement à la théorie énoncée par Stucki (1980) et à l'hypothèse que nous avons émises lors de nos précédents travaux (Dumas 2003).

Nos résultats de western blot nous ont permis de mettre également en évidence une augmentation de la quantité de F1-F0 ATP synthase chez les rats traités par dexaméthasone. Ce résultat confirme également cette hypothèse selon laquelle la mitochondrie du rat traité par dexaméthasone met tout en œuvre pour augmenter sa capacité de synthèse d'ATP. En effet, nous avons pu constater que l'ANT et l'ATP synthase était surexprimées chez les rats traités par glucocorticoïdes (en ARN et en protéines). Or ces deux enzymes sont les régulateurs majeurs de la phosphorylation de l'ADP en ATP. Il a été montré que l'ADP contrôlait l'activité de la chaîne respiratoire en condition phosphorylante (Jacobus et al 1981). La surexpression de l'ANT nous laisse supposer qu'il y aura plus d'ADP disponible pour la réaction de phosphorylation. D'autre part, la surexpression de l'ATP synthase peut nous laisser supposer que cet ADP sera massivement transformé en ATP lors de la réaction de phosphorylation oxydative. Or, les résultats obtenus en mesurant l'évolution du rapport ATP/O lors de la stimulation physiologique de la chaîne respiratoire confirme cette hypothèse.

Ainsi, contrairement à ce que laissait supposer nos premiers résultats, la mitochondrie du foie de rat traité par dexaméthasone n'est pas moins efficace. La réaction de phosphorylation oxydative est aussi efficace chez le rat traité par dexaméthasone que chez le rat témoin car il n'y a pas de différence d'ATP/O. Cependant, nos résultats montrent que la capacité brute de synthèse de l'ATP est supérieure chez le rat traité par dexaméthasone et que ceci est possible en augmentant les quantités d'ANT et d'ATP synthase. Or le contexte métabolique induit par la dexaméthasone chez le rat montre qu'il est nécessaire à la cellule de disposer d'une plus grande quantité d'ATP (Souba et al. 1985, Wolthers et al. 2000). Nous

avons donc affaire à une formidable adaptation de la phosphorylation oxydative en vue de fournir le maximum d'énergie à la cellule. Cependant, l'augmentation du rendement de la réaction ne se fait pas sans conséquence comme nous l'avons montré précédemment (Dumas et al 2003, Roussel et al 2003). En effet, l'augmentation d'ANT a pour conséquence une augmentation de la fuite basale de protons (Brand 2005). Cependant, ce phénomène est sans conséquence sur l'efficacité de phosphorylation car il a été montré que chez le rat traité par dexaméthasone, l'effet de la fuite de protons basale était négligeable sur le taux de respiration (et donc l'efficacité de la réaction) à l'état 3 (Roussel 2004).

D'autre part, même si la légère augmentation de la respiration constatée à l'état 3 chez le rat traité par dexaméthasone peut expliquer une partie de l'augmentation de la dépense énergétique constatée chez ces rats, celle-ci ne peut pas expliquer la totalité du phénomène. Il a donc été nécessaire pour comprendre l'intégralité des mécanismes mis en jeu dans la régulation du métabolisme énergétique chez le rat traité par dexaméthasone d'utiliser une approche transcriptomique de manière à discerner les fonctions impliquées dans l'adaptation du métabolisme hépatique à l'hypermétabolisme induit par les glucocorticoïdes. C'est dans cette optique que nous avons décidé d'utiliser une approche transcriptomique à l'aide de notre puce à ADN (Mitoligo) pour comprendre les mécanismes qui sont mis en place lors de cette adaptation du métabolisme dans le but de maximiser la synthèse d'ATP. Enfin, nous nous sommes également interrogés sur le rôle intrinsèque que jouaient l'ANT et l'ATP synthase dans la stimulation de la synthèse d'ATP. Ces deux points d'interrogations concernant l'adaptation métabolique au stress énergétique chez le rat traité par dexaméthasone sont l'objet des articles suivants.

DEUXIÈME ARTICLE

Synergy between glucocorticoids and thyroid hormone promotes oxidative phosphorylation in hypermetabolic rat

Introduction

Comme nous l'avons vu lors de la précédente étude, la dexaméthasone entraîne une augmentation du contenu des deux protéines responsables de la phosphorylation de l'ADP, l'ANT et l'ATP synthase. Dans cette étude, nous avons voulu comprendre le rôle que joue la dexaméthasone dans l'adaptation à une situation de stress métabolique où la demande en ATP est fortement augmentée. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'impact de la dexaméthasone chez un rat en hypométabolisme dont les besoins en ATP sont diminués.

Il est connu depuis longtemps que le statut thyroïdien influence le métabolisme énergétique mitochondrial. Il a notamment été montré que le taux de T3 influençait la quantité d'ANT chez le rat (Dümmeler 1996). Ainsi, nous avons décidé d'étudier les effets de la dexaméthasone chez un rat rendu hypothyroïdien par traitement chimique. Nous avons donc traité pendant 8 semaines des rats avec du 6-propyl-2-thiouracile (PTU) dans l'eau de boisson de manière à diminuer leur taux circulant de T3. Il a déjà été montré des effets de cette méthode chez le rat dans le cadre de l'étude de la phosphorylation oxydative, c'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser ce protocole pour rendre nos rats hypothyroïdiens (Nogueira 2001).

Il est également montré que la T3 possède de nombreux effets sur le métabolisme énergétique et sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative notamment. Il a par exemple été montré que l'excès ou le défaut d'hormones thyroïdiennes influence l'efficacité de la conversion énergétique de la mitochondrie hépatique. Il apparaît que chez des rats rendus hypothyroïdiens par un traitement au PTU, le rapport ATP/O est augmenté par rapport à celui de rats euthyroïdiens. A l'inverse, chez des rats rendus hyperthyroïdiens (injection de T3), l'efficacité de la phosphorylation oxydative est inférieure à celle des rats contrôles (Nogueira 2001). Notre étude va donc nous permettre d'étudier un aspect important de la régulation du métabolisme énergétique dans notre modèle, l'interaction entre les différentes hormones. En

effet, certaines de nos données indiquent que chez le rat traité par dexaméthasone, il y a une augmentation de la T3 circulante. Il va donc être important de déterminer grâce à cette étude quel est l'impact de cette augmentation de la T3 circulante sur les effets que nous avons attribués à notre traitement par dexaméthasone sachant que l'efficacité de la phosphorylation n'est pas diminuée chez le rat traité par dexaméthasone .

Synergy between glucocorticoids and thyroid hormone promotes oxidative phosphorylation in hypermetabolic rat

Matthieu Arvier, Jean-François Dumas, Yves Malthiery, Gilles Simard and Patrick Ritz*.

INSERM U-694, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire CHU, Angers, France.

* Corresponding Author

Address for reprint requests and other correspondence:

Pr. Patrick Ritz Pôle de maladies métaboliques et de médecine interne, CHU, F-49033

ANGERS Cedex 01

Tel: +33 241 35 44 99, fax: +33 241 35 49 69, e-mail: patrick.ritz@wanadoo.fr

ABSTRACT

Background and aims

To satisfy dexamethasone-induced increases in ATP demand mitochondrial oxidative phosphorylation is modified. We have observed that dexamethasone increases plasma T3 in rats. We studied the interaction between T3 and dexamethasone on mitochondrial energy production.

Methods

Adult rats (8 per group) were either made hypothyroid (by drinking 0.05% PTU during 6 weeks) and treated with dexamethasone, or received dexamethasone only, or served as controls. Isolated liver mitochondria were studied by polarography under stimulation by hexokinase/ Furthermore western blotting, membrane potential and ATP synthesis were measured.

Results

Plasma T3 was increased in dexamethasone treated animals whether hypothyroid or not. In hypothyroid rats treated with dexamethasone, mitochondrial membrane potential was higher than in any other groups, and at maximum hexokinase doses ATP synthesis ATP/O were reduced. ATP synthase and ANT contents were similar than in dexamethasone treated animals.

Conclusion

T3 is required for the stimulation of ATP production in dexamethasone treated rats, probably through its effects on the efficiency of ATP synthase

INTRODUCTION

Mitochondria are the main source of ATP in almost all eukaryotic cells and are responsible for approximately 90% of total oxygen consumption. ATP is synthesized in mitochondria through the oxidative phosphorylation reaction, which couples the oxidation by the respiratory chain of substrates arising from Krebs cycle and fatty acid β -oxidation to ADP phosphorylation by F₁-F₀ ATP synthase (11). ADP is imported in mitochondria through the adenosine nucleotide transporter (ANT).

Glucocorticoid treatment, dexamethasone in particular, induces a hypermetabolic state combining reduced food intake and increased energy expenditure (3, 7, 10, 23). We have recently found that mitochondria from dexamethasone treated rats respond to an increase in ATP requirements by an increase in both the ADP input and ATP output capacity mediated by an increased content in ANT and ATP synthase (1). Thus, the increase in state 3 respiration related to higher ATP synthesis rate explains part of the increased resting energy expenditure.

We have consistently observed that glucocorticoid treatment in rats resulted in increased plasma thyroid hormone (T₃) concentration (unpublished data related to reference 20). T₃ is a major regulator of mitochondrial metabolism, in particular through its influence on the protein, lipid and glucose metabolism (6, 22). Furthermore, T₃ administration to rats results in rapid stimulation of oxidative phosphorylation, oxygen consumption and increases in ANT (17) associated with decreased efficiency of oxidative phosphorylation (16) despite an upregulation of ATP synthase activity by T₃. Hypothyroidism reduces resting energy expenditure (13), mitochondrial respiration (15), ANT content (4), and increases the efficiency of oxidative phosphorylation (15).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the contribution of T₃ to the mitochondrial response to dexamethasone treatment. To do so, we compared energy parameters in hypothyroid rats receiving dexamethasone, controls and dexamethasone treated animals.

Materials and methods

Reagents and standards

Chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except for Tris and Tris-HCL, which were obtained from Eurobio (Les Ulis, France). Triphenylmethylphosphonium and methanol were purchased from Merck (VWR International, Strasbourg, France); BSA from Roche-Boehringer (Meylan, France); bicinchoninic acid assay kit and phospholipids standards from Interchim (Montluçon, France); and chloroform and hexane from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

Animals

The present investigation was performed according to the guiding principles of the French department of Animal and Environmental protection for the care and use of animals and in accordance with the American Physiological Society “Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings”. Twenty four male Sprague-Dawley rats, born and bred in our animal facilities, were housed in individual cages from the age of 13 weeks (330-400g). Animals were provided with water *ad libitum* and a standard diet (U-A-R A04) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. The metabolisable energy content was 2.9 kcal/day. Rats were randomly allocated into 3 groups (8 rats per group) as follows: euthyroid control group (CON), euthyroid dexamethasone treated group (DEXA) and hypothyroid dexamethasone-treated group (HYPODEXA). Rats were made hypothyroid using treatment with 0.05% 6n-propyl-2-thyouracile (PTU) for 6 weeks from the age of seven weeks. PTU was dissolved in drink water. Rats treated with PTU were mildly hypothyroid as evidence by a significant reduction in T3 (-40%, $p < 0.01$) and mitochondrial respiration (state 3 decreased by 41% in hypothyroid rat compared to CON rats $p < 0.01$). HYPODEXA and DEXA rats received Dexamethasone treatment via an intraperitoneal injection of 1.5 mg/kg of dexamethasone for 5 days. All rats were fasted during the night following the fifth day. On the sixth day, the animals were killed by decapitation.

Plasma T3 Concentrations

Plasma total T3 concentrations were determined by radio immunoassay (Beckman Coulter, Fullerton, Cal USA).

Preparation of liver mitochondria

Liver mitochondria were prepared as previously described (9) in a medium containing 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 5 mM EGTA and 50 mM Tris/HCl, pH 7.4. Protein concentrations were determined by using the bicinchoninic acid assay kit (Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin used as a standard.

Mitochondrial respiration, membrane potential and ATP synthesis

Oxygen consumption and membrane potential were measured simultaneously in a closed, stirred Perspex chamber fitted with a Clark oxygen electrode (Rank Brothers, Cambridge, England) and an electrode sensitive to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP). Mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 5 μM rotenone, 80 ng/ml nigericin, 3 mM hepes (pH 7.4, 30°C) supplemented with 0.3% (w/v) bovine serum albumin, and saturated with room air. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μM additions up to 2 μM TPMP, after which 5 mM succinate was added to start the reaction. After each run, 2 μM of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) were added to dissipate the membrane potential and release all the TPMP back into the medium for baseline correction, if needed. Membrane potentials were calculated as previously described (18), assuming a TPMP binding correction of $0.42 \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{mg}$ of protein⁻¹ for liver mitochondria (19).

In phosphorylating mitochondria the ATP/O ratio were measured in the respiratory reaction medium supplemented with 20 mM glucose and 125 μM ATP, with increasing concentrations of hexokinase ranging from 0.01 to 0.225 U/ml.

Western Blotting

Equal amounts of mitochondrial proteins (15 μg) from each sample (CON, DEXA and HYPODEXA rats) were boiled in the loading buffer and resolved by 12.5% SDS polyacrylamide gels. For immunoblotting, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Hybond-P, Amersham Biosciences) with Tris-glycine electroblotting buffer for 1 h at 260 mA. The blot was blocked for 3 h in a blocking reagent (3% BSA(w/v) in 1X PBS), washed two times in 1X TBS-T for 10 min, probed overnight at room temperature with a monoclonal

antibody, anti-ANT and anti-HSP60 (1:1000 and 1:1000 dilution, Calbiochem and Stressgen Reagent) or with anti-porin and anti-ATP synthase β subunit antibodies (1:2500 and 1:500 dilution, Calbiochem and Molecular Probes). The blot was washed three times for 10 min in 1X TBS-T, and probed for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:20000; Interchim). Signals were visualized on high performance chemiluminescence film (KodakX-Omat) using an enhanced chemiluminescence procedure (Amersham France, Les Ulis, France). The membranes were scanned with the GS-800™ Calibrated Imaging Densitometer (Biorad, Hercules CA, USA) and the signals analyzed with Quantity One software (Biorad).

Statistical analysis

All results are expressed as mean values \pm SEM. All comparisons between dexamethasone-treated rats and controls were made using the Kruskal-Wallis test. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant in all cases. The statistical analyses were performed using SPSS for Windows, Version 13.0 (Chicago, IL, USA).

Results

Plasma T3 concentrations

Plasma T3 concentration was significantly increased in DEXA rats compared to CON rats (1.55 ± 0.06 nM vs. 1.33 ± 0.03 nM, $p < 0.01$) and to HYPODEXA rats (1.25 ± 0.15 nM, $p < 0.01$). It did not differ between HYPODEXA and CON rats.

Mitochondrial membrane potential between state 4 and state 3 of respiration.

The relationship between the mitochondrial membrane potential and oxygen consumption was linear in the 3 rat groups (Figure 1). The mitochondrial membrane potentials were significantly lower in DEXA than in CON rats. On the contrary, the mitochondrial membrane potential was significantly higher in HYPODEXA rats compared to both CON and DEXA rats.

Relationship between ATP synthesis and oxygen consumption between state 4 and state 3 respiration.

Table 1 shows the values for the rates of oxygen consumption and ATP synthesis for liver mitochondria from CON, DEXA and HYPODEXA rats.

There were no differences in both the oxygen consumption and ATP synthesis between HYPODEXA and CON rats except for the maximal hexokinase concentrations where oxygen consumption was significantly higher in HYPODEXA rats compared to CON rats. ATP/O ratio was significantly decreased in HYPODEXA compared to CON rats for the maximal hexokinase concentration.

There were no differences in both oxygen consumption and ATP synthesis between HYPODEXA and DEXA rats except for the maximal hexokinase concentration where ATP synthesis was significantly lower in HYPODEXA rats compared to DEXA rats.

Western Blotting

There was a significant increase of the ATP synthase β -subunit protein in HYPODEXA and DEXA rats compared to CON rats (figure 2).

There was a significant increase in ANT content in HYPODEXA and DEXA rats compared to CON rats (figure 3).

Discussion

Our recent study showed that dexamethasone induces an adaptation of mitochondrial energy production to match the increase in cellular energy needs (1). Indeed, glucocorticoid treatment, particularly with dexamethasone, induces a hypercatabolic state characterized by accelerated protein turnover in skeletal muscle and gluconeogenesis in the liver, leading finally to a hypermetabolic state characterized at the whole body level by increased energy expenditure in both human and rodents (3, 7, 10, and 23). Our recent study showed that in this context of increased cellular ATP needs, mitochondria exhibit several adaptations. The most striking adaptations were the increase in ATP production capacity achieved through an increase in both ANT and ATP synthase content (1).

Nogueira et al. realized a complete analysis of the effect of both hypothyroidism and hyperthyroidism on oxidative phosphorylation rate and efficiency. It appears that hypothyroidism (achieved with a similar PTU treatment as in this study) increases the efficiency of oxidative phosphorylation whereas hyperthyroidism decreases it. On the contrary, thyroid status had the opposite effects on the rate of oxidative phosphorylation; hyperthyroidism increases ATP synthesis while hypothyroidism decreases this rate. Thus the consequence of a high efficiency of oxidative phosphorylation is therefore a low capacity in ATP synthesis (16).

As confirmed in this study dexamethasone treatment in rats increases plasma T3 concentrations. We therefore chose to give dexamethasone to hypothyroid rats to study the interaction between T3 and dexamethasone on mitochondrial energy metabolism, and to analyse how a hypometabolic animal is able to respond to an increase in ATP demand induced by dexamethasone. As reported in the method section, PTU treatment induces a mild hypothyroid state. Hypothyroidism is known to decrease the rate of whole metabolism and thus decreases cellular ATP needs (14).

The present study shows that dexamethasone did not impair the capacity to generate and maintain the membrane potential in the liver of hypothyroid rat. The generation of the greater membrane potential in HYPODEXA rats occurs without changes respiratory chain complexes activity. We rule out the contribution of a decreased proton leak (which would increase the membrane potential). It is known that proton leak is decreased during hypothyroidism (2, 5), but its contribution to state 3 respiration is trivial (21). However, table 1 clearly shows that HYPODEXA rats are less efficient than both DEXA and CON rats to synthesize ATP as shown by the decreased ATP/O and the failure to increase maximum ATP production.

Between state 4 and state 3 respiration, i.e. over the range of physiological conditions, HYPODEXA rats maintain a higher mitochondrial membrane potential, produce as much ATP, and consume as much oxygen as control and dexamethasone treated animals (cf. figure 1). This is not true near state 3 (maximal hexokinase concentrations) where ATP production requires a higher oxygen consumption (cf. table 1). Therefore, the ATP/O ratio is lower despite an increased ATP synthase content.

It was recently shown that T3 level influences ATP synthase activity (12). Thyroidectomy induces hypothyroidism, decreases the activity of ATP synthase, and this is fully reversed by T3 injection in rat. Our results show that dexamethasone treatment raised the level of circulating T3 in hypothyroid rats, although this level remained slightly lower than in euthyroid rats.

Taken together, these results explain why HYPODEXA rats are less efficient at synthesizing ATP than CON and DEXA rats and also confirm the direct action of dexamethasone on mitochondrial membrane protein composition (1). Indeed, it appears that dexamethasone induces an increase in ANT and ATP synthase content whatever the thyroid status of the rat. The increased ANT content is necessary to increase ADP input and ATP output (9). This is true even in hypothyroid rats which classically display a reduced ANT content (4). DEXA also increases the ATPase content (1) even in hypothyroid rats. Moreover, the shortage of T3 may be sufficient to make ATP synthesis inefficient (12). To satisfy ATP production oxygen consumption has to be increased.

In conclusion, these results suggest that the dexamethasone-induced promotion of oxidative phosphorylation requires the interaction of thyroid hormone. Furthermore, the efficiency of ATP synthase being influenced by T3 concentration (12), this interaction is critical to an efficient capacity to generate ATP. Indeed, during mild hypothyroidism the

ability to respond to an increased ATP demand (dexamethasone treatment) is at the expense of increased oxygen consumption.

References

- 1. Arvier M, Lagoutte L, Johnson G, Dumas JF, Sion B, Grizard G, Malthiery Y, Simard G, Ritz P.** Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Aug 14.
- 2. Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP.** The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem.* 206(3) **1992** 775-81.
- 3. Brillon DJ, Zheng B, Campbell C, Matthews DE.** Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 268(3 pt 1) 1995 E501-13 1995.
- 4. Dümmler K, Muller S, Seitz HJ.** Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem J.* 317 (Pt 3) **1996** 913-8.
- 5. Harper ME, Brand MD.** Hyperthyroidism stimulates mitochondrial proton leak and ATP turnover in rat hepatocytes but does not change the overall kinetics of substrate oxidation reactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 72(8) **1994** 899-908.
- 6. Kadenbach B, Barth J, Akgun R, Freund R, Linder D, Possekkel S.** Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1271(1) 1995 103-9.
- 7. Kaur N, Sharma N, Gupta AK.** Effects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 26(6) 1989 371-6.
- 8. Kholodenko BN.** Control of mitochondrial oxidative phosphorylation, *J Theor Biol.* 107(2) **1984** 179-88.
- 9. Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J.** Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19 1994 471-479.
- 10. Minet-quinard R, Moinard C, Villie F, Walrand S, Vasson P, Chopineau J, Cynober L.** Kinetic impairment of nitrogen and muscle glutamine metabolisms in old glucocorticoid-treated rats. *Am. J. Physiol.* 276(3 pt 1) 1999 E558-64.

- 11. Mitchell P, Moyle J.** Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213(5072) 1967 137-9.
- 12. Modi HR, Patel SP, Katyare SS, Patel M.** Thyroid Hormone Treatments Differentially Affect the Temperature Kinetics Properties of FoF(1) ATPase and Succinate Oxidase as well as the Lipid/Phospholipid Profiles of Rat Kidney Mitochondria: A Correlative Study. *J Membr Biol.* 215(2-3) 2007 135-45.
- 13. Moreno M, Lanni A, Lombardi A, Goglia F.** How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J Physiol.* 505 (Pt 2) 1997 529-38.
- 14. Muller MJ, Seitz HJ.** Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part I: respiration, thermogenesis and carbohydrate metabolism. *Klin Wochenschr.* 62(1) **1984** 11-8.
- 15. Nogueira V, Piquet MA, Devin A, Fiore C, Fontaine E, Brandolin G, Rigoulet M, Leverve XM.** Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr.* 33(1) **2001** 53-61.
- 16. Nogueira V, Walter L, Averet N, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM.** Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 34(1) **2002** 55-66.
- 17. Palacios-Romero R, Mowbray J.** Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats. *Biochem J.* 184(3) **1979** 527-38.
- 18. Rolfe DF and Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 77(3) 1997 731-58.
- 19. Rolfe DF and Brand MD.** The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissue. *Biosci Rep.* 17 1997 9-16.
- 20. Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Simard G, Ritz P.** Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Letters* 541 2003 75-9.
- 21. Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P.** Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment, *Biochem. J.* 382 2004 491-9.
- 22. Soboll S.** Long-term and short-term changes in mitochondrial parameters by thyroid hormones. *Biochem Soc Trans.* 21 (Pt 3)(3) 1993 799-803.

23. Woodward CJ, Emery PW. Energy balance in rats given chronic hormone treatment. 2. Effect of corticosterone. *Br. J. Nutr.* 61(3) 1989 445-52.

Figures and table legends

Figure 1: Relationship between the oxygen consumption rate and the mitochondrial membrane potential. The respiration rate was modulated by subsaturating ADP concentrations generated by hexokinase (0.01-0.225). CON (■), DEXA (□) and HYPODEXA (○) rats. Results are expressed as mean values \pm SEM, n = 8.

Figure 2 and 3: Western Blot. Total proteins were transferred from polyacrylamide gels to a PVDF membrane with Tris-glycine electroblotting buffer. The blot was probed overnight at room temperature with anti-porin and anti-ATP synthase β -subunit or anti-ANT antibodies. The blot was then probed with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Signals were visualized on high-performance chemiluminescence film using the enhanced chemoluminescence procedure. * means different from CON rats and † means different from DEXA rats (P<0.05).

Table 1: Oxygen consumption, ATP synthesis and ATP/O ratios were measured using a subsaturating ADP generating system by addition of different concentrations of hexokinase. Oxygen Consumptions are expressed in $\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\text{mg}$ of proteins, ATP synthesis' are expressed in $\text{nmol of ATP}/\text{min}/\text{mg}$ of proteins. * means different from CON rats and † means different from DEXA rats (P<0.01).

Table 2: Table 2 shows the cytochrome content of CON, DEXA and HYPODEXA rats. * means different from CON rats and † means different from DEXA rats (P<0.01)

Figure 1

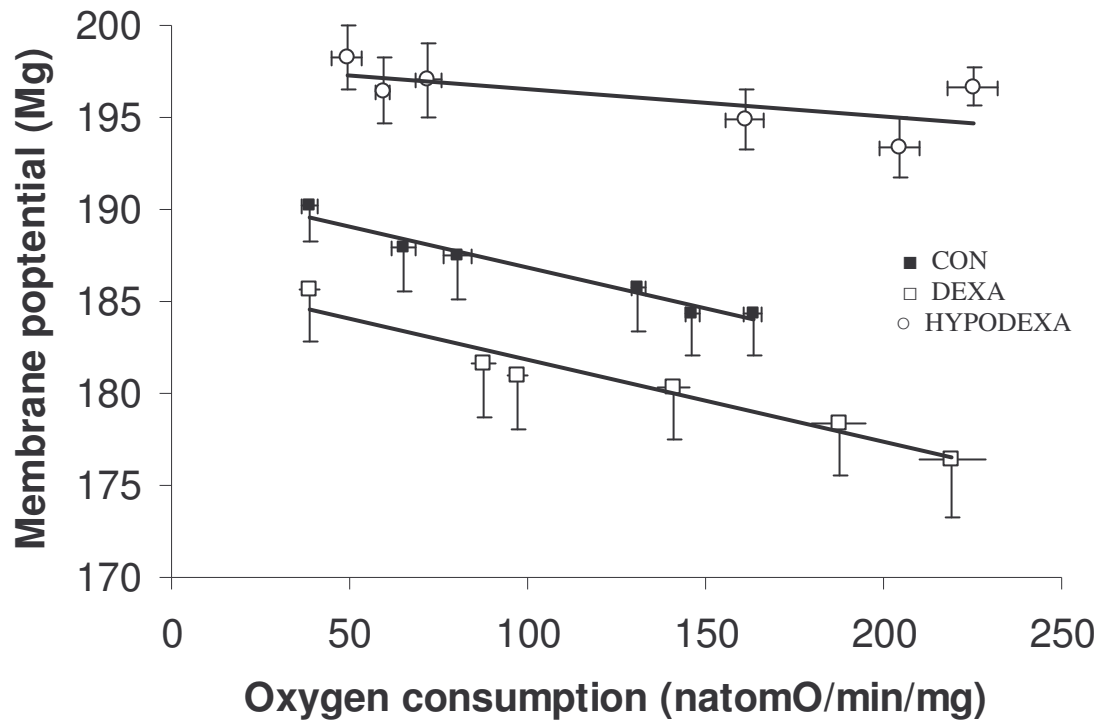


Figure 2

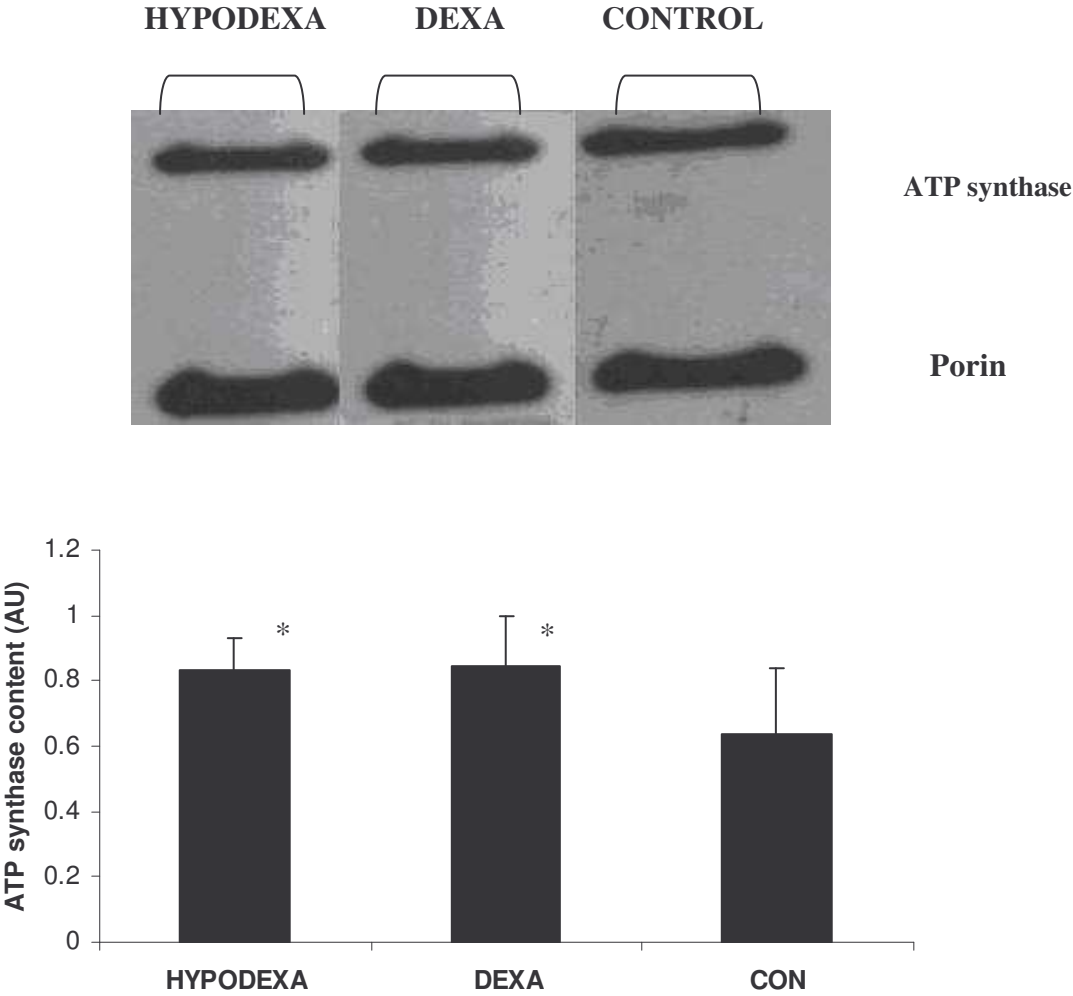


Figure 3

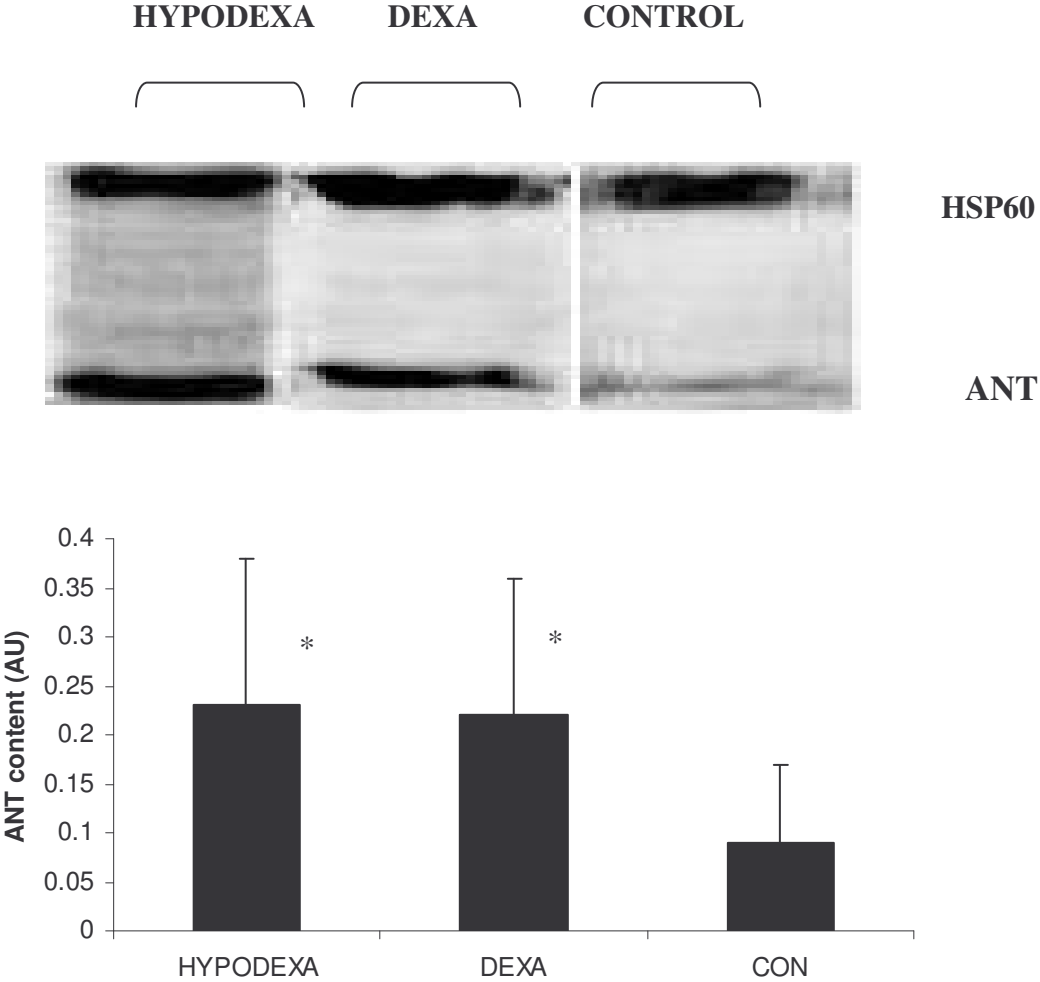


Table 1

Hexokinase (U/ml)		Rats		
		CON	DEXA	HYPODEXA
0	Oxygen consumption	59.59 ± 5.19	84.91 ± 7.38 *	56.51 ± 2.18
	ATP	ND	ND	ND
	ATP/O	ND	ND	ND
0.02	Oxygen consumption	76.08 ± 3.36	89.08 ± 6.75	70.65 ± 2.79
	ATP	24.78 ± 4.17	21.12 ± 4.95	19.53 ± 0.89
	ATP/O	0.32 ± 0.05	0.24 ± 0.07	0.27 ± 0.03
0.065	Oxygen consumption	110.36 ± 4.91	116.36 ± 11.63	118.86 ± 4.84
	ATP	67.46 ± 5.93	101.28 ± 13.64	63.61 ± 3.33
	ATP/O	0.5 ± 0.07	0.76 ± 0.09	0.53 ± 0.06
0.125	Oxygen consumption	137.46 ± 4.25	156.72 ± 21.01	152.91 ± 5.16
	ATP	123.99 ± 16.17	119.6 ± 14.37	125.46 ± 4.51
	ATP/O	0.92 ± 0.14	0.79 ± 0.01	0.82 ± 0.08
0.225	Oxygen consumption	178.45 ± 14.26	183.35 ± 23.43	196.68 ± 5.31
	ATP	172.32 ± 12.52	200.35 ± 17.56	214.26 ± 13.32
	ATP/O	0.98 ± 0.06	1.17 ± 0.27	1.08 ± 0.25
0.35	Oxygen consumption	157.68 ± 16.46	192.88 ± 22.01	219.866 ± 5.68 *
	ATP	236.58 ± 13.17	331.63 ± 40.9 *	248.1 ± 16.32 †
	ATP/O	1.51 ± 0.26	1.55 ± 0.25	1.12 ± 0.28 * †

Discussion et perspectives

Cette étude montre que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans l'adaptation de la mitochondrie à une demande accrue en ATP. Le modèle de rat HYPODEXA nous permet de comprendre les mécanismes mis en œuvre pour cette adaptation. En effet, l'hypothyroïdie induit un hypométabolisme (Müller pour revue), dans cette situation métabolique, les demandes en ATP de la cellule sont réduites. Il était donc intéressant pour nous d'évaluer les effets de la dexaméthasone dans ce contexte métabolique particulier.

Nos résultats montrent clairement que la dexaméthasone augmente la quantité d'ANT et d'ATP synthase indépendamment du statut thyroïdien. Cependant, en fonction du statut thyroïdien, les effets de ces augmentations ne sont pas les mêmes. En effet, il s'avère que chez le rat HYPODEXA, l'efficacité de synthèse de l'ATP est diminuée bien que le taux de production d'ATP ne soit pas diminué. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la T3 augmente l'activité de l'ATP synthase et il s'avère que sans T3, ou tout du moins avec moins de T3, l'ATP synthase n'est pas aussi efficace (Modi 2007). Ces résultats montrent qu'une synergie existe entre ces deux hormones pour permettre l'efficacité de la réponse à une forte demande en ATP comme nous l'avons montré chez le rat DEXA.

D'autre part, l'étude de Nogueira (2001) montrait que l'augmentation du rendement de la phosphorylation oxydative se faisait au détriment de l'efficacité et qu'au contraire, l'augmentation de l'efficacité se fait au détriment du rendement. Nos résultats montrent que ce phénomène doit être lié au statut thyroïdien. En effet, chez le rat DEXA, l'efficacité n'est pas diminuée tandis que le rendement est augmenté, comme le montre le rapport ATP/O dans le premier article. Chez le rat HYPODEXA, l'augmentation du rendement pour compenser les besoins en ATP se font au détriment de l'efficacité, expliquant la diminution du rapport ATP/O sans modification de quantité d'ATP synthétisée. L'augmentation de la T3 circulante chez le rat DEXA pourrait laisser penser que l'augmentation du rendement soit le fait de la T3 et non de la DEXA. Cependant, nos résultats montrent clairement que chez le rat DEXA, il n'y a pas de diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Ce résultat montre la complexité de la réponse au stress métabolique. Dans deux situations de stress métabolique identiques, i.e. des besoins cellulaire en ATP accrus, les effets sur la phosphorylation oxydative sont différents.

Il nous reste cependant un point crucial à étudier pour comprendre la synergie entre les glucocorticoïdes et la T3 dans l'adaptation mitochondriale à l'hypermétabolisme. Il a été montré que les variations plasmatiques de T3 induisent des modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane mitochondriale. Ainsi, on rapporte une augmentation de la surface de la membrane interne mitochondriale (Joste et al, 1989) sous l'effet de la T3, ainsi qu'une altération de la composition en phospholipides (notamment les cardiolipines) entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons (Brand et al, 1992, Harper et al. 1994). Or, l'étude des lipides chez le rat DEXA a montré que la dexaméthasone n'entraînait pas de modification de la composition lipidique de la membrane. Il serait donc intéressant, dans une future étude, de déterminer le profil lipidique des rats HYPODEXA pour voir si la dexaméthasone n'exerce pas une action protectrice sur la membrane vis-à-vis des effets protonophoriques de la T3. Si cette hypothèse se révèle exacte, cela montrerait encore la nécessité d'une synergie entre ces deux hormones pour apporter une réponse physiologiquement adaptée aux effets de l'hypermétabolisme sur la demande en ATP. De plus, cet effet croisé des deux hormones, qui rendrait indispensable leur augmentation commune pour l'adaptation du métabolisme énergétique, expliquerait les profils bioénergétiques observés lorsque seulement une des deux hormones voit son taux augmenté comme c'est le cas chez le rat hyperthyroïdiens ou chez le rat HYPODEXA.

TROISIÈME ARTICLE

“Dexamethasone effects on energy metabolism in rat: switching the whole metabolism toward ATP synthesis.”

Introduction

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser notre outil d'étude du transcriptome dédié à la fonction énergétique mitochondriale, la puce à ADN Mitoligo. L'étude du transcriptome permet de réaliser une véritable photographie du fonctionnement du métabolisme à un instant donné. La Mitoligo a été développée dans le but de mesurer l'expression de gènes codant pour des protéines fortement impliquées dans le métabolisme énergétique ou dans sa régulation.

Dans le cadre de l'étude du rat traité par dexaméthasone, il nous a semblé fondamental de réaliser cette « photographie » du métabolisme énergétique. Il semble en effet primordial d'évaluer les fonctions métaboliques responsables des afflux de substrats en amont de la chaîne respiratoire pour comprendre comment les inhibitions ou les stimulations de ces fonctions par le traitement à la dexaméthasone au niveau du foie de rat pouvaient expliquer le profil énergétique particulier que nous avons mis en évidence dans ce modèle. Il est également important de connaître et de comprendre quels sont les facteurs de régulations qui sont impliqués dans cette adaptation métabolique si particulière. Enfin, la Mitoligo est un formidable outil pour évaluer l'expression des gènes de la chaîne respiratoire étant donné que les ADN codant pour toutes les protéines constitutives de la chaîne respiratoire et du complexe V sont présents sur la puce.

Nos résultats d'étude transcriptomique montrent que de nombreuses fonctions métaboliques sont modifiées par l'administration de dexaméthasone chez le rat. Parmi ces fonctions, on retrouve des voies associées au métabolisme des lipides, des glucides mais aussi de nombreux facteurs de transcriptions et de signalisation cellulaire. Le traitement par dexaméthasone chez le rat induit une surexpression de toutes les voies responsables de la synthèse de substrat pour la chaîne respiratoire. Nous avons ainsi constaté une surexpression de nombreux gènes liés à la beta oxydation des acides gras dont notamment l'enzyme clé de cette voie métabolique, la CPT-1. Nous avons également noté que la glycolyse était surexprimée chez le rat traité par dexaméthasone de même que certaines enzymes du cycle de

Krebs (les déshydrogénases). Enfin, la voie capable de fournir des substrats pour la chaîne respiratoire en utilisant les acides aminés issus de la dégradation des protéines est également stimulée par le traitement par dexaméthasone.

Notre étude montre également une surexpression de tous les complexes de la chaîne respiratoire et confirme les résultats obtenus en western-blot lors de l'étude précédente, à savoir que les ARN messager correspondant aux gènes codant pour l'ANT et l'ATP synthase sont également surexprimés chez le rat traité par dexaméthasone.

La puce Mitoligo permet également de mesurer l'expression de gènes codant pour des protéines ayant des fonctions régulatrices de l'activité de la chaîne respiratoire. C'est ainsi que nos résultats ont permis de mettre en évidence que le traitement par dexaméthasone augmentait l'expression de l'AMP kinase et diminuait l'expression des récepteurs à 2 hormones fortement impliquées dans le métabolisme énergétique, la leptine et la T3.

**Dexamethasone effects on energy metabolism in rat: switching the whole
metabolism toward ATP synthesis.**

Matthieu Arvier, Catherine Chevallier, Gyasi Johnson, Jean-François Dumas, Yves Malthièry,
Gilles Simard and Patrick Ritz*.

INSERM U-694, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire CHU, Angers, France.

* Corresponding Author

Address for reprint requests and other correspondence:

Pr. Patrick Ritz Pôle de maladies métaboliques et de médecine interne, CHU, F-49033

ANGERS Cedex 01

Tel: +33 241 35 44 99, fax: +33 241 35 49 69, e-mail: patrick.ritz@wanadoo.fr

Introduction

Glucocorticoid hormones are known to regulate various biological functions such as the carbohydrate, protein and fat metabolism (1). Glucocorticoid treatment, particularly with dexamethasone, induces a hypercatabolic state characterized by accelerated protein turnover in skeletal muscle and gluconeogenesis in the liver, leading finally to augmented energy expenditure. Indeed, dexamethasone administration in healthy humans is associated with an increase in the resting energy expenditure (2, 3 and 4), which corresponds to higher oxygen consumption at the whole body level. As explained by the chemiosmotic theory, respiration and the transfer of electrons along the Electron Transfer Chain (ETC) are coupled to phosphorylation of ADP to generate ATP (5). We have previously suggested that the increased energy expenditure is related to the effects of glucocorticoids on mitochondria (6, 7 and 8). Since 20% of the resting metabolism is due to futile proton cycles across the inner mitochondrial membrane (9), we focused on the proton leak and reported that dexamethasone treatment increases non-phosphorylating respiration (6) and basal proton conductance (7) in rat liver mitochondria. Roussel et al. have estimated that these phenomena explain a 3% increase in whole-body oxygen consumption (7). In our latest study, we have shown that the mitochondrial response to ATP requirements is an increase in both the ADP input capacity and ATP output capacity mediated by ANT and ATP synthase increased content (10). Thus, the small increase in state 3 respiration induced by this higher ATP synthesis rate might also explain a part of the increased resting energy expenditure.

Some studies investigated the effects of dexamethasone on gene expression. These studies showed that dexamethasone influenced the expression of genes related to major metabolic pathways such as fatty acid oxidation (11), glycolysis (12) or oxidative phosphorylation (13). However, none of these studies were conducted on the liver of adult rats after dexamethasone treatment. Moreover, none of these studies investigated the whole energetic metabolism at the same time. In particular, none of these studies exhaustively focused on the effects of dexamethasone on the genes coding for the complexes of the respiratory chain and those coding for oxidative phosphorylation.

Therefore, we investigated the expression of multiple genes linked to pathways implied in energy metabolism, such as fatty acid oxidation or glycolysis. This led us to study the transcriptional aspect of the energy metabolism in rat liver using a microarray approach.

In order to focus our investigation on metabolism-related genes, we developed a metabolism dedicated microarray tool: the Mitoligo. Using this tool, we show that energy metabolism is significantly modified by dexamethasone treatment, which induces a complete metabolic switch toward a maximal rate of ATP synthesis. We also show that substrate supplying for oxidative phosphorylation is greatly enhanced, and oxidative phosphorylation capacity is increased by dexamethasone treatment.

Material and Method

Animals

All investigations were performed according to the guidelines for the care and use of animals of the French Department of Animal and Environmental Protection. Sixteen male Sprague-Dawley rats, born and bred in our animal facilities, were housed in individual cages from the age of 13 weeks (330-400g). Animals were provided with water *ad libitum* and a standard diet (U-A-R A04) composed of (% total weight) 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. The metabolisable energy content was 2.9 kcal/day. Rats were randomly allocated into 2 groups (8 rats per group) as follows: the control group (CON) and the dexamethasone-treated group (DEXA). Dexamethasone-treated rats received a daily intraperitoneal injection of 1.5 mg/kg of dexamethasone for 5 days. All rats were fasted during the night following the fifth day. On the sixth day, the animals were killed by decapitation.

Total RNA isolation and preparation for microarray

Total RNA was isolated from tissue samples using a standard guanidium isothiocyanate protocol (TRIzol reagent, Invitrogen). RNA integrity was determined using a BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Cy3- and Cy5-labelled (amplified) aRNA was prepared using the Amino Allyl MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Ambion, 1753). The reference sample consisted of a pool of an equal amount of aRNA obtained after the amplification of tRNA from each non-restricted control rat and was labelled with Cy5 (Amersham). For each of different rat within each group (including control group), two replicate tRNA extractions were prepared using the Amino Allyl MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Ambion, 1753) and labeled

individually with Cy3 (Amersham). Each Cy3-labeled sample was mixed with an equal amount of the Cy5- labeled reference sample, pre-incubated with yeast tRNA and polyA RNA, and hybridized to the microarrays.

Gene expression measurements

Microarrays were prepared in-house (Plateforme Puces à ADN-Ouest Génopole, Nantes, France) using 50-mer oligonucléotides probes. The probes were diluted in spotting buffer A (25 μ M in buffer A 1x, Ocimum) and spotted onto epoxysilane-coated glass slides (Slide E, Schott nexterion) using the Lucidea Array Spotter from Amersham. Immediately after spotting, the slides were incubated at 42°C and 55% humidity for 12 h. Slides were washed once in 0.2% SDS and twice in H₂O and then incubated for 20 minutes in H₂O at 50°C, dried by centrifugation (1000 rpm, 3 minutes, 20°C), and stored at 20°C.

The 982 genes that were represented on the microarray were selected for involvement in mitochondrial metabolism. 350 genes are specific for rat while 600 genes are specific of human mRNA. Each gene was spotted in triplicate on the microarrays. Hybridized arrays were scanned at 10 μ m/pixel resolution by fluorescence confocal microscopy (Scanarray 3000, GSI-Lumonics). Signal intensities were extracted with Genepix Pro 5.1.0.19 image analysis software (Axon Instruments, USA). Data were retained based on concordance between the measurements of different types of replicates: biological replicates, technical replicates and combined biological and technical replicates.

Microarray data analysis

Microarray raw data were analyzed using Genespring GX 7.0 (Agilent technologies). Data were normalized using Lowess normalization and per chip per median normalization. Normalized data were compared using ANOVA followed by tukey or student t-test.

Results and discussion

Effect of dexamethasone treatment on oxidative phosphorylation substrate supplying

Carbohydrate as substrate supplier

Table 1 shows that many genes related to carbohydrate metabolism were affected by dexamethasone treatment. Among these genes, those of the glycolysis pathway were overexpressed, including Pyruvate dehydrogenase, Hexokinase and Enolase. These data are in agreement with a study which stated that glucocorticoid treatment increases both the content and activity of enzyme related to glycolysis (12). Glucose being the main energy source for many mammalian cells, its blood levels is precisely controlled. The liver plays a major role in glucose homeostasis by maintaining a balance between the uptake and storage of glucose via glycogenesis and the release of glucose via gluconeogenesis/glycolysis (14).

Dexamethasone treatment increases ATP consumption in hepatocytes leading to a decrease in ATP/ADP ratio which could directly stimulate either Krebs cycle dehydrogenases or glycolysis. The aim would be to increase substrate supply for respiration (15).

We also noticed that 4 genes linked to Krebs cycle were upregulated in DEXA rats. Among these genes were two dehydrogenases, namely Malate dehydrogenase and Ornithine dehydrogenase. Others studies already demonstrated this stimulatory effect of glucocorticoids on Krebs cycle activity (11).

Surprisingly, we did not notice any differences in the expression of genes related to the neoglucogenesis pathway. Effects of glucocorticoids on Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) have been shown for a long time (16, 17). However, recent studies suggest that this stimulation is mediated through co activators such as PGC-1 α or the AMP activated protein kinase (AMPK) (18, 19). The latter study demonstrated that AMPK overexpression inhibits PEPCK gene expression (18). As shown in table 1, AMPK is overexpressed in DEXA rats, confirming Vianna's study results and probably explaining the absence of overexpression of PEPCK in this study.

Fatty acids as substrate supplier

In mammals, fatty acids β -oxidation, and acetyl-Coa oxidation, provides the major source of ATP for the heart and skeletal muscle, and a substantial source of ATP in the liver. Moreover, hepatic β -oxidation provides ketone bodies to the peripheral circulation. These ketone bodies are another fuel source for many organs such as brain when glucose blood levels are low. Therefore, fat is an efficient energy source and fatty acid oxidation is essential as a substrate supplier during fasting, sustained exercise or stress (20). Dexamethasone treatment induces deep modifications in fatty acid metabolism in rat liver. The results presented in table 1 show that fatty acid oxidation is up-regulated in these animals compared to control animals. Indeed 9 genes related to this function are overexpressed in dexamethasone treated rats compared to control rats. Among these genes is Carnitine-palmytoil transferase 1 (CPT-1) which is main regulator of this function (20). In the liver, CPT-1 activity is allosterically regulated by Malonyl-Coa levels. When Malonyl-Coa level rises, CPT-1 activity decreases (22). Moreover, it has been shown that fatty acid induces CPT-1 expression in rat liver (22). It is known that dexamethasone stimulates lipolysis and increases free fatty acid (FFA) level in rats (23). In this context, dexamethasone treatment is likely to stimulate fatty acid oxidation in the liver through the increase in FFA. Moreover, as shown here, the increased expression of the Malonyl-Coa decarboxylase is likely to stimulate fatty acid oxidation in the liver as previously shown by Zang et al (24). Such an effect of glucocorticoid on the transcription of genes of the fatty acid oxidation had been shown in the kidney of rats during lactation. These genes were not up-regulated in the liver of these rats during lactation (11).

We did not notice any differences in genes related to fatty acid biosynthesis but we found that Sterol-regulatory-element binding-factor (Srebf) was underexpressed in DEXA rats compared to control animals. Srebf is a transcription factor which promotes fatty acid synthesis (25). The decreased expression in Srebf noticed here might be related to a decrease in lipogenesis activity. However, we can not be conclusive on dexamethasone-induced inhibition of fatty acid biogenesis since no genes of lipogenesis were affected by dexamethasone treatment in our study.

We also noted that 1 gene related to ketone body synthesis was overexpressed in DEXA rats, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase (Hmgcs2). It has been shown that Hmgcs2 is the main control point over ketogenesis, and thus an increase in its

expression is likely to increase the production of ketone bodies (26). Dexamethasone stimulates Hmgcs2 expression and increases the rate of ketogenesis (27) as confirmed by our results. It is also to be noted that ketogenesis is promoted by an intense lipolysis.

Protein breakdown as substrate supplier

A response to a decrease in nutrient availability is an increase in protein degradation in order to use amino-acid as substrates for neoglucogenesis or as Krebs cycle intermediates (28). Table 1 shows that genes coding for proteins involved in proteolysis were overexpressed in dexamethasone treated rats compared to control rats (Usp14, Ube2d2, and Usp48). This suggests that protein degradation may be increased in rat liver, and amino-acids may be used as substrates for supplying oxidative phosphorylation and/or neoglucogenesis. This effect of dexamethasone on protein breakdown is well-known and as already been shown in cat hepatocytes (1, 29, 30, 31 and 32).

Moreover, we found that 3 genes related to urea cycle were significantly different in dexamethasone treated rats compared to controls. Namely, got 1 and got 2 are overexpressed and Arg2 was underexpressed. This result seems to indicate that most of the amino-acid obtained by protein degradation are directed toward Krebs cycle.

Effect of dexamethasone treatment on oxidative phosphorylation complexes

In the present study, most of the complexes of the Electron transport chain (ETC) were affected by dexamethasone treatment in the rat liver. We found that sub-units of all the complexes of ETC were overexpressed in DEXA rats. Namely, Ndufs4 was overexpressed in complex 1, SDHC and SDHD were overexpressed for complex 2. We also found an overexpression of Etf1 and Cytb5, proteins related to complex 3 and overexpression of Cytochrome c which is located between complexes 3 and 4. The phosphorylation complex was also concerned by this overexpression. Indeed, 5 subunits of ATP synthase were found to be overexpressed (ATP5g, ATP5a, ATP5e, ATP5f, ATP5d) and even ANT was found to be overexpressed in DEXA rats compared to controls. This result is in agreement with the increased ANT and ATP synthase protein content observed in this model (10).

As discussed above, the whole energy metabolism in the liver seems to be dedicated to the ATP synthesis in dexamethasone treated rats. Most of the cellular ATP is synthesized in mitochondria by the oxidative phosphorylation reaction. The efficiency of this reaction is

influenced by many parameters (33) and among these parameters are the ETC content and activity and phosphorylation complexes (ANT and F1-F0 ATP-synthetase) content and activity. We have previously shown that dexamethasone promotes oxidative phosphorylation efficiency in order to maximize ATP synthesis in rat liver by a stimulating action on the phosphorylation complexes (10).

Effects of steroid hormones on oxidative phosphorylation have been suggested for a long time (34). In the liver, it has been reported that dexamethasone treatment exerts its effect on cytochrome c oxidase transcripts levels (36). However, our data do not show overexpression of COX levels transcripts. However, previous results were obtained on hepatoma strain cell, using qRT-PCR method to assess the transcript quantity. Dexamethasone stimulates the transcription and activity of cytochrome c, as found in our data (13). Moreover, many effects of steroid hormones on the stimulation of oxidative phosphorylation have been reported in various tissues, and glucocorticoids stimulate both activity and content of some of the oxidative phosphorylation components (36). However, it is the first time to our knowledge that an extensive study of the expression of all the genes related to ETC complexes is realized. Indeed, our results demonstrate that dexamethasone promotes the quantity of all the complexes of ETC and not only on the COX as it was previously reported.

Switching the metabolism toward ATP synthesis: A role for AMP-activated protein kinase in dexamethasone effects on metabolism?

AMP-activated kinase (AMPK) is an energy sensing protein that, when activated by an increase in ADP/ATP ratio, increases ATP production by stimulating glucose uptake and fatty acid oxidation while inhibiting some ATP consuming processes such as protein synthesis (37). Moreover, it has been shown that AMPK inhibits expression of neoglucogenesis and of fatty acid synthesis related genes (38), and promotes the expression of genes related to fatty acid oxidation (39). We found that AMPK was overexpressed in dexamethasone treated rats, without changes in the expression of genes related to neoglucogenesis but with numerous genes linked to fatty acid oxidation overexpressed. Moreover, one gene related to protein synthesis was underexpressed (Rps24), and one gene related to glycogen degradation was underexpressed in DEXA rats (Pygl). One gene related to phospholipid biosynthesis was underexpressed in DEXA rats. All these metabolic functions have been reported to be regulated by AMPK (38). Thus, we can propose that the switch observed in energy

metabolism of glucocorticoids treated rats, may be regulated or coordinated by AMPK. This statement will certainly need further studies to fully understand the link between glucocorticoids treatment effects on metabolism and AMPK expression. This hypothesis is in agreement with recent studies showing that AMPK plays a central part of the ATP recovery following ATP breakdown caused by uncoupling of the respiratory chain in fibroblasts (41, 42).

Other effects of dexamethasone treatment on metabolism related gene expression

Reactive oxygen Species Generation and Scavenging

Reactive oxygen species (ROS) are an inevitable byproduct of electron transport along the electron transport chain (42). As oxidative phosphorylation rate is increased in DEXA rats and as ETC complexes expression is increased, it seems interesting to investigate the effect of these adaptations on the ROS generating and scavenging system in DEXA rats. Indeed, we found that many genes related to glutathione metabolism (Gstt1, Gstt2, Gpx1 and Gpx3) and that Nfe2l2, a transcription factor linked to ROS generation was underexpressed in DEXA rats. Such effect of dexamethasone on GST expression had already been shown in rat hepatocytes primary culture (43). We also found in our results that Aco2 was overexpressed in DEXA rats. Aconitase is very sensitive to ROS damage (44) on protein and its overexpression might somehow be related to an increase in ROS concentrations in DEXA rats liver cell. It has already been shown that dexamethasone increases ROS production in other tissues (45, 46). This double effect of dexamethasone on ROS production and scavenging might explain, as hypothesized by others (47), the suppressive effects of dexamethasone on immune system.

As discussed above, dexamethasone treatment greatly increases the rate of energy metabolism and more particularly the rate of oxidative phosphorylation. Moreover, this increase in the electron transport chain rate is likely to increase the ROS generation. However, the ROS scavenging system is not increased in DEXA rats, probably meaning that the metabolic rate increase constated in those rats may be somehow harmful for the cell. This result is another side of the effects of dexamethasone on metabolism that should be assessed in further studies.

Conclusion

In our previous study, we have shown that dexamethasone treatment promotes oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. To enhance ATP production an increased in ADP input capacity (mediated by ANT content) and ATP output capacity (mediated by ATP synthase content) of the liver mitochondria were described (10). The microarray approach we used in this study helps understanding the integrated mechanisms set up to fulfill the cellular ATP needs under a hypermetabolism state. The present study shows that the whole energy metabolism is dedicated to this increase in ATP production capacity. As previously shown (1, 2 and 3), dexamethasone induces a hypermetabolic state in rats responsible for an increase in resting energy expenditure. In this study, we clearly show that the response to this increase in cellular ATP needs is an integrated response of the whole energetic metabolism activity, which affects resting energy expenditure.

However, this study reveals that all the major pathways involved in energetic metabolism are stimulated by dexamethasone treatment. Dexamethasone stimulates the use of carbohydrates as substrates for the oxidative phosphorylation reaction by increasing expression of both glycolysis enzymes and Krebs cycle dehydrogenases. Fatty acid oxidation is also increased by dexamethasone treatment in rat liver. First, several genes related to β -oxidation pathway are overexpressed and notably CPT-1. Second, the overexpression of malonyl-Coa decarboxylase suggests that β -oxidation is stimulated by a decrease in malonyl-Coa, which is known to inhibit CPT-1 activity. Finally, the increase in ketone bodies production can be the consequence of the increase in FFA oxidation in the liver of dexamethasone treated rats. Taken together these results show that, like for carbohydrate metabolism, the lipid metabolism is dedicated to provide substrates for the oxidative phosphorylation. The same is true for protein breakdown. Simultaneously, the ETC complexes and the protein linked to phosphorylation of ADP are overexpressed.

In conclusion, this study shows that dexamethasone is responsible for a integrated stimulation of energy metabolism in liver. Dexamethasone stimulates substrates supplier pathways as well as oxidative phosphorylation. This is to match ATP production to energy demand. This study also suggests that AMPK could play a central role in the switch of the energetic metabolism toward a promotion of ATP synthesis.

Acknowledgements

Authors thank Pierre Legras, Jérôme Roux and Dominique Gilbert for animal care.

References

1. Schacke H, Docke W, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96(1) 23-43, 2002.
2. Brillon DJ, Zheng B, Campbell C, Matthews DE. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 268(3 pt 1) E501-13 1995.
3. Kaur N, Sharma N, Gupta AK. Effects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 26(6) 371-6, 1989.
4. Minet-quinard R, Moinard C, Villie F, Walrand S, Vasson P, Chopineau J, Cynober L. Kinetic impairment of nitrogen and muscle glutamine metabolisms in old glucocorticoid-treated rats. *Am. J. Physiol.* 276(3 pt 1) E558-64, 1999.
5. Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature.* 213(5072):137-9, 1967.
6. Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Letters* 541 75-9, 2003.
7. Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P. Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment, *Biochem. J.* 382 491-9, 2004.
8. Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br J Nutr.* 90(5):969-77, 2003.
9. Rolfe DF and Brand MD. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissue. *Biosci Rep.* 17 9-16, 1997.
10. Arvier M, Lagoutte L, Johnson G, Dumas JF, Sion B, Grizard G, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 2007 .

11. Djouadi F, Bastin J, Kelly DP, Merlet-Benichou C. Transcriptional regulation by glucocorticoids of mitochondrial oxidative enzyme genes in the developing rat kidney. *Biochem J.* 315 (Pt 2):555-62, 1996.
12. Lemaigre FP, Rousseau GG. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J.* 303 (Pt 1) 1-14, 1994.
13. Weber K, Bruck P, Mikes Z, Kupper JH, Klingenspor M, Wiesner RJ. Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology.* 143(1) 177-84, 2002.
14. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* 19 379-406, 1999.
15. Ainscow EK, Brand MD. Internal regulation of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 266(3):737-49, 1999.
16. Nebes VL, Morris SM Jr. Induction of mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) by dexamethasone in cultured rat hepatocytes requires on-going protein synthesis. *Biochem J.* 246(1) 237-40, 1987.
17. Espinet C, Vargas AM, el-Maghrabi MR, Lange AJ, Pilkis SJ. Expression of the liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA in FAO-1 cells. *Biochem J.* 293 (Pt 1) 173-9, 1993.
18. Herzog B, Hall RK, Wang XL, Waltner-Law M, Granner DK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, as a transcription amplifier, is not essential for basal and hormone-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Mol Endocrinol.* 18(4) 807-19, 2004.
19. Vianna CR, Huntgeburth M, Coppari R, Choi CS, Lin J, Krauss S, Barbatelli G, Tzameli I, Kim YB, Cinti S, Shulman GI, Spiegelman BM, Lowell BB. Hypomorphic mutation of PGC-1beta causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metab.* (6) 453-64, 2006.
20. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 41(3) 2001 197-239.
21. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev.* 5(3):271-84, 1989.
22. Chatelain F, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J, Pegorier JP. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes.

Eur J Biochem. 235(3):789-98, 1996.

23. Divakaran P, Friedmann N. A fast in vitro effect of glucocorticoids on hepatic lipolysis. *Endocrinology*. 98(6) 1550-3, 1976.

24. Zang Y, Wang T, Xie W, Wang-Fischer YL, Getty L, Han J, Corkey BE, Guo W. Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes. *Obes Res*. 13(9) 1530-9, 2005.

25. Lavoie JM, Gauthier MS. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci*. 63(12) 2006 1393-409.

26. Hegardt FG. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J*. 338 (Pt 3) 569-82, 1999.

27. Casals N, Roca N, Guerrero M, Gil-Gomez G, Ayte J, Ciudad CJ, Hegardt FG. Regulation of the expression of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. Its role in the control of ketogenesis. *Biochem J*. 283 (Pt 1) 261-4, 1992.

28. Finn PF, Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*. 22(7-8) 830-44, 2006.

29. Bowes SB, Jackson NC, Papachristodoulou D, Umpleby AM, Sonksen PH. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Endocrinol*. 148(3):501-7, 1996.

30. Feng B, Hilt DC, Max SR. Transcriptional regulation of glutamine synthetase gene expression by dexamethasone in L6 muscle cells. *J Biol Chem*. 265(30) 18702-6, 1990.

31. Umpleby AM, Russell-Jones DL. The hormonal control of protein metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 10(4) 551-70, 1996.

32. Silva SV, Mercer JR. The control of protein degradation in monolayer cultures of cat hepatocytes. *Int J Biochem*. 24(10):1651-6, 1992.

33. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1604(2):77-94, 2003.

34. Allan EH, Chisholm AB, Titheradge MA. The stimulation of hepatic oxidative phosphorylation following dexamethasone treatment of rats. *Biochim Biophys Acta*. 725(1):71-6, 1983.

35. Van Itallie CM. Dexamethasone treatment increases mitochondrial RNA synthesis in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology*. 130(2) 567-76, 1992.

36. Scheller K, Sekeris CE. The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp Physiol*. 88(1) 2003 129-40.

37. Winder WW, Thomson DM. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys*. 47(3) 332-47, 2007.
38. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 116(7) 1776-83, 2006.
39. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 108(8) 1167-74, 2001.
40. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(29):12017-22, 2007.
41. Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(19):7933-8, 2007.
42. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(12) 2478-503, 2005.
43. Voss SH, Park Y, Kwon SO, Whalen R, Boyer TD. Role of interleukin 6 and corticosteroids in the regulation of expression of glutathione S-transferases in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J*. 317 (Pt 2):627-32, 1996.
44. Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Miziorko H, Epstein CJ, Wallace DC. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(3):846-51, 1999.
45. Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 92(1):81-7, 2003.
46. Sanner BM, Meder U, Zidek W, Tepel M. Effects of glucocorticoids on generation of reactive oxygen species in platelets. *Steroids*. 67(8):715-9, 2002.
47. Bjelakovic G, Beninati S, Pavlovic D, Kocic G, Jevtovic T, Kamenov B, Saranac LJ, Bjelakovic B, Stojanovic I, Banic J. Glucocorticoids and oxidative stress. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 18(2):115-27, 2007.

Figure legend:

Table 1: Differentially expressed gene between DEXA and CON rats ($p < 0.01$). Blackened lines correspond to underexpressed gene and white lines correspond to overexpressed genes.

Figures:

	Unigene Accession	Gene Symbol	Gene Name	Metabolic Pathway
Lipid metabolism	NM_053965	Slc25a20	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase	fatty acid oxidation
	NM_001004085	Crat	Carnitine acetyltransferase	fatty acid oxidation
	AF020776	Cpt1	Carnitine palmitoyl Transferase 1	fatty acid oxidation
	NM_012930	Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2	fatty acid oxidation
	NM_017306	Dci	Dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase	fatty acid oxidation
	NM_057186	Hadhsc	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	fatty acid oxidation
	NM_012891	Acadvl	Acyl-Coa dehydrogenase Very long chain	fatty acid oxidation
	NM_022193	Acaca	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	fatty acid oxidation
	D16479	Hadhb	Mitochondrial trifunctional protein	fatty acid oxidation
	NM_053477	Mlycd	MalonylCoa Decarboxylase	fatty acid oxidation
NM_173094	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutary-Coenzyme A synthase	ketone bodies synthesis	
Carbohydrate metabolism	BC079137	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase	glycolysis
	NM_053826	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase	glycolysis
	NM_012554	Eno1	Enolase 1	glycolysis
	NM_022179	Hk3	Rattus norvegicus hexokinase 3	glycolysis
	NM_012595	Ldhb	Lactate dehydrogenase B	glycolysis
	NM_207592	Gpi	Glucose phosphate isomerase	glycolysis
	NM_031151	Mdh2	Malate dehydrogenase 2	krebs cycle
	AH003693	Sucla	Succinyl CoA synthetase alpha subunit	krebs cycle
NM_001017461	Odh	Oxoglutarate deshydrogenase	krebs cycle	
Protein metabolism	NM_001008301	Usp14	Rattus norvegicus ubiquitin specific protease 14	proteolysis
	NM_001037292	Ube2d2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	proteolysis
	NM_198785	Usp48	Ubiquitin specific protease 31	proteolysis
	NM_012571	Got1	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1	urea cycle
	NM_013177	Got2	Glutamic-oxaloacetic transaminase 2	urea cycle
NM_019168	Arg2	arginase 2	urea cycle	
oxidative phosphorylation	NM_001025146	Ndufs4	NADH:ubiquinone oxidoreductase	oxidative phosphorylation
	NM_001005534	Sdhc	succinate dehydrogenase complex subunit C	oxidative phosphorylation
	NM_198788	Sdhd	succinate dehydrogenase complex, subunit D	oxidative phosphorylation
	NM_012839	Cycc	cytochrome c, somatic	oxidative phosphorylation
	NM_198742	Etfdh	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	oxidative phosphorylation
	NM_022245	Cytb5	Cytochrome B5	oxidative phosphorylation
	NM_053756	Atp5g	F1F0 ATP synthase c subunit	oxidative phosphorylation
	AF010323	Atp5e	F1F0 ATP synthase epsilon subunit	oxidative phosphorylation
	NM_023093	Atp5A	F1F0 ATP synthase alpha subunit	oxidative phosphorylation
	NM_134364	Atp5f1	F1F0 ATP synthase beta subunit	oxidative phosphorylation
	U00926	Atp5d	F1F0 ATP synthase delta subunit	oxidative phosphorylation
	D12771	SLC25A5	Adenine nucleotide translocator	oxidative phosphorylation
	NM_024398	Aco2	aconitase 2	Reactive oxygene species
	NM_012796	Gstt2	glutathione S-transferase theta 2	Reactive oxygene species
NM_031789	Nfe2l2	Nuclear factor erythroid derived 2 like 2	Reactive oxygene species	
NM_053293	Gstt1	Glutathione S-transferase 1	Reactive oxygene species	
NM_022525	Gpx3	Glutathione peroxidase 3	Reactive oxygene species	
ROS	NM_023991	Prkaa2	AMP-activated protein kinase catalytic subunit	signalisation
	NM_013010	Prkag1	Protein kinase AMP-activated gamma non-catalytic subunit	signalisation
	AF286470	Srebf1	sterol regulatory element binding factor 1	signalisation
Signalisation				

Discussion et perspectives

L'analyse du profil d'expression transcriptomique que nous avons réalisé à l'aide de la puce Mitoligo nous a permis de mettre en évidence que la dexaméthasone modifie complètement l'orientation du métabolisme énergétique hépatique chez le rat. Le point clé de cette modification d'orientation réside dans le profil d'expression des gènes codant pour des protéines liées à des voies métaboliques impliquées dans l'apport de substrats pour la phosphorylation oxydative. Le glucose est la source privilégiée de substrats pour la phosphorylation oxydative. Ainsi, notre étude montre que la glycolyse et le cycle de Krebs sont stimulés lors du traitement par dexaméthasone de manière à augmenter l'afflux de substrat pour la chaîne respiratoire. Ces résultats étant en accord avec les données de la littérature montrant que les glucocorticoïdes possèdent un effet stimulant sur la glycolyse via une action sur le taux de glucose-6-phosphate (Lemaigre 1994) et que le cycle de Krebs joue un rôle dans l'adaptation de la cellule à l'augmentation des besoins en ATP (Ainscow 1999). Ainsi, nous pouvons affirmer au vu de ces résultats que le traitement par dexaméthasone induit une stimulation des voies métaboliques permettant d'utiliser les carbohydrates comme substrats de la phosphorylation oxydative.

Les acides gras sont également une source potentielle de substrats pour la phosphorylation oxydative. L'utilisation des acides gras comme substrats est un processus très efficace pour la cellule et c'est d'ailleurs ce substrat qui est utilisé pour subvenir aux besoins dans les situations de jeun ou de stress (Eaton 2001 pour revue). Le traitement par dexaméthasone stimule l'expression de gènes liés à la beta oxydation des acides gras, notamment la CPT-1. La CPT-1 est l'enzyme clé de la régulation de l'oxydation des acides gras. La CPT-1 est souvent présentée comme l'étape limitante de la beta oxydation des acides gras étant donné que l'enzyme est responsable de l'entrée des acides gras dans la réaction (Eaton 2001). Ainsi, l'augmentation d'expression de la CPT-1 constatée chez le rat traité par dexaméthasone est susceptible d'induire une stimulation de l'oxydation des acides gras dans le but d'augmenter l'apport en substrat pour la chaîne respiratoire. De façon concomitante à la stimulation de l'oxydation des acides gras, nous avons constaté une augmentation de l'expression de l'hydroxy-méthylglutaryl-CoenzymeA synthase, une enzyme clé de la synthèse des corps cétoniques. Une étude d'Aguiar et al. (1986) avait déjà montré les effets cétogéniques de la dexaméthasone sur des hépatocytes en cultures. Cette étude avait également constaté un lien entre cet effet sur la synthèse des corps cétoniques et le statut redox de la cellule hépatique en présence de dexaméthasone. Ces auteurs faisaient alors

l'hypothèse que les variations du statut redox lors du traitement par dexaméthasone pouvait être dû à une augmentation de l'activité d'oxydation de la chaîne respiratoire (Agius 1986). Cette étude suggérait également que ce phénomène accompagnait des changements métaboliques plus importants visant à accroître la capacité de synthèse de l'ATP. Notre étude, réalisée 20 ans après celle-ci, montre que cette hypothèse était avérée. En effet, nous avons précédemment montré que la mitochondrie de foie chez le rat traité par dexaméthasone est capable de synthétiser plus d'ATP qu'une mitochondrie hépatique de rat témoin.

Il n'y a pas que les lipides et les carbohydrates qui sont concernés par cette stimulation globale de l'apport en substrat, les protéines sont également mises à contribution pour fournir la chaîne respiratoire en équivalent réduit. En effet, la cellule peut utiliser la dégradation des protéines de manière à libérer des acides aminés qui seront utilisés pour la synthèse *de novo* de glucose ou comme intermédiaire du cycle de Krebs (Finn 2006 pour revue). Dans notre étude, nous avons montré que certains gènes codant pour des protéines associées à la dégradation des protéines (par la voie de la protéolyse ubiquitine dépendante) étaient surexprimés lors du traitement par dexaméthasone et que les acides aminés en résultant étaient probablement redirigés vers le cycle de Krebs pour servir de substrats à la phosphorylation oxydative.

L'étude du transcriptome nous montre ici, que tout le métabolisme énergétique est orienté vers cette maximisation de la synthèse d'ATP à commencer par les voies métaboliques situées en amont de la chaîne respiratoire et permettant d'apporter des substrats pour initier la réaction de phosphorylation oxydative. Il est d'ailleurs très intéressant de noter que le traitement par dexaméthasone entraîne une surexpression de tous les complexes de la chaîne respiratoire ainsi que de l'ANT et de l'ATP synthase. Ce résultat confirme des données de la littérature décrivant les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des gènes de la chaîne respiratoire (Van Itallie 1992, Weber 2002, Scheller 2003). Il confirme également les données de protéomique que nous avons obtenues lors de notre précédente étude. D'autre part, cette stimulation de l'ensemble des acteurs de la phosphorylation illustre une nouvelle fois l'adaptation du métabolisme mitochondrial dans le but de maximiser la synthèse d'ATP.

Notre approche transcriptomique a ainsi permis de montrer que l'intégralité du métabolisme était orientée de manière à favoriser une synthèse d'ATP maximale. Ce contexte énergétique explique les résultats de notre précédente étude et conforte notre hypothèse selon laquelle la mitochondrie adapte son fonctionnement de manière à répondre aux besoins cellulaires en ATP. Cependant, l'étude transcriptomique permet également d'émettre de

premières hypothèses sur les facteurs de transcription impliqués dans la mise en place de cette adaptation.

Parmi tous ces facteurs, il semble que l'AMP kinase joue un rôle central dans l'orientation du métabolisme énergétique en réponse à la situation de stress induite par le traitement à la dexaméthasone. L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est en quelque sorte un censeur du statut énergétique de la cellule et notamment du rapport ADP/ATP (Winder 2007). De nombreuses études montrent l'implication de l'AMP kinase dans la régulation de grandes fonctions métaboliques qui sont stimulées ou inhibées lors du traitement par dexaméthasone chez le rat (Long 2006, Zhou 2001). La surexpression de l'AMPK induite par le traitement à la dexaméthasone pourrait expliquer les modifications d'expression de gènes liés à de nombreuses voies métaboliques, c'est pourquoi nous pensons que ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle central dans la réponse au stress métabolique induit par la dexaméthasone. L'étude de l'importance de l'AMPK dans les effets des glucocorticoïdes sur le métabolisme feront probablement l'objet d'une future étude au sein de notre groupe.

Il est également intéressant de constater que la dexaméthasone modifie le profil d'expression de nombreux gènes liés à d'autres hormones, notamment la T3 et la leptine. Comme nous l'avons vu précédemment, ces hormones sont fortement impliquées dans la régulation du métabolisme. Les effets de la dexaméthasone et ceux de ces hormones ne peuvent pas être totalement dissociés. Il apparaît alors fondamental de comprendre quel est le rôle joué par chaque hormone dans notre modèle pour évaluer précisément les effets directs de la dexaméthasone sur le métabolisme énergétique d'une part mais également les effets de ces autres hormones sur la régulation du métabolisme énergétique dans la situation de stress induite par la dexaméthasone. Toutes les modifications dans le profil hormonal ou dans le profil d'expression de nombreux récepteurs aux hormones chez le rat traité par dexaméthasone sont autant de pistes à explorer pour affiner notre connaissance du modèle.

En conclusion, l'approche transcriptomique que nous avons réalisée en utilisant la Mitoligo nous a permis de réaliser une véritable cartographie des voies métaboliques impliquées dans la réponse au stress énergétique induit par la dexaméthasone. Ainsi, cette étude montre que l'ensemble du métabolisme énergétique est stimulé sous l'effet du traitement par dexaméthasone chez le rat. D'autre part, cette étude, en plus des nombreuses réponses qu'elle apporte, soulève également de nombreuses questions. Il nous reste maintenant à comprendre comment est mise en place cette réponse au stress énergétique et quel est le rôle des différents facteurs de transcription et des différentes hormones dont nous avons montré l'implication dans ce modèle.

QUATRIÈME ARTICLE

“Does short-term caloric restriction and fasting slow down the ageing process: a comparative study using both microarray and bioenergetics?”

Introduction

La restriction calorique (RC) de quelques jours est un phénomène fréquemment rencontré dans des situations médicales (préparation pour exploration fonctionnelles ou préopératoires). C'est également une situation physiologique rencontrée dans les cas de dénutrition. Les études menées dans notre laboratoire sur des restrictions caloriques à court terme montrent que 3 jours de restriction calorique chez le rat induisent une adaptation passive et active chez le rat (Dumas et al. 2003). Il est apparu clairement dans nos données que la masse relative du foie diminuait en cas de restriction calorique à court terme et d'intensité moyenne (Restriction de 40% pendant 5 jours ; Dumas et al, 2003). Ces résultats ont également montré que la restriction calorique induisait des modifications du métabolisme énergétique mitochondrial. La restriction calorique induit une diminution de la consommation d'oxygène à l'état 3 et ce en fonction de l'intensité de la restriction calorique. Les différentes études réalisées sur des mitochondries isolées montrent que cette diminution de consommation d'oxygène s'explique par une diminution d'activité au niveau de la chaîne respiratoire. Cependant, ces études montrent également qu'il n'y a pas de différence d'efficacité de synthèse d'ATP chez des rats restreints en calorie. Il semble donc qu'il existe une réelle adaptation de la mitochondrie dans le but d'économiser les substrats dont elle dispose lors d'une situation de restriction calorique.

D'autre part, la RC est le seul moyen physiologique connu permettant d'augmenter l'espérance de vie chez le rongeur (Masoro 1982). Cette faculté de la RC s'expliquerait par une diminution de la production de ROS qui par conséquent diminuerait les dommages subits par les lipides, les protéines et les acides nucléiques lors de stress oxydatif cellulaire (Sohal 1996, Droge 2002). La mitochondrie est la source principale de production de ROS, il apparaît donc naturel de penser que si la RC induit une diminution d'activité de la chaîne respiratoire, la production de ROS sera également diminuée (Gilca 2007). De tels effets ont également été montrés pour le jeun dont les effets sur le profil d'expression transcriptomique

au niveau du foie montrent une activation de voie métabolique impliquées dans les processus qui permettent l'allongement de l'espérance de vie (Bauer 2004). Paradoxalement, d'autres études montrent des effets néfastes du jeun sur la production de ROS (Sorensen 2006), le jeun augmenterait ainsi les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif.

De nombreuses études ont montré les effets de la RC ou du jeun sur l'expression des gènes dans le foie (Cao 2001, Spindler 2006, Spindler 2007 pour revue, Bauer 2004), cependant aucune étude n'a dressé le profil d'expression des complexes de la chaîne respiratoire lors de la RC ou du jeun. La Mitoligo s'imposait alors comme l'outil idéal pour établir ce profil.

C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser la Mitoligo pour étudier l'expression des gènes du métabolisme de rat soumis à une restriction calorique pendant 3 jours de manière à comprendre les effets de la restriction calorique à court terme (RCCT) et d'un jeun de 3 jours sur le métabolisme énergétique et de déterminer un éventuel effet « anti-vieillessement » de la RCCT ou du jeun. Nous avons également voulu étudier les effets du jeun sur le métabolisme énergétique mitochondrial.

Does short-term caloric restriction and fasting slow down the ageing process: a comparative study using both microarray and bioenergetics?

Matthieu Arvier, Jean-François Dumas, Catherine Chevallier ‡, Gyasi Johnson, Jean-fred Fontaine, Yves Malthiery, Gilles Simard and Patrick Ritz*.

INSERM U-694, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire CHU, Angers, France.

‡ INSERM U533-Ouest Génopole, Nantes, France

* Corresponding Author

Address for reprint requests and other correspondence:

Pr. Patrick Ritz Pôle de maladies métaboliques et de médecine interne, CHU, F-49033

ANGERS Cedex 01

Tel: +33 241 35 44 99, fax: +33 241 35 49 69, e-mail: patrick.ritz@wanadoo.fr

Introduction

Caloric restriction in rodents (CR) is the only known experimental intervention that increases life span (17). Although the benefits of CR are well-established, the mechanisms underlying such benefits remain poorly understood. Recent studies brought increasing evidences that oxidative damage to proteins, lipids and DNA may be responsible for normal aging and that CR may reduce the damage done to these molecules (6, 22). It has also been shown that fasting in mice induces the stimulation of metabolic pathways involved in life-span-prolonging processes (1).

Mitochondrion is the main source of endogenous oxidants implicated in ageing. The rate of respiration is responsible for the rate of generation of reactive oxygen species (ROS) (22). The theory of ageing predicts that the mitochondrial DNA (mtDNA) proximity to the main source of free radicals in the cell makes it very susceptible to oxidative damage and thus increases the occurrence of mtDNA mutation. This increase in mtDNA mutations leads to dysfunction in the mitochondrial oxidative phosphorylation process as mtDNA encodes for proteins constituting the electron transport chain (ETC). The decreased efficiency in electron transfer increases ROS production leading to a vicious circle suspected to be one of the principal causes of ageing (10). As CR and fasting lead to reduced ROS production, and thus to reduce oxidative damage to the cell, this may explain why CR and fasting increase life span in rodents.

During nutritional interventions, the liver is one of the most affected tissues since it regulates the supply of energy substrates to different tissues (27). It is suggested that the liver plays an important part in the anti-ageing effects of CR by modulating the substrates use in the whole body (18). Few studies investigated the effects of CR and/or fasting on the metabolism related gene expression in the liver, and all showed significant modifications in gene expression profiles (4, 24 and 25). CR reduces the rate of glycolysis and promotes the use of protein as substrates for *de novo* glucose synthesis (5). Moreover, CR stimulates Krebs cycle enzymes activity and content and thus promotes gluconeogenesis (12). Bauer et al. (2004) recently shown that fasting mimics the effects of CR in mice, and induces modifications of numerous genes expression related to energy metabolism, such as those of urea cycle (1). These studies illustrate that both fasting and CR deeply modifies the energy metabolism in order to promote life-span. However, none of these studies investigated the effects of either CR or fasting on ETC gene expression profile.

It has also been shown that CR decreases the rate of respiration in phosphorylating and non-phosphorylating conditions (2, 9, 11 and 16). This decrease in oxygen consumption is likely to decrease ROS production and oxidative damage to the cell. On the other hand, fasting has been shown to increase mitochondrial state 3 respiration and ANT content in rat liver (28). This is likely to increase oxidative stress in mitochondria from fasted rats. Moreover, ROS production from complex III of the ETC was increased by fasting (23).

In the present study, we wanted to investigate the expression of multiple genes linked to pathways of energy metabolism. We developed a metabolism dedicated microarray tool: the Mitoligo. This microarray gathers genes linked to the main functions of energy metabolism, such as glycolysis or fatty acid oxidation. This biochip has also been designed to study the expression of genes encoding for all the subunits of proteins constituting the ETC. Eventually, genes coding for protein linked to ROS scavenging systems can also be studied using the Mitoligo.

In the present paper, we investigated the effects of 3 days caloric restriction and starvation on rat liver gene expression using this dedicated microarray.

Materials and Methods

Animals

The present investigation was performed according to the guiding principles of the French department of Animal and Environmental protection for the care and use of animals and in accordance with the American Physiological Society “Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings”. Twenty-four male Sprague-Dawley rats, born and bred in our animal facilities, were housed in individual cages at 12 weeks of age (370-420g). Animals were provided with water ad libitum and a standard diet (U.A.R A04) consisting (by weight) of 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrate and 21% water, fiber, vitamins and minerals. The metabolisable energy content was 2.9 kcal/g. Rats were randomly separated into 3 groups as follows: control fed (CON) group (n=6), the calorie restricted (CR) group and the 100% calorie restricted (fasted) group. The rats in the CON group consumed the standard diet ad libitum while the other rats were food-restricted and received 25 and 50% (CR group) of the food given to the control group. The rats in the fasted group were totally deprived of feeding. The experimental design was conducted for 3 days. On the 4th day, the animals were

killed by decapitation. Liver was removed rapidly and weighed. Some tissue samples were immediately used for respiration and potential membrane measurements and the remainder were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in order to measure enzyme activity levels and gene expression levels.

Liver mitochondria preparations

The liver was removed, weighed and immediately placed in an ice-cold isolation medium consisting of 250 mM sucrose, 1 mM EGTA and 10 mM Tris/HCl, pH 7.4. Liver mitochondria were prepared as previously described (8). Protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid Assay kit (Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin (BSA) used as a standard.

Mitochondrial respiration

Oxygen was measured with a Clark oxygen electrode (oxygraph Oroboros), in a glass cell 2 ml in volume, thermostatically controlled at 30°C, with constant stirring. Mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM Hepes (pH 7.4) supplemented with 0.3% (w/v) bovine serum albumin (BSA), and saturated with room air. Substrate concentrations were 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate, 40 μM palmitoyl-l-carnitine + 2.5 mM malate. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 150 μM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4-oligomycin) was obtained by addition of 3 ng/μl of oligomycin. The uncoupled state of respiration was initiated by the addition of 2 μM of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). Other separate respiration were conducted as follows: one was started by adding 1.5 mM ADP + 5 mM glutamate, then 5 mM succinate and finally 3 μM myxothiazole + 5 mM ascorbate + 0.5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD). Finally, another was started by adding 3 ng/μl of oligomycin + 5 mM glutamate, then 5 mM succinate and finally 3 mM myxothiazole + 5 mM ascorbate + 0.5 mM TMPD. RCR was the ratio of oxygen consumed after addition of ADP to that consumed in the presence of oligomycin.

Calculation of thermodynamic coupling of oxidative phosphorylation

Parameters were calculated using the methodology as previously described (7).

Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential was determined as previously described (8) using the same respiratory reaction medium with 5 mM glutamate + 5 mM succinate and supplemented by 80 ng/ml nigericin to cancel out the pH difference across the inner membrane. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μ M additions up to 2.5 μ M TPMP+.

Mitochondrial enzyme activities

The activities of citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SD) and complexes I, III and IV were measured spectrophotometrically at 37°C using liver isolated mitochondria as previously described (8), the only difference being that the isolated mitochondrial protein concentrations were 10 μ g (CS), 3 μ g (SD), 10 μ g (complex I), 10 μ g (complex III) and 5 μ g (complex IV).

Total RNA isolation and preparation for microarray

Total RNA was isolated from tissue samples using a standard guanidium isothiocyanate protocol (TRIzol reagent, Invitrogen). RNA integrity was determined using a BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Cy3- and Cy5-labelled (amplified) aRNA was prepared using the Amino Allyl MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Ambion, 1753). The reference sample consisted of a pool of an equal amount of aRNA obtained after the amplification of tRNA from each non-restricted control rat and was labelled with Cy5 (Amersham). For each of different rat within each group (including control group), two replicate tRNA extractions were prepared using the Amino Allyl MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Ambion, 1753) and labeled individually with Cy3 (Amersham). Each Cy3-labeled sample was mixed with an equal amount of the Cy5- labeled reference sample, pre-incubated with yeast tRNA and polyA RNA, and hybridized to the microarrays.

Gene expression measurements

Microarrays were prepared in-house (Plateforme Puces à ADN-Ouest Génopole, Nantes, France) using 50-mer oligonucléotides probes. The probes were diluted in spotting buffer A (25 μ M in buffer A 1x, Ocimum) and spotted onto epoxysilane-coated glass slides (Slide E, Schott nexterion) using the Lucidea Array Spotter from Amersham. Immediately after spotting, the slides were incubated at 42°C and 55% humidity for 12 h. Slides were washed once in 0.2% SDS and twice in H₂O and then incubated for 20 minutes in H₂O at 50°C, dried by centrifugation (1000 rpm, 3 minutes, 20°C), and stored at 20°C.

The 982 genes that were represented on the microarray were selected for involvement in mitochondrial metabolism. 350 genes are specific for rat while 600 genes are specific of human mRNA. Each gene was spotted in triplicate on the microarrays. Hybridized arrays were scanned at 10 μ m/pixel resolution by fluorescence confocal microscopy (Scanarray 3000, GSI-Lumonics). Signal intensities were extracted with Genepix Pro 5.1.0.19 image analysis software (Axon Instruments, USA). Data were retained based on concordance between the measurements of different types of replicates: biological replicates, technical replicates and combined biological and technical replicates.

Microarray data analysis

Microarray raw data were analyzed using Genespring GX 7.0 (Agilent technologies). Data were normalized using Lowess normalization and per chip per median normalization. Normalized data were compared using ANOVA followed by tukey or student t-test. Microarray data are available in the GEO database under the accession number GSE9042.

Results

Metabolic parameters

Enzyme activities

No change in the activity of the citrate synthase or of the first 3 complexes of the respiratory chain was evidenced (table 2). Activity of Cox was increased in calorie restricted and fasted animals.

Mitochondrial respiration

Table 1 and 2 show various mitochondrial respiration parameters. Oxygen consumption was significantly reduced by fasting with substrates of the first complex (glutamate and/or pyruvate) when respiration was stimulated with ADP (state 3) or with FCCP. No such effect was observed with respirations that involved substrates of the second complex (palmitate or glutamate plus succinate) or substrates of the fourth complex (TMPD). No changes in state 4 (oligomycin) respirations were observed in either fasted or calorie restricted animals. In consequence, respiratory control ratios (RCR) were reduced with pyruvate in fasted and calorie restricted animals, but not with any other substrate.

“Q” the thermogenic parameter was reduced in fasted rats (0.83 ± 0.04) in comparison with control animals (0.89 ± 0.02 , $P=$). Membrane potentials were unaffected by calorie restriction or fasting.

Gene expression

ETC complexes

All of the enzymatic complexes involved in this reaction were affected by either fasting or caloric restriction or both (Table 3 and 4).

Only ETC complex 3 (etft and etfdh) and surf1 were increased by both fasting and caloric restriction. Fasting but not restriction induced overexpression of complex 1 of ETC and of the adenine nucleotide translocator (ANT). On the other hand, caloric restriction affected

ETC and ATPase related gene expression in numerous ways. CR resulted in the overexpression of ETC complex 4 (cox6a1) and ATPase (Atp5e and Atp5o) and underexpression of genes related to oxidative phosphorylation especially concerning Etc complex 2 (Sdha and Sdhc) and complex 3 (Cyb5r3 and Uqcrc1). Caloric restriction also induced an underexpression of ANT.

Reactive oxygen Species

Caloric restriction but not fasting induced overexpression in genes encoding for protein involved in ROS scavenging (gsto1, Nfe2l2, UCP2). Gene encoding for Aconitase 2 was overexpressed in fasted rats compared to control rats.

Fat metabolism

Many of the genes encoding enzymes used in β -oxidation of fatty acid were upregulated in fasted and restricted rat (cf. table 2). Among all these 10 genes only 3 were upregulated in both of the nutritional status (Cpt1, Dci and Ech1). All the remaining genes were only overexpressed in fasted rats compared to control and not in restricted rats (Acadl, Acadvl, Cpt2, Crat, Hdha, Hdhb and Slc25a20).

Genes encoding enzymes involved in fat synthesis were underexpressed (cf. table 1). Among these genes, 4 are underexpressed in fasted and restricted rats compared to control rats (Acly, Fasn, Scd1, and Slc25a1), one gene is down-regulated in fasted rats only (Prkab1) and one is down-regulated in restricted rats only (Mlycd).

One gene involved in the lipid transport were overexpressed in restricted rat only (Fabp3).

Urea cycle

Our results shows that two genes involved in the urea cycle are overexpressed in fasted rat compared to control rats (Asl and Got1). On the contrary, one gene involved in encoding a urea cycle enzyme (got 2) is underexpressed in restricted rat compared to control rats.

Three genes involved in this pathway were overexpressed in fasted rats compared to restricted rats (Got1, cps1 and Ass; cf. table 3).

Glucose metabolism

Genes involved in encoding enzymes of the glycolysis were underexpressed in fasted and restricted rats compared to control rats. One gene is underexpressed in both groups (pklr) and 1 gene is underexpressed in restricted rat only (Pgam1). One gene was overexpressed in fasted rat compared to restricted rats (Hk3).

Genes encoding enzymes from gluconeogenesis were also affected. One gene was underexpressed in fasted rats compared to controls (G6pc), and another gene from this pathway was underexpressed in fasted rats compared to restricted rats (Pdhb).

Eventually, 1 gene involved in encoding enzyme of the Krebs cycle was underexpressed in both fasted and restricted rat groups (Mdh1).

Transcription factor and hormonal regulation

Igf1 was underexpressed in fasted compared to control rats while Igfbp1 was overexpressed in fasted rats. Igfals was underexpressed in both fasted and restricted rats.

Many genes involved in hormonal signalization were also affected by either fasting or caloric restriction. Fasting but not restriction induced underexpression in Thrb and Rarg encoding genes. On the other hand, caloric restriction but not fasting induced underexpression of Adipor2 and overexpression of Lepr.

Finally, other genes involved in intracellular signalization were affected. Fasting resulted in underexpression of Cam2g, Nos and Il10ra whereas caloric restriction induced underexpression Nr1h3. Fasting induced an overexpression of serpinf2 (cf. table 3 and 4). We also noted that Rara expression was diminished in fasted rats compared to restricted rats (table 5).

Discussion

In the present study, we investigated the effects of CR and fasting on energy metabolism using an approach on both gene expression profile and biochemical assessment of oxidative phosphorylation activity. Oxidative phosphorylation is the major ROS producing process in the eukaryotic cell (22). It has already been suggested that a decrease of the ETC activity would result in a decrease in ROS production which may result in a decrease in damage done to lipid, protein and DNA and thus explain the “anti-ageing” effects of CR and fasting.

The results presented in this study do not reproduce those previously found by others. However, in our previous study (8), we stated that short-term caloric restriction (STCR) resulted in a decrease of both state 3 and state 4 respiration demonstrating that STCR induces the same effects on oxidative phosphorylation than long-term caloric restriction (LTCR) (2, 7, 9, 11 and 16). These results were obtained on rats restricted 50% of the control rats' food intake. In the present study, we used milder caloric (25% and 50% CR). This may explain why no significant differences in oxidative phosphorylation activity were observed. Nevertheless, CR tends to decrease, and not increase, ETC activity in rat liver and thus, we can hypothesize that the ROS generation will be lower in CR rats compared to control rats.

The gene expression profile corresponding to oxidative phosphorylation was markedly affected. CR induced a decrease in the expression of most of the RNA coding for proteins involved in the oxidative phosphorylation reaction. It is well known that the ETC activity is mainly driven by complex IV, CR increasing COX content. The upregulation of this ETC complex is likely to increase the capacity and efficiency of electron transport. Such a mechanism has already been shown in skeletal muscle where many COX subunit are overexpressed during caloric restriction (26). An increase in COX content could result in a modification of H^+/e^- stoichiometry (14). This decrease in COX slippage is likely to increase the ETC efficiency and thus less substrate oxidation is required to achieve the same membrane potential. This is in agreement with the fact that no differences in membrane potential level between CR rats and control rats, and no differences in ETC activity. The increase in COX efficiency by reducing its slippage allows the ETC to decrease its activity without impairing its efficiency to generate a membrane potential (i.e. more proton will be pumped out the membrane for a given oxygen consumption). In addition to this, the decrease in ANT content induced by CR is likely to decrease mitochondrial proton leak (3) and thus to

increase the efficiency of ETC to generate and maintain the mitochondrial membrane potential. We can also point out that surfeit 1 (surf1), a protein involved in complex IV assembly was overexpressed by CR. Although little is known about surf1, a defect in surf1 may result in COX disassembly and thus a decrease in COX activity in fibroblasts from patient lacking surf1 (21). Therefore, if a lack of surf1 decreases COX capacities we might hypothesize that an increase of surf1 content may have a beneficial effect on COX activity.

It is known that mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by ADP concentrations. The rate of ATP synthesis is determined by cellular energy needs expressed as [ATP]/[ADP] ratio (20). CR decreases ANT content which results in a decrease of the ATP turnover in the cell and thus a diminution of the whole oxidative phosphorylation rate (15). CR is also associated with an underexpression of ATP synthase beta subunits. This down regulation of both of the main enzymes of the “phosphorylation complex” will induce a decrease in the whole oxidative phosphorylation activity, without diminution in the ATP production efficiency.

Few genes involved in ROS scavenging were found to be affected by CR. The theory of aging and the benefit of CR on life-span are based upon a lower ROS production during RC and a better scavenging of ROS (13). Our results are in agreement with this theory as genes coding for proteins involved in ROS scavenging are increased by CR in rat liver. Taken together, these results show that CR promotes an efficient activity of ETC probably to decrease ROS production while maintaining the capacity to synthesize ATP. These results also confirm that CR increases ROS scavenging capacity in rat liver.

Fasting differs from CR on the expression of genes related to oxidative phosphorylation complexes. We did not find any decreases in ETC complex genes in fasted rats but on the contrary we found that complex I, surf1 and ANT were overexpressed in fasted rats. This agrees with previous results showing the increased ANT content in fasted rats (28). Furthermore, respiration with substrates from the first complex, but not with substrates from other complexes of the ETC was reduced. The discrepancy between respiration with glutamate and pyruvate (both substrates of complex I) points at a decreased activity upstream complex I, may be at PDH level as previously shown to happen during fasting (29). During fasting, large amounts of ATP are required for pathways such as gluconeogenesis and proteolysis. This suggests that fasting is an emergency situation where energy supply is maximized through the ADP/ATP translocator overexpression which brings ADP in the mitochondria and exports ATP, without obvious alterations in respiration capacity. This upgrades the cell ATP turnover, and accelerates the oxidative phosphorylation rate (15).

Moreover, the reduced value of the thermogenic parameter Q suggests that ETC is less efficient and everything has to be done to improve ATP yield.

The gene expression profile of other metabolic functions linked to energy homeostasis is also modified. During CR and fasting, the body breaks down fat to supply substrates to the oxidative phosphorylation. Our results confirm (1, 19) that fatty acid beta oxidation related genes are largely overexpressed in both CR and fasting. However, this pathway is much more upregulated by fasting as already notice in mice (1). Almost all the genes implied in this metabolic pathway are increased by fasting whereas only half of them are increased by CR. This may fuel the ETC with more substrates at the second complex.

Another difference between CR and fasting effects on gene expression is related to ROS scavenging. During fasting, there is neither improvement of ROS scavenging nor reduction of ROS production by the ETC. Moreover, Aconitase is overexpressed in fasted rats. This enzyme is very sensitive to ROS induced cellular damage. An overexpression of this protein probably indicates that ROS production in fasted rats causes several cellular damages.

Taken together, these results highlight a completely different profile between fasting and caloric restriction with regards to the oxidative phosphorylation components and to the ATP production profile. Caloric restriction is a situation where the ETC aims at synthesizing ATP in the most efficient way, with as little ROS production as possible, whereas fasting is a situation where the ETC aims at synthesizing the maximal amount of ATP without regards to the consequences of the increase ROS production.

In conclusion, this study suggests that caloric restriction is a fully adapted nutritional situation where mitochondria use wisely the fatty acid oxidation in order to provide substrates to the oxidative phosphorylation without producing too much ROS, in order to match cellular energetic needs. As suggested by others, CR promotes a “safe” usage of substrates availability leading to a decrease in ROS production coupled with an increase in ROS scavenging process. These results support the “anti-ageing” effects of CR because the oxidative process is reduced by CR and more efficient than in control rats. To our knowledge, it is the first time that effects of CR on the whole oxidative phosphorylation gene expression profiles are reported. This study also establishes a new concept of fasting effects on the components of oxidative phosphorylation. Fasting appears to be an emergency situation where mitochondria aim at producing the more energy as possible without adapting its metabolism in order to optimize this process. This is achieved by increasing the substrate availability by a massive upregulation of fatty acid beta oxidation. The clinical consequences of fasting may be

deleterious, in the case of an added stress (infection, trauma...) because of the negative effects of increased ROS production on the immune system.

Acknowledgements

Authors thank Pierre Legras, Jérôme Roux and Dominique Gilbert for animal care, Marie-Jo Bellanger and Florent Favreau for technical assistance.

References

- 1. Bauer M, Hamm AC, Boaus M, Jacob A, Jaekel J, Schorle H, Pankratz MJ, Katzenberg JD.** Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span prolonging processes. *Physiol genomics*. 17 **2004** 230-244.
- 2. Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME.** Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289(3) **2005** E429-38.
- 3. Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ.** The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J*. 1;392(Pt 2) **2005** 353-62.
- 4. Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR.** Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.98(19) **2001** 10630-5.
- 5. Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Rowley BC, Cao SX, Walford RL, Spindler SR.** Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzymes genes. *Mechanisms of ageing and development*. 122 **2001** 1033-1048.
- 6. Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1) **2002** 47-95.
- 7. Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P.** Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br. J. Nutr*. 90 **2003** 969-77.
- 8. Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P.** Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1670(2) **2004** 126-31.
- 9. Ferreira J, Gil L.** Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics. Alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Biochem J*. 218(1) **1984** 61-7.
- 10. Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B.** The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med*. 53(3) **2007** 207-13.
- 11. Gold AJ, Costello LC.** Effects of semistarvation on rat liver, kidney, and heart mitochondrial function. *J Nutr*. 105(2) **1975** 208-14.
- 12. Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R.** Krebs cycle enzyme from livers of mice are differentially regulated by caloric restriction. *Experimental gerontology*. 39 **2004** 1145-1154.

- 13. Harman D.** Extending functional life span. *Exp Gerontol.* 33(1-2) **1998** 95-112.
- 14. Kadenbach B, Huttemann M, Arnold S, Lee I, Bender E.** Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4) **2000** 211-21.
- 15. Kholodenko BN.** Control of mitochondrial oxidative phosphorylation, *J Theor Biol.* 107(2) **1984** 179-88.
- 16. Lambert AJ, Merry BJ.** Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(1) **2004** R71-9.
- 17. Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA.** Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(13) **1982** 4239-41.
- 18. Masoro EJ.** Antiaging action of caloric restriction: endocrine and metabolic aspects. *Obes Res.* 3 Suppl 2 **2002** 241s-247s.
- 19. Masternak MM, Al-Regaiey KA, Del Rosario Lim MM, Jimenez-Ortega V, Panici JA, Bonkowski MS, Bartke A.** Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. *Exp Gerontol.* 40(8-9) **2005** 679-84.
- 20. Navarro A, Boveris A.** The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(2) **2007** C670-86.
- 21. Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J.** Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res.* 53(1) **2004** S213-23.
- 22. Sohal RS, Weindruch R.** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273(5271) **1996** 59-63.
- 23. Sorensen M, Sanz A, Gomez J, Pamplona R, Portero-Otin M, Gredilla R, Barja G.** Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic Res.* 40(4) **2006** 339-47.
- 24. Spindler SR.** Use of microarray biomarkers to identify longevity therapeutics. *Aging Cell.* 5(1) **2006** 39-50.
- 25. Spindler SR, Dhahbi JM.** Conserved and Tissue-Specific Genic and Physiologic Responses to Caloric Restriction and Altered IGF1 Signaling in Mitotic and Postmitotic Tissues. *Annu Rev Nutr.* 27 **2007** 193-217.

- 26. Sreekumar R, Unnikrishan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R, Sreekumaran nair K.** Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am j Physiol.* 283 **2002** E38-E43.
- 27. Valle A, Guevara R, Garcia-Palmer FJ, Roca P, Oliver Oliver J.** GENDER DIMORPHISM IN LIVER MITOCHONDRIAL OXIDATIVE CAPACITY IS CONSERVED UNDER CALORIC RESTRICTION CONDITIONS. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2007**.
- 28. Wojtczak L, Wieckowski MR.** The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 31(5) **1999** 447-55. Review.
- 29. Zhou YP, Priestman DA, Randle PJ, Grill VE.** Fasting and decreased B cell sensitivity: important role for fatty acid-induced inhibition of PDH activity. *Am J Physiol.* **1996** 270(6 Pt 1):E988-94.

Figure Legend

Table 1 shows the ETC enzymatic activities for control, CR and fasted rats. a significantly different from controls, b significantly different from calorie restricted.

Table 2 shows the State 3 respirations (nmolesO/min/mg proteins) for control, CR and fasted rats. a significantly different from controls, b significantly different from calorie restricted.

Table 3 shows the State 4 respirations (nmolesO/min/mg proteins) for control, CR and fasted rats. a significantly different from controls, b significantly different from calorie restricted.

Table 4 shows the RCR for control, CR and fasted rats. a significantly different from controls, b significantly different from calorie restricted.

Table 5 shows the uncoupled respirations (nmolesO/min/mg proteins) for control, CR and fasted rats. a significantly different from controls, b significantly different from calorie restricted

Table 6 shows the underexpressed genes in fasted (“F” square blackened) or/and Dexamethasone (“D” square blackened) rats compared to control rats ($p < 0.05$).

Table 7 shows the overexpressed genes in fasted (“F” square blackened) or/and dexamethasone (“D” square blackened) rats compared to control rats ($p < 0.05$).

Figures

Table 1

	Controls	Calorie restricted	Fasted
Citrate synthase	362±71	355±40	314±30
Complex I	86±45	87±55	99±61
Complex II	693±75	691±113	673±89
Complex III	915±294	941±261	994±491
Cox	2105±301	2676±329 ^a	2657±432 ^a

Table 2

	Controls	Calorie restricted	Fasted
State 3 pyruvate	40.9±12.6	32.5±6.3	24.9±2.5 ^a
State 3 glutamate	56.5±12.1	52.4±8.4	39.6±2.7 ^{a, b}
State 3 palmitate	68.6±18.1	62.5±10.7	55.2±13.7
State 3 glutamate + succinate	119.5±28.2	111.3±18.0	78.2±23.9
State 3 TMPD	117.4±31.3	116.6±16.7	95.4±12.0

Table 3

	Controls	Calorie restricted	Fasted
State 4 pyruvate	9.5±1.6	11.4±3.1	8.8±1.2
State 4 glutamate	12.7±3.4	10.3±3.0	9.5±1.1
State 4 palmitate	14.6±4.6	13.2±3.4	13.6±2.5 ^b
State 4 glutamate + succinate	19.9±8.6	16.0±7.8	11.1±3.9
State 4 TMPD	101.6±44.9	90.7±18.3	74.7±6.1

Table 4

	Controls	Calorie restricted	Fasted
RCR pyruvate	4.3±1.1	3.0±0.8 ^a	2.9±0.4 ^a
RCR glutamate	4.5±0.8	5.4±1.4	4.2±0.5
RCR palmitate	4.8±0.7	5.0±1.6	4.1±1.0
RCR glutamate + succinate	6.5±1.7	8.2±3.3	7.4±2.1
RCR TMPD	1.2±0.2	1.3±0.1	1.3±0.3

Table 5

	Controls	Calorie restricted	Fasted
FCCP pyruvate	46.4±9.0	40.0±10.1	28.0±3.4 ^{a, b}
FCCP palmitate	103.7±37.0	97.5±29.5	92.6±23.7

Table 6

Function	Symbol	name	F	R
<i>Glycolysis</i>	Pk1r	Pyruvate kinase		
	PGAM1	phosphoglycerate Mutase		
	GckR	glucokinase regulator		
<i>Fatty acid biosynthesis</i>	Prkab1	protein kinase, AMP-activated		
	Acly	ATP citrate lyase		
	Fasn	Fatty acid synthase		
	Scd1	Stearoyl-coA desaturase 1		
	SLC25A1	Citrate transporter		
	Mlycd	malonyl-coA decarboxylase		
<i>Krebs cycle</i>	Mdh1	Malate dehydrogenase 1		
<i>Oxidative phosphorylation</i>	ATP5b	ATP synthase F1 complex		
	cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3		
	SdhA	succinate ubiquinone reductase		
	SdhC	succinate dehydrogenase subunit C		
	SLC25A5	Adenine nucleotide translocator		
	Uqcrc1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1		
<i>Gluconeogenesis</i>	G6PC	Glucose 6 phosphatase		
<i>Cycle de l'urée</i>	GOT2	glutamate oxaloacetate transaminase 2		
<i>Ketone body synthesis</i>	HMGCS2	3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A synthase 2		
<i>Signalisation/transcription factor</i>	Srebf1	sterol regulatory element binding factor 1		

Table 7

Function	Symbol	name	F	R
<i>Urea Cycle</i>	Got1	glutamate oxaloacetate transaminase		
	Asl	Argininosuccinate lyase		
<i>Beta oxidation of fatty acid</i>	Acadl	acetyl-coenzyme A dehydrogenase long-chain		
	Acadvl	acetyl-coenzyme A dehydrogenase very long-chain		
	Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2		
	Crat	Carnitine acetyl transferase		
	Hdha	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase alpha subunit		
	Hdhb	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase beta subunit		
	Slc25a20	carnitine/acylcarnitine translocase		
	Cpt1	Carnitine palmitoyltransferase 1		
	Dci	dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase		
Ech1	enoyl coenzyme A hydratase 1			
<i>Oxidative phosphorylation</i>	Ndufs3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3		
	SLC25a3	Adenine nucleotide translocator		
	Surfeit 1	succinate ubiquinone reductase		
	etfb	electron-transfer flavoprotein beta		
	Etfdh	electron transfer flavoprotein dehydrogenase		
	Atp5e	ATP synthase F1 complex epsilon subunit		
	Atp5o	ATP synthase F1 complex omega subunit		
	Cox6a1	cytochrome c oxidase, subunit Via polypeptide 1		
<i>Ketone body synthesis</i>	Hmgcl	3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A lyase		
<i>Reactive oxygen Species</i>	Aco2	Aconitase 2		
	Gsto1	gluthatione S-transferase omega 1		
	Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2 like 2		
	UCP	uncoupling protein		
<i>Lipid transport</i>	Fabp3	Fatty acid binding protein 3		
<i>Protein synthesis</i>	Mrpl34	mitochondrial ribosomal protein L34		
	RPS24	ribosomal protein S24		

Discussion et perspectives

Cette étude avait pour but d'étudier différents paramètres liés au métabolisme énergétique mitochondrial lors de la restriction calorique ou de jeun total sur une période de 3 jours. La première question que nous nous posions était de savoir si les modifications du métabolisme énergétique bien connus lors de restriction calorique à moyen et long terme se mettaient en place lors de restriction calorique à court terme. Les études précédentes réalisées au sein du laboratoire avaient déjà apporté en partie une réponse à cette question (Dumas 2003). En effet, cette étude montrait que dès 3 jours de restriction calorique, la consommation d'oxygène mitochondriale était diminuée à l'état 3 et à l'état 4 de la respiration. Dans cette étude, nous n'avons pas constaté de tels effets, cela est probablement expliqué par le fait que la première étude fut réalisée sur des rats restreints à 40% de la quantité de nourriture des rats témoins alors que la présente étude a utilisé un pool de rat restreints de 25 et 50% de la quantité de nourriture des témoins.

L'apport majeur de cette étude réside dans la mise en évidence de régulation du métabolisme lors de la restriction calorique au niveau de l'expression des gènes. Les rats restreints en calorie pendant 3 jours montrent en effet des signes d'adaptation métabolique à la diminution en disponibilité des substrats. Ainsi, les lipides semblent être la source privilégiée de substrats pour la chaîne respiratoire comme en témoigne la stimulation de la beta oxydation. L'autre point essentiel réside dans l'étude complète qu'elle apporte de l'expression des différents complexes de la chaîne respiratoire. C'est en effet la première fois à notre connaissance qu'une étude « cartographie » le transcriptome relatif à la chaîne respiratoire de cette façon chez des rats restreints et à jeun. Cette étude montre bien que les régulations de la chaîne respiratoire permettent d'augmenter l'efficacité de celle-ci en agissant de manière sélective sur chacun des complexes de la chaîne. Ainsi, les modifications d'expression de certains complexes liés aux modifications de stœchiométrie sur d'autres complexes permettent de maintenir la synthèse d'ATP chez le rat restreint tout en optimisant l'utilisation des substrats disponibles. Il a en effet été montré que la quantité de protéine constituant la COX influençait sa stœchiométrie et par conséquent influençait le slipping au niveau de ce complexe (Piquet 2004, Papa 1991). Ainsi, une diminution d'expression de la COX, comme celle constatée chez le rat restreint, est susceptible de diminuer le slipping au niveau de ce complexe chez ses rats et par conséquent induit une augmentation d'efficacité de la réaction de phosphorylation oxydative.

D'autre part, ces résultats permettent également de comprendre comment la restriction calorique peut diminuer la production mitochondriale de ROS. En effet, la base de la théorie mitochondriale du vieillissement s'appuie sur le fait que les ROS produites par la chaîne respiratoire lors de son fonctionnement vont endommager les composants de la cellule. Or la RC permettrait de minimiser ces effets en diminuant l'activité oxydative de la chaîne respiratoire (Gilca 2007 pour revue, Sohall 1996, Droge 2002, Masoro 1995). Nos résultats vont également dans ce sens car la meilleure efficacité de la chaîne respiratoire va probablement se traduire par une diminution de la production mitochondriale de ROS chez le rat restreint. De plus, il apparaît dans notre étude que le système de détoxification des ROS est également stimulé par la RC ce qui augmenterait le pouvoir « antivieillessement » de la restriction en calorie.

Il est cependant nécessaire de noter que certaines études montrent que ce n'est pas la restriction calorique dans sa globalité qui serait à l'origine des bénéfices de cette intervention nutritionnelle mais seulement la restriction en protéines ou en lipides (Sanz 2006). Ces études montrent clairement que des restrictions caloriques de fortes ou de faibles intensités (8,25-50%) mais également une restriction en carbohydrate uniquement ne permet pas de reproduire les effets constatés sur la production de ROS (Sanz 2006, Sanz 2006b, Gomez 2007, Naudi 2007). Ces études mettent en évidence le fait que les mécanismes expliquant les effets bénéfiques de la RC restent méconnus. Néanmoins, ces études montrent également que le point clé des effets de la RC se situe dans la diminution de la production de ROS qui s'explique au vu de nos résultats par une optimisation du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces observations peuvent également être rapprochées de résultats observés chez des rats soumis à un régime riche en graisse. Ce type de régime induit une augmentation du stress oxydatif dans le foie de rat (Milagro 2006). Il est intéressant de constater que le régime « inverse » de la restriction calorique, ou du moins de la restriction lipidique, entraîne les effets inverses à savoir, que l'excès de lipide entraîne une surproduction de ROS et une augmentation des dommages dus aux ROS (Milagro 2006). Quoiqu'il en soit, il apparaît évident aux vues de nos données et de ceux des autres que l'activité et l'efficacité de la chaîne respiratoire et de l'apport en substrat joue un rôle fondamental dans les effets Anti-vieillessement de la restriction calorique.

L'autre point clé de cet étude réside dans la mise en évidence, pour la première fois à notre connaissance, des différences entre les effets sur le métabolisme chez les rats soumis à un jeun total comparé aux rats restreints. Notre étude met en évidence trois points divergents dans la réponse à ces deux états nutritionnels. Premièrement, il apparaît que la beta oxydation

des acides gras est beaucoup plus stimulée chez les rats à jeun que chez les rats restreints. Deuxièmement, contrairement à la restriction calorique, en cas de jeun, il n'y a pas de sous expression de complexes de la chaîne respiratoire. Enfin, on constate qu'il n'y a aucune adaptation du système de détoxification de ROS chez le rat à jeun, de plus, nos résultats montrent que les dommages causés par les ROS doivent être plus élevés chez le rat à jeun comme le suggère l'augmentation d'expression de l'aconitase (Melov 1999). D'autre part, nos résultats concordent avec ceux d'une précédente étude qui avaient montré que le jeun induisait une production de ROS au niveau du complexe III causé par une augmentation du patinage au niveau de ce complexe (Sorensen 2006). Ce constat s'explique probablement par l'augmentation de l'expression de ce complexe de la chaîne que nous avons constaté et qui est susceptible, comme pour la COX, d'induire une augmentation du patinage. Ainsi, nos résultats montrent que le profil métabolique chez le rat à jeun est différent de celui du rat restreint. Le métabolisme énergétique chez le rat à jeun semble plus tourné vers une maximisation de la synthèse d'ATP en utilisant les substrats issus de la beta oxydation et ce, sans chercher à se défendre contre les éventuels effets néfastes d'une suractivité de la phosphorylation oxydative.

En conclusion, cette étude permet de montrer deux adaptations métaboliques différentes à un même stress énergétique, la diminution d'apports en substrats pour la chaîne respiratoire causé par une diminution des apports nutritionnels. D'un côté, la restriction calorique est une situation métabolique où tout le métabolisme énergétique est adapté à la diminution des apports nutritionnels. Dans cette situation, la chaîne respiratoire adapte son fonctionnement pour utiliser de façon optimale les substrats fournis majoritairement par l'oxydation des acides gras. Ce fonctionnement optimal de la chaîne à des conséquences bénéfiques sur la production de ROS et cela expliquerait pourquoi la restriction calorique augmente l'espérance de vie chez le rongeur. D'autre part, la situation de jeun se caractérise par une stimulation du métabolisme énergétique probablement dans le but de maximiser la synthèse d'ATP. Cependant, la modification de l'orientation du métabolisme énergétique chez le rat à jeun ne semble pas s'accompagner de modification dans le but d'optimiser le processus de synthèse d'ATP. L'augmentation d'activité de la chaîne qui résulte de la nécessité de produire beaucoup d'ATP doit également augmenter la production de ROS mitochondriale montrant que le jeun possède des effets délétères sur la cellule comme certains auteurs l'avaient suggérés (Sorensen 2006).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour but d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans les adaptations métaboliques précédemment mis en évidence dans nos différents modèles animaux. Les précédentes études au sein de notre laboratoire avaient permis d'établir l'existence d'adaptations métaboliques au niveau du foie et au niveau du muscle chez le rats restreint en calorie et chez le rat traité par dexaméthasone (Dumas 2003, Dumas 2003b, Johnson 2006). Cependant, ces études n'avaient pas apportées de réponses concernant les mécanismes précis expliquant notamment l'augmentation de la fuite de protons mitochondriale hépatiques chez le rat traité par dexaméthasone.

L'autre objectif de cette thèse était de mettre au point un outil d'étude du transcriptome dédié au métabolisme et de l'utiliser pour affiner encore davantage nos connaissances de nos modèles. C'est dans cette optique que nous avons développé la puce à ADN Mitoligo. Cette puce à ADN permet par son design et par le choix des gènes d'étudier l'expression de tous les ARN codant pour des protéines de la chaîne respiratoire mais également de tous les gènes codant pour des enzymes liés à toutes les fonctions du métabolisme périphérique à la chaîne respiratoire.

Chez le rat traité par dexaméthasone, notre première étude a montré que la fuite de protons mise en évidence précédemment était explicable par une augmentation de la quantité d'ANT. Cette même étude a permis de montrer que cette augmentation de la quantité d'ANT faisait parti d'un ensemble d'adaptation de la phosphorylation oxydative permettant de maximiser la synthèse d'ATP chez ces rats. La Mitoligo a permis de mettre en évidence que chez les rats traités par dexaméthasone tout le métabolisme est réorienté de manière à favoriser le rendement de la phosphorylation oxydative. Ainsi, en plus des protéines composant la chaîne respiratoire, de nombreuses enzymes liées des voies métaboliques responsables de l'apport en substrats pour la chaîne respiratoire sont également stimulées. Enfin, notre dernière étude nous a permis d'étudier une autre facette des mécanismes mis en jeu chez le rat traité par dexaméthasone en s'intéressant au rôle de l'ANT et de l'ATP synthase dans l'augmentation du rendement de la phosphorylation oxydative. Cependant cette dernière étude soulève dans ce modèle la question du rôle des hormones thyroïdiennes et montre ainsi une des limites actuelles de notre connaissance du modèle. En effet, les dosages sériques et la Mitoligo ont mis en évidence de nombreuses perturbations dans la signalisation hormonale chez le rat traité par dexaméthasone. Ces interrogations sur le rôle des hormones

thyroïdiennes, de la leptine ou d'autres hormones que nous n'avons pas étudié à ce jour, représente les futures investigations à mener pour compléter notre connaissance de ce modèle d'hypermétabolisme.

De nombreux points restent à éclaircir sur les mécanismes orchestrant l'adaptation du métabolisme dans le foie lors du traitement par dexaméthasone. En effet, si la stimulation de la synthèse d'ATP sans altération de l'efficacité de la réaction ne fait plus de doute, il convient maintenant de comprendre comment cette stimulation se met en place. Tout d'abord il est nécessaire de comprendre le rôle que jouent les divers facteurs de transcription qui semblent impliqués dans ce modèle à commencer par l'AMPK. Des travaux sont d'ailleurs en cours au laboratoire pour déterminer le rôle de ce facteur de transcription dans l'adaptation métabolique au régime riche en lipide (travaux de thèse de Melissa Flamment). Ces travaux vont probablement nous en apprendre beaucoup sur le fonctionnement de ce facteur de transcription et cela nous permettra probablement de terminer son rôle dans notre modèle notamment pour expliquer la réorientation du métabolisme en amont de la chaîne respiratoire. D'autre part, nous n'avons pas déterminé les variations des différentes hormones digestives en dehors de la leptine. Comme nous l'avons vu en introduction, ces hormones jouent un rôle clé dans la régulation des apports alimentaires, or le rat traité par dexaméthasone présente une anorexie assez marquée (-12% sur 5 jours) le taux circulant de l'ensemble ces hormones est probablement modifié. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle de chacune des ces hormones pour affiner un peu plus notre connaissance de ce modèle animal.

Les études menées au sein du laboratoire sur le rat en restriction calorique montrent clairement que les adaptations métaboliques que l'on constate lors de restriction d'intensité modérée (40%) et à moyen ou long terme sont déjà présentes dans le foie et dans le muscle lors de restriction de même intensité mais à courts terme (Dumas et al. 2003, Johnson et al. 2006). L'utilisation de la Mitoligo lors de notre étude a également permis d'aller plus loin dans la compréhension de ces adaptations et notamment en montrant que dès 3 jours de restriction, l'expression des gènes liés au métabolisme énergétique montre déjà des signes d'adaptations. La Mitoligo a également permis d'établir, pour la première fois à notre connaissance, une « cartographie » de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire lors de la restriction calorique et du jeun. Enfin, notre étude a permis de montrer que la restriction calorique par son action sur la chaîne respiratoire et sur le système de détoxification des ROS possédait probablement des propriétés anti-âge. Cependant, cette étude n'a pas permis de comprendre quels étaient les mécanismes responsables de la mise en place de ces

adaptations. De précédents travaux au sein du laboratoire avaient suggérés que la leptine pourrait par son action être à l'origine de ces adaptations. Cependant, comme pour le rat traité par dexaméthasone, nous n'avons pas établi le profil hormonal de rats restreints en nous intéressant aux hormones digestives. Or ce champ de recherche en pleine expansion pourrait nous apporter des réponses sur l'activation de certaines voies métaboliques par l'une ou l'autre de ces hormones comme nous l'avons vu en introduction.

L'autre point que cette étude sur la restriction calorique a permis de mettre en évidence réside dans la différence qui est montrée entre les rats à jeun et les rats restreints. Le jeun, que l'on aurait pu considérer comme une restriction poussée à l'extrême s'avère en fait être une situation métabolique à part et totalement distincte de la restriction. Ici, il n'est plus question d'optimisation de la phosphorylation oxydative comme dans le cas de la restriction. Le jeun apparaît comme une situation d'urgence métabolique où l'important est la synthèse d'ATP à partir des substrats disponibles.

La situation de jeun peut être rapprochée de ce que l'on constate chez le rat traité par dexaméthasone. Ce sont en effet deux situations d'urgence où l'essentiel du métabolisme est orienté autour d'un seul objectif : produire le maximum d'ATP. À l'inverse la restriction calorique est un bon exemple d'une situation métabolique où la synthèse d'ATP n'est pas maximisée mais optimisée de manière à utiliser du mieux possible les substrats disponibles. Contrairement à ce que nous pensions avant de réaliser ces travaux, l'augmentation du rendement de la production de l'ATP ne se fait pas au détriment du rendement chimique de la réaction. Par contre, il est évident que cette augmentation du rendement n'est pas sans conséquence. Nos données suggèrent en effet que la chaîne respiratoire générerait plus de ROS lorsqu'elle fonctionne à ce rendement, dans le cas du jeun et dans le cas du traitement par dexaméthasone, dans le foie de rat. La RC quant à elle semble être une situation favorable du point de vue de la production de ROS et ce constat explique probablement ses effets bénéfiques sur la durée de vie chez le rongeur. Cette opposition nette que montre nos différents entre ces deux situations métaboliques à part constitue également une perspective envisageable à nos travaux. Il serait intéressant de mettre en parallèle le rendement de la phosphorylation oxydative avec les éventuels dommages causés par les ROS sur des durées de traitement plus longues que celles que nous utilisons.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de développer un nouvel outil, la Mitoligo, et d'apporter au groupe nutrition du laboratoire une nouvelle méthodologie pour compléter les techniques déjà existantes. Ce travail a permis à partir de cet outil d'approfondir la

caractérisation de nos différents modèles animaux de stress énergétique, le rat traité par dexaméthasone et le rat restreint ou à jeun. Nous sommes maintenant capables d'expliquer dans quelles conditions de rendement et d'efficacité l'ATP est synthétisé par la mitochondrie dans ces modèles. Cependant, ce travail pose de nombreuses questions sur la mise en place des adaptations constatées dans ces modèles. Ce sont toutes ces questions auxquelles nos futurs travaux sur ces modèles devront apporter une réponse.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams SH, Lei C, Jodka CM, Nikoulina SE, Hoyt JA, Gedulin B, Mack CM, Kendall ES. PYY[3-36] administration decreases the respiratory quotient and reduces adiposity in diet-induced obese mice. *J Nutr.* 136(1) **2006** 195-201.

Agius L, Chowdhury MH, Alberti KG. Regulation of ketogenesis, gluconeogenesis and the mitochondrial redox state by dexamethasone in hepatocyte monolayer cultures.

Biochem J. 239(3) **1986** 593-601.

Ainscow EK, Brand MD. Internal regulation of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* **1999** Dec;266(3):737-49.

Arias G, Asins G, Hegardt FG, Serra D. The effect of dexamethasone treatment on the expression of the regulatory genes of ketogenesis in intestine and liver of suckling rats. *Mol Cell Biochem.* 178(1-2) **1998** 325-33.

Armstrong NJ, Van de Wiel MA. Microarray data analysis: From hypothesis to conclusions using gene expression data. *Cellular Oncology.* 26 **2004** 279-290

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault B, Manning S, Miroux E, Couplan MC, Alves-Guerra C, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S and Riquier D. Disruption of the uncoupling protein 2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat genet;* 26(4) **2000** 435-439.

Astrup A. Dietary approaches to reducing body weight. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 13(1) **1999** 109-20.

Azzone GF, Zoratti M, Petronilli V, Pietrobon D. The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J Inorg Biochem.* 23(3-4) **1985** 349-56.

B

Babcock GT, Wikstrom M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* 356(6367) **1992** 301-9.

Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology.* 127(2) **2004** 546-58.

Barazonni R, Zanneti M, Bosutti A, Biolo G, Vitali-serdoz L, Stebel M, Guarnieri G. Moderate caloric restriction, but not physiological hyperléptinémie *per se*, enhance mitochondrial oxidative capacity in rat liver and skeletal muscle-tissue specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology*. 164(4) **2005** 2098-2106.

Barazonni R, Bossuti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanneti M, Guarnieri G. Ghrelin regulates mitochondrial lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am j Physiol*. 288 **2005** E228-E235.

Barbe P, Larrouy D, Boulanger C, Chevillotte E, Viguerie N, Thalamas C, Oliva Trastoy M, Roques M, Vidal H, Langin D. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J*. 15(1) **2000** 13-15.

Bauer M, Hamm AC, Boaus M, Jacob A, Jaekel J, Schorle H, Pankratz MJ, Katzenberg JD. Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span prolonging processes. *Physiol genomics*. 17 **2004** 230-244.

Bertrand G, Gross R, Roye M, Ahren B, Ribes G. Evidence for a direct inhibitory effect of PYY on insulin secretion in rats. *Pancreas*. 7(5) **1992** 595-600.

Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289(3) **2005** E429-38.

Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HK, Vijayasarathy C, Zaidi M, Kotlikoff M, Avadhani NG. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J*. 18(3) **1999** 522-33.

Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J. Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(1) **2003** 16-23.

Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL and Muscatello U. Effects of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Mol Biol Int*. 41(3) **1997** 469-480.

Boey D, Sainsbury A, Herzog H. The role of peptide YY in regulating glucose homeostasis. *Peptides*. 28 **2007** 390-395.

- Bowes SB, Jackson NC, Papachristodoulou D, Umpleby AM, Sonksen PH.** Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Endocrinol.* 148(3) **1996** 501-7.
- Brand MD, Couture P, Else PL, Withers KW, Hulbert AJ.** Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in mammal than in reptile. *Biochem J.* 275(1) **1991** 81-86.
- Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP.** The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem.* 206(3) **1992** 775-81.
- Brand MD.** Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontology.* 35(6-7) **2000** 811-820.
- Brand MD, Pamplona R, Portore Otin M, Requena JR, Roebuck SJ, Buckingham JA, Clapham JC, Cadenas S.** Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem J.* 368(2) **2002** 597-603.
- Brand MD, Turner N, Ocloo A, Else PL, Hulbert AJ,** Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J.* 15;376(Pt 3) **2003** 741-8.
- Brand MD.** The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 5) **2005** 897-904.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ.** The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J.* 1;392(Pt 2) **2005** 353-62.
- Brillon DJ, Zheng B, Campbell C, Matthews DE.** Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 268(3 pt 1) **1995** E501-13 1995.
- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E.** Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001** Oct;86(10):5083-6.
- Brookes PS.** Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med.* 38(1) **2005** 12-23.

Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ, Brand MD. The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp. Biochem. Physiol., B* **1998** 325–334.

Butow RA, Bahassi EM. Adaptive thermogenesis: orchestrating mitochondrial biogenesis. *Curr Biol.* 9(20) **1999** R767-9.

Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell.* 14(1) **2004** 1-15.

C

Castan I, valet P, Larrouv D, Voisin T, Remaury A, Daviaud D, Laburthe M, Lafontan M. Distribution of PYY receptor in human fat cells: an antilipolytic system alongside the alpha-2-adrenergic system. *Am J Physiol.* 265(1 pt 1) **1993** E74-80.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 269(5223) **1995** 546-9.

Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19) **2001** 10630-5.

Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes.* 45(11) **1996** 1455-62.

Chelikani PK, Haver AC and Reidelberg RD. Intravenous infusion of Peptide YY(3-36) potently inhibit food intake in rats. *Endocrinology* 146(2) **2004** 879-888.

Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science.* 297(5579) **2002** 240-3.

Cohen P, Yang G, Yu X, Soukas AA, Wolfish CS, Friedman JM, Li C. Induction of leptin receptor in the liver by leptin and food deprivation. *The journal of biological chemistry.* 280 (11) **2005** 10034-10039.

Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biology.* 4 **2003** 210.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 50(8) **2001** 1714-9.

D

Dakin CL, Small CJ, Park AJ, Seth A, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283(6) **2002** E1173-7.

Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology*. 145(6) **2004** 2687-95.

De Smet B, Depoortere I, Moechars D, Swennen Q, Moreaux B, Cryns K, Tack J, Buyse J, Coulie B, Peeters TL. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 316(1) **2006** 431-9.

Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Tillman JB, Walford RL, Spindler SR. Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic and nitrogen-metabolizing enzymes. *Am j Physiol*. 277(40) **1999** E352-360.

Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Rowley BC, Cao SX, Walford RL, Spindler SR. Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzymes genes. *Mechanisms of ageing and development*. 122 **2001** 1033-1048.

Djouadi F, Bastin J, Kelly DP, Merlet-Benichou C. Transcriptional regulation by glucocorticoids of mitochondrial oxidative enzyme genes in the developing rat kidney. *Biochem J*. 315 (Pt 2) **1996** 555-62.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1) **2002** 47-95.

Drucker DJ, Philippe J, Jepeal L, Habener JF. Glucagon gene 5'-flanking sequences promote islet cell-specific gene transcription. *J Biol Chem*. 262(32) **1987** 15659-65.

Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthièry Y, Ritz P. Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br. J. Nutr*. 90 **2003** 969-77.

Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1670(2) **2004** 126-31.

Dümmler K, Muller S, Seitz HJ. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochem J.* 317 (Pt 3) **1996** 913-8.

Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol.* 80(6) **2002** 757-64.

E

Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 41(3) **2001** 197-239.

Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86 **2004** 839-848.

Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem.* 277(49) **2002** 47129-35.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 415(6867) **2002** 96-9.

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22(16) **2003** 4103-10.

Echtay KS, Brand MD. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Rep.* 12(1) **2007** 26-9.

F

Feng B, Hilt BC, Max SR. Transcriptional regulation of glutamine synthetase gene expression by dexamethasone in L6 muscle cells. *J Biol Chem.* 265(30) **1990** 18702-6.

Ferrante AW Jr, Thearle M, Liao T, Leibel RL. Effects of leptin deficiency and short-term repletion on hepatic gene expression in genetically obese mice. *Diabetes.* 50(10) **2001** 2268-78.

Ferré P, Foretz D, Azzout-Marniche D, Bécard D and Foufelle F. Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates insulin action on hepatic gene expression. *Biochemical society transactions.* 29(4) **2001** 547-552.

Ferreira J, Gil L. Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics. Alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Biochem J.* 218(1) **1984** 61-7.

Ferré P. Action et secretion de l'insuline, double jeu pour les canaux potassiques. *Medecine/science.* 21 **2005** 694-696.

Finn PF, Dice JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition.* 22(7-8) **2006** 830-44.

Fleury C, Neverova S, Collins S, Raimbault O, Champigny C, Levi-Meyrueis F, Bouillaud M, Seldin F, Surwit RS, Ricquier D and Warden CH. Uncoupling protein 2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 15(3) **1997** 269-272.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1) **1957** 497:509.

Fontaine EM, Moussa M, Devin J, Garcia J, Ghisolfi M, Rigoulet M and Leverve XM. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Acta.* 1276(3) **1996** 181-187.

Foufelle F and Ferré P. New perspective in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 366 **2002** 277-391.

G

- Gauna C, van der Lely AJ.** Somatostatin, cortistatin, ghrelin and glucose metabolism. *J Endocrinol Invest.* 28(11 Suppl International) **2005** 127-31
- Gibbs J, Young RC, Smith GP.** Cholecystokinin decreases food intake in rats. 1973. *Obes Res.* 5(3) **1997** 284-90.
- Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B.** The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med.* 53(3) **2007** 207-13.
- Goglia F, Moreno M, Lanni A.** Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* 452(3) **1999** 115-20.
- Gold AJ, Costello LC.** Effects of semistarvation on rat liver, kidney, and heart mitochondrial function. *J Nutr.* 105(2) **1975** 208-14.
- Gomez J, Caro P, Naudi A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G.** Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* **2007**.
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M.** Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem.* 272(39) **1997** 24129-32.
- Granjeaud S, Bertucci F, Jordan BR.** Expression profiling: DNA arrays in many guises. *Bioessays.* 21(9) **1999** 781-90.
- Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H.** Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome.* 3(11) **1992** 609-19.
- Groen AK, Vervoorn RC, Wanders RJ, Van der Meer R, Tager JM.** An evaluation of the metabolite indicator method for determining the cytosolic phosphate potential in rat liver cells. *Biochim Biophys Acta.* 721(2) **1982** 172-7.
- Gross NJ.** Control of mitochondrial turnover under the influence of thyroid hormone. *J Cell Biol.* 48(1) 1971 29-40.
- Guerrieri F, Kalous M, Adorisio E, Turturro N, Santoro G, Drahota Z, Cantatore P.** Hypothyroidism leads to a decreased expression of mitochondrial F0F1-ATP synthase in rat liver. *J Bioenerg Biomembr.* 30(3) **1998** 269-76.

H

Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD. Altered relationship between protonmotive force and respiration in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats from different thyroid hormone status. *Eur J Biochem.* 178(2) **1988** 511-518.

Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. Krebs cycle enzyme from livers of mice are differentially regulated by caloric restriction. *Experimental gerontology.* 39 **2004** 1145-1154.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269(5223) **1995** 543-6.

Handschin C. and Spiegelman BM. Peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis and metabolism. *Endocrine reviews.* 27(7) **2006** 728-735.

Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, Jorgensen JO. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 56(2) **2002** 203-6.

Harper ME, Brand MD. Hyperthyroidism stimulates mitochondrial proton leak and ATP turnover in rat hepatocytes but does not change the overall kinetics of substrate oxidation reactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 72(8) **1994** 899-908.

Heijboer AC, Pijl H, Van den Hoek AM, Havekes LM, Romjin JA and Corssmit EP. Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *Journal of neuroendocrinology.* 18 **2006** 883-894.

Hermansen K. Effects of cholecystokinin (CCK)-4, nonsulfated CCK-8, and sulfated CCK-8 on pancreatic somatostatin, insulin, and glucagon secretion in the dog: studies in vitro. *Endocrinology.* 114(5) **1984** 1770-5.

Hoch FL. Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage, *J Bioenerg Biomembr.* 30(6) **1998** 511-32.

Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* **2004** Oct;24(20):9079-91.

I

Izquierdo JM, Luis AM, Cuezva JM. Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* 265 **1990** 9090-7.

J

Jacobus WE, Moreadith RW, Vandegaer KM. Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J Biol Chem.* 10;257(5) **1981** 2397-402.

Jani MS, Telang SD, Katyare SS. Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 38(5) **1991** 587-91.

Johnson G, Roussel D, Dumas JF, Douay O, Malthiery Y, Simard G, Ritz P. Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291(3) **2006** E460-7.

Joste V, Goitom Z, Nelson BD. Thyroid hormone regulation of nuclear-encoded mitochondrial inner membrane polypeptides of the liver. *Eur J Biochem.* 184(1) **1989** 255-60.

K

Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Acta.* 1604 **2003** 77-94.

Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Noguchi T, Tanaka T. Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the liver. *Eur J Biochem.* 168(3) **1987** 487-491.

Kaur N, Sharma N, Gupta AK. Effects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 26(6) **1989** 371-6.

Kerppola W. Uncoupling of the oxidative phosphorylation with cortisone in liver mitochondria. *Endocrinology.* 67 **1960** 252-63.

Kholodenko BN. Control of mitochondrial oxidative phosphorylation, *J Theor Biol.* 107(2) **1984** 179-88.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* **1998** Jan 1;101(1):1-9.

Kimberg DV, Loud AV, Wiener J. Cortisone-induced alterations in mitochondrial function and structure. *J Cell Biol.* 37(1) **1968** 63-79.

Kimura S, Rasmussen H. Adrenal glucocorticoids, adenine nucleotide translocation, and mitochondrial calcium accumulation. *J Biol Chem.* 252(4) **1977** 1217-25.

Kitazawa T, Kaiya H, Taneike T. Contractile effects of ghrelin-related peptides on the chicken gastrointestinal tract in vitro. *Peptides.* 28(3) **2007** 617-24.

Klingenberg M. Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr.* 31(5) **1999** 419-30.

Klok MD, Jakobsdottir S and Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews.* 8 **2007** 21-34.

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters.* 416(1) **1997** 15-18.

Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 1) **1997** E708-13.

Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 19 **1994** 471-479.

L

Lambert AJ, Merry BJ. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(1) **2004** R71-9.

Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution,

ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 143(1) **2002** 185-90.

Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, Yoon JW, Jun HS. Glucagon like peptide 1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic neoglucogenesis. *Diabetes*. 56 **2007** 1671-1679.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. **2000** Oct;106(7):847-56.

Lemaigre FP, Rousseau GG. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J*. 303 (Pt 1) **1994** 1-14.

Liang CP, Tall AR. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. *J Biol Chem*. 276(52) **2001** 49066-76.

Liddle RA, Rushakoff RJ, Morita ET, Beccaria L, Carter JD, Goldfine ID. Physiological role for cholecystokinin in reducing postprandial hyperglycemia in humans. *J Clin Invest*. 81(6) **1988** 1675-81.

Lin W. Les puces à AND sur lames de verre: principes et méthodes de confection, d'application expérimentale et d'analyse de données. *Extraits du mémoire de la thèse de doctorat* « Application de la technologie des puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. **2004**.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*. 21(1 Suppl) **1999** 20-4.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 116(7) **2006** 1776-83.

Longo VD, Liou LL, Valentine JS, Gralla EB. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys*. 365(1) **1999** 131-42.

Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, Decaux JF. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem*. 277(41) **2002** 37991-8000.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 404(6778) 2000 652-60

Lyer RP, Roland A, Zhou W, Ghosh K. Modified oligonucleotides--synthesis, properties and applications. *Curr Opin Mol Ther*. 1(3) **1999** 344-58.

M

Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA. Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(13) **1982** 4239-41.

Masoro EJ. Antiaging action of caloric restriction: endocrine and metabolic aspects. *Obes Res*. 3 Suppl 2 **2002** 241s-247s.

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 276(3) **2000** 905-8.

Marin S, Lee PWN, Bassilian S, Lim S, Boros LG, Centelles JP, Fernandez-novell JP, Guinovart JJ, Cascante M. Dynamic profiling of the glucose metabolic network in fasted rat hepatocytes using [1,2-¹³C₂]glucose. *Biochem J*. 381 **2004** 287-294.

Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. UCP4 a novel brain specific mitochondrial protein that reduces membranes potential in mammalian cells. *FEBS letters*. 443(3) **1999** 326-330.

Marone JR, Falduto MT, Essig DA, Hickson RC. Effects of glucocorticoids and endurance training on cytochrome oxidase expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 77(4) **1994** 1685-90.

Max SR, Mill J, Mearow K, Konagaya M, Konagaya Y, Thomas JW, Banner C, Vitkovic L. Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*. 255(3 Pt 1) **1988** E397-402.

McClelland GB, Kraft CS, Michaud D, Russel JC, Mueller CR, Moyes CD. Leptin and the control of respiratory gene expression in muscle. *Biochem Biophys acta*. **1688** 2004 86-93.

Melia HP, Andrews JF, McBennett SM, Porter RK. Effects of acute leptin administration on the differences in proton leak rate in liver mitochondria from ob/ob mice compared to lean controls. *FEBS Lett*. 458(2) **1999** 261-4.

Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioroko H, Epstein CJ, Wallace DC. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(3) **1999** 846-51.

Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(7) **2001** 3820-5.

Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S. Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes.* 54(4) **2005** 1056-63.

Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring).* 14(7) **2006** 1118-23.

Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 51(6 Suppl 1) **2002** 5-10.

Minet-quinard R, Moinard C, Villie F, Walrand S, Vasson P, Chopineau J, Cynober L. Kinetic impairment of nitrogen and muscle glutamine metabolisms in old glucocorticoid-treated rats. *Am. J. Physiol.* 276(3 pt 1) **1999** E558-64.

Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature.* 213(72) **1967** 137-9.

Miyasaka K, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Masuda M, Nagata A, Matsui T, Noda T, Takiguchi S, Takata Y, Kawanami T and Funakoshi A. energy metabolism and turnover are increased in mice lacking the Cholecystokinin-B receptor. *The journal of nutrition.* 132 **2002** 739-741.

Morino K, Petersen KF and Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 55(2). **2006** S9-S15.

Mount DW, Pandey R. Using bioinformatics and genome analysis for new therapeutic interventions. *Mol Cancer Ther.* 4(10) **2005** 1636-1642.

Muller MJ, Seitz HJ. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part I: respiration, thermogenesis and carbohydrate metabolism. *Klin Wochenschr.* 62(1) **1984** 11-8.

Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem.* **2002** Feb 15;277(7):5667-74.

Murphy MP, Brand MD. Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain. *Eur J Biochem.* 173(3) **1988** 637-44.

Murphy MP. Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 977(2) **1989** 123-41.

Mutvei A, Kuzela S, Nelson BD. Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur J Biochem.* 180(1) **1989** 235-40.

N

Naudi A, Caro P, Jove M, Gomez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R. Methionine Restriction Decreases Endogenous Oxidative Molecular Damage and Increases Mitochondrial Biogenesis and Uncoupling Protein 4 in Rat Brain. *Rejuvenation Res.* **2007**.

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein 2 as regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J.* 11(10) **1997** 809-815.

Nelson BD. Thyroid hormone regulation of mitochondrial function. Comments on the mechanism of signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1018(2-3) **1990** 275-7.

Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, Jordan BR. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics.* 29(1) **1995** 207-16.

Nicholls DG. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver as determined by ion distribution. *Eur J Biochem.* 50(1) **1974** 305-315.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 310 **2005** 314-317.

Nogueira V, Piquet MA, Devin A, Fiore C, Fontaine E, Brandolin G, Rigoulet M, Leverve XM. Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr.* 33(1) **2001** 53-61.

Nogueira V, Walter L, Averet N, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM. Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 34(1) **2002** 55-66.

O

Okuda M, Lee HC, Kumar C, Chance B. Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol and adrenaline on oxygen radical production in the isolated perfused rat liver. *Acta Physiol Scand.* 145(2) **1992** 159-68.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 145(5) **2001** 669-73.

P

Palacios-Romero R, Mowbray J. Evidence for the rapid direct control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine in rats. *Biochem J.* 184(3) **1979** 527-38.

Papa S, Capitanio N, Capitanio G, De Nitto E, Minuto M. The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry. *FEBS Lett.* 288(1-2) **1991** 183-6.

Papa S, Lorusso M, Capitanio N. Mechanistic and phenomenological features of proton pumps in the respiratory chain of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 26(6) **1994** 609-18.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269(5223) **1995** 540-3.

Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E, Mariage-Sampson R, Houlgatte R, Soularue P, Auffray C. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Res.* 6(6) **1996** 492-503.

Piquet MA, Nogueira V, Devin A, Sibille B, Filippi C, Fontaine E, Roulet M, Rigoulet M, Leverve XM. Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 468(2-3) **2000** 239-42.

Piquet MA, Roulet M, Nogueira V, Filippi C, Sibille B, Hourmand-Ollivier I, Pilet M, Rouleau V, Leverve XM. Polyunsaturated fatty acid deficiency reverses effects of alcohol on mitochondrial energy metabolism. *J Hepatol.* 41(5) **2004** 721-9.

Porter RK, Hulbert AJ, Brand MD. Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol.* 271(6 Pt 2) **1996** R1550-60.

Porter RK, Andrews JF. Effects of leptin on mitochondrial proton leak and uncoupling proteins: implication for mammalian energy metabolism. *Proceedings of the nutrition society.* 57 **1998** 455-460.

Puigserver P and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews.* 24(1) **2003** 78-90.

Q

R

Ramanadham M, Kaplay SS. Rat liver mitochondrial cytochrome c oxidase and cytochromes in experimental protein-energy malnutrition. *Nutr Metab.* 122(2) **1978** 73-81.

Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med.*29(10) **2000** 946-68.

Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R, Harper ME. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(1) **2004** E31-40.

Reimer MK, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 144(3) **2003** 916-21.

Rigoulet M. Control processes in oxidative phosphorylation: kinetic constraints and stoichiometry. *Biochim Biophys Acta.* 1018(2-3) **1990** 185-9.

Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E, Ouhabi R and Guerin B. Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: Dependence upon both fluxes and forces. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 184 **1998** 35-52.

- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM and Puigserver P.** Nutrient control of energy homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 434 **2005** 113-118.
- Rohas LM, St-pierre J, Uldry M, Jäger S, Handschin C and Spiegelman BM.** A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1 α . *PNAS*. 104(19) **2007** 7933-7938.
- Rolfe DF and Brand MD.** Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am j Physiol*. 271(4 pt 1) **1996** C1380-C1389.
- Rolfe DF and Brand MD.** The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissue. *Biosci Rep*. 17 **1997** 9-16.
- Rolfe DF and Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 77(3) **1997** 731-58.
- Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthièry Y, Simard G, Ritz P.** Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Letters* 541 **2003** 75-9.
- Roussel D, Dumas JF, Simard G, Malthiery Y, Ritz P.** Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after dexamethasone treatment, *Biochem. J*. 382 **2004** 491-9.
- Rushakoff RJ, Goldfine ID, Carter JD, Liddle RA.** Physiological concentrations of cholecystokinin stimulate amino acid-induced insulin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 65(3) **1987** 395-401.
- Ryazanov AG, Ward MD, Mendola CE, Pavur KS, Dorovkov MV, Wiedmann M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Parmer TG, Prostko CR, Germino FJ, Hait WN.** Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(10) **1997** 4884-9.

S

Samuels HH, Forman BM, Horowitz ZD, Ye ZS. Regulation of gene expression by thyroid hormone. *J Clin Invest.* 81(4) **1988** 957-67.

Sadana P, Zhang Y, Song S, Cook GA, Elam MG, Park EA. Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1 α) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PGC-1) isoforms. *Molecular and cellular endocrinology.* 267 **2007** 6-16.

Samartsev VN, Mokhova EN. ATP/ADP antiporter- and aspartate/glutamate antiporter-mediated fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria in incubation media differing in ion composition. *Biochem Mol Biol Int.* 42(1) **1997** 29-34.

Samartsev VN, Markova OV, Chezghanova SA, Mokhova EN. Effect of the cationic detergent CTAB on the involvement of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochemistry (Mosc).* 66(8) **2001** 926-31.

Sanchis D, Fleury N, Chomiki N, Gubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire F, Easlick J, Raimbault C, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression un the central nervous system of humans and rodents and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J biol chem.* 273(51) **1998** 34611-34615.

Sandoval DA, Davis SN. Leptin metabolic control and regulation. *Journal of diabetes and its complication.* 17 **2003** 108-113.

Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal.* 8(3-4) **2006** 582-99.

Sanz A, Gomez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr.* 38(5-6) **2006** 327-33.

Sanz A, Caro P, Sanchez JG, Barja G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci.* 1067 **2006** 200-9.

Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Acta.* 1576 (2002) 1-14.

Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry.* 97 **2006** 673-683.

Schacke H, Docke W, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96(1) **2002** 23-43.

Scheller K, Sekeris CE. The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp Physiol.* 88(1) **2003** 129-40.

Schjoldager B, Lawaetz O, Christiansen J. Effect of pancreatic glucagon and its 1-21 fragment on gastric emptying in man. *Scand J Gastroenterol.* 23(6) **1988** 726-30.

Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Unger RH. Leptin- or troglitazone-induced lipopenia protects islets from interleukin 1beta cytotoxicity. *J Clin Invest.* 100(7) **1997** 1750-4.

Skulachev VP. Anion Carrier in fatty acid mediated physiological uncoupling. *J Bioenerg Biomembr.* 31(5) **1999** 205-213.

Soboll S. Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1144(1) **1993** 1-16.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273(5271) **1996** 59-63.

Sorensen M, Sanz A, Gomez J, Pamplona R, Portero-Otin M, Gredilla R, Barja G. Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic Res.* 40(4) **2006** 339-47.

Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. *Metabolism.* 34(5) **1985** 450-6.

Spielbauer B, Stahl F. Impact of microarray in nutrition and food research. *Mol Nutr Food Research.* 49 **2005** 908-917.

Spindler SR. Use of microarray biomarkers to identify longevity therapeutics. *Aging Cell.* 5(1) **2006** 39-50.

Spindler SR, Dhahbi JM. Conserved and Tissue-Specific Genic and Physiologic Responses to Caloric Restriction and Altered IGF1 Signaling in Mitotic and Postmitotic Tissues. *Annu Rev Nutr.* 27 **2007** 193-217.

Sreekumar R, Unnikrishan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R, Sreekumaran nair K. Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am j Physiol.* 283 **2002** E38-E43.

Sterling K. Direct thyroid hormone activation of mitochondria: the role of adenine nucleotide translocase. *Endocrinology.* 119(1) **1986** 292-5.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*. 377(6549) **1995** 530-2.

St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem*. 278(29) **2003** 26597-603.

Stucki JW. The optimal efficiency and the economic degrees of coupling oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem*. 109(1) **1980** 269-283.

Suwa M, Nakano H, Kumagai S. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol*. 95(3) **2003** 960-8.

T

Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther*. 22(9) **2005** 847-53.

Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett*. 556(1-3) **2004** 111-5.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83(7) **1995** 1263-71.

Teodoro J, Rolo AP, Oliveira PJ, Palmeira CM. Decreased ANT content in Zucker fatty rats: relevance for altered hepatic mitochondrial bioenergetics in steatosis. *FEBS letters*. 580 **2006** 2153-2157.

Thompson JL, Manore MM, Thomas JR. Effects of diet and diet-plus-exercise programs on resting metabolic rate: a meta-analysis. *Int J Sport Nutr*. 6(1) **1996** 41-61.

Tiraby C, Langin D. PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. *Medecine/sciences*. 21 **2005** 49-54.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 407(6806) **2000** 908-13.

Tsuboi T, Da silva Xavier G, Holz GG, Jouaville L, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular ca^{2+} and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MN6 β -cells. *Biochem J.* 369 **2003** 287-299.

U

Ugochukwu NH, Figgers CL. Modulation of flux patterns in carbohydrate metabolism in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats by dietary caloric restriction. *Pharmacological research.* 54 **2006** 172_180.

V

Van Itallie CM. Dexamethasone treatment increases mitochondrial RNA synthesis in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology.* 130(2) **1992** 567-76.

Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol.* 20(5) **2000** 1868-76.

Vidal-puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(1) **1997** 79-82.

Vidal-puig A, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha R, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB. Energy metabolism in un coupling protein 3 knockout mice. *J biol chem.* 275(21) **2000** 16258-16266.

W

Wakat DK, Haynes RC Jr. Glucocorticoid-stimulated utilization of substrates in hepatic mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 184(2) **1977** 561-71.

Weber K, Bruck P, Mikes Z, Kupper JH, Klingenspor M, Wiesner RJ. Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology.* 143(1) **2002** 177-84.

Winder WW, Thomson DM. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys.* 47(3) **2007** 332-47.

Wojtczak L, Wieckowski MR. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 31(5) **1999** 447-55. Review.

Wolfe RR, Herndon DN, Jahoor F, Miyoshi H, Wolfe M. Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. *N Engl J Med.* 317(7) **1987** 403-8.

Wolthers T, Hamberg O, Grofte T, Vilstrup H. Effects of budesonide and prednisolone on hepatic kinetics for urea synthesis. *J Hepatol.* 33(4) **2000** 549-54.

Woodward CJ, Emery PW. Energy balance in rats given chronic hormone treatment. 2. Effect of corticosterone. *Br. J. Nutr.* 61(3) **1989** 445-52.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 141(11) **2000** 4325-8.

Wu C, Khan SA, Lange AJ. Regulation of glycolysis-role of insulin. *Experimental gerontology.* 40 **2005** 894-899.

X

Y

Yamaza H, Chiba T, Higami Y and Shimokawa I. Lifespan extension by caloric restriction: An aspect of energy metabolism. *Microscopy research and techniques.* 59 **2002** 325-330.

Yu YM, Tompkins RG, Ryan CM, Young VR. The metabolic basis of the increase of the increase in energy expenditure in severely burned patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 23(3) **1999** 160-8.

Z

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372(6505) **1994** 425-32.

Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene*. 56(2) **1995** 207-13.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 108(8) **2001** 1167-74.

Zhou YT, Shimabukuro M, Lee Y, Koyama K, Trieu F, Unger RH. Leptin normalizes the impaired response of proinsulin mRNA to long chain fatty acids in heterozygous Zucker diabetic fatty rats. *J Biol Chem*. 272(41) **1997** 25648-51.

FICHES TECHNIQUES

Fiche Technique n°1

Isolement des mitochondries de foie

Les mitochondries hépatiques sont isolées selon la technique mise au point par Jean-François Dumas (2003) adaptée de celle de Krahenbuhl *et al.* (2004).

Toutes les étapes se font à 4°C.

Après prélèvement, le foie est conservé dans du tampon d'isolement (10ml/1g) et sur la glace.

- Hacher soigneusement le foie, rincer 3 ou 4 fois avec du tampon d'isolement froid jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
- Homogénéiser dans 8 volumes de tampon d'isolement au Potter.
- Centrifuger à 600g pendant 10 minutes (4°C)
- Filtrer le surnageant sur gaze
- Centrifuger à 7000g pendant 10 minutes (4°C)
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 10 volumes de tampon d'isolement froid.
- Centrifuger à 3500g pendant 10 minutes (4°C)
- Resuspendre le culot dans un minimum de tampon d'isolement (1/4 de volume)

Fiche technique n°2 :

Dosage colorimétrique utilisant l'acide Bicinchoninique (B.C. Assay)

Technique :

- Préparer la solution de travail :
 - 1 volume de réactif B
 - 49 volumes de réactif A
- Préparer un blanc (tampon d'isolement) :
 - 30µl
 - 600 µl de solution de travail :
- Préparer un point de gamme étalon à 0,25 mg/ml
 - 30µl de sérum albumine (0,25 mg/ml)
 - 600µl de solution de travail
- Préparer un point de gamme étalon à 0,5 mg/ml :
 - 30µl de sérum albumine (0,5mg/ml)
 - 600µl de solution de travail
- Préparer l'échantillon :
 - 30µl d'échantillon
 - 600µl de solution de travail
- Incuber 30 min à 37°C
- Lire l'absorbance à 562nm.

Fiche technique n°3 :

Polarographie sur mitochondries isolées :

Les différentes mesures de polarographie sont réalisées à 30°C. La consommation d'oxygène mitochondriale est déterminée avec différents substrats et dans différents états.

Technique :

Dans la cuve de mesure :

Tampon de respiration : qsp pour 2000 µl

Les différentes combinaisons de substrats et d'inhibiteurs sont (concentration finale) :

Substrats du complexe 2 : Succinate (5mM) + Roténone (5µM : inhibiteur du complexe I)

- Démarrer la mesure par l'ajout de 1 mg de mitochondries isolées.
- Stimuler la respiration :
 - Par l'ajout d'ADP (150 µM)
 - Par l'ajout de glucose, d'ATP et d'hexokinase
- Inhiber par l'ajout d'oligomycine (2µg/ml).
- Stimuler la respiration par l'ajout de 2 µM de FCCP.

Réactifs :

Tampon de Respiration (pH 7,4) :

- KCl : 0,895 g
- Phosphate monopotassique : 1,36g
- HEPES : 0,0408 g
- EGTA : 0,038 g
- MgCl₂ : 0,0407 g
- Sérum Albumine : 0,3 g
- Eau distillée : qsp 100ml

Ajuster le pH à 7,4.

Oligomycine (1mg/ml dans l'éthanol)

Roténone (2,5 mM)

- roténone 1mg
- éthanol/DMSO (volume/volume) 1 ml

ADP (30 mM)

- ADP : 7,52 mg
- Eau distillée : 0,5 ml

Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP : 8mM) :

- FCCP 2 mg
- Ethanol : 1ml

Succinate (0,5 M) :

- acide succinique : 737 mg
- tampon respiration : 5 ml

Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

Fiche technique n°4

Détermination du potentiel de membrane par l'utilisation d'une électrode sensible au TPMP

Selon la technique de Brand (1995).

La mesure repose sur l'équilibration, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, d'une molécule sonde chargée positivement (TPMP⁺). Ainsi le TPMP⁺ qui est une molécule lipophile va diffuser dans la matrice en fonction du potentiel électrique jusqu'à atteindre un équilibre décrit par l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi = 2,3(RT/F) \log ([TPMP^+]_{in}/[TPMP^+]_{out})$$

L'accumulation de TPMP⁺ est mesurée indirectement en déterminant sa concentration extramitochondriale à l'aide d'une électrode sensible au TPMP⁺.

La force protomotrice étant l'addition du potentiel de membrane et du gradient de proton, l'ajout de nigéricine permet de dissiper le gradient de proton. Ainsi, la force protomotrice est directement proportionnelle au potentiel de membrane.

Technique :

Dans la cuve de mesure :

	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon de Respiration	Qsp 2000	
Nigéricine	2	80 ng/ml
Mitochondries isolées		1 mg
Roténone	4	5 µm

- Immerger l'électrode sensible au TPMP dans la cuve de mesure.
- Calibrer l'électrode par 4 additions successives de 0,5 μM de TPMP⁺
- Démarrer la mesure par l'ajout de 5 mM de succinate.
- Dissiper le potentiel électrique par l'ajout de 2 μM de FCCP.

Réactifs :

Tampon de Respiration (pH 7,4) :

- KCl : 0,895 g
- Phosphate monopotassique : 1,36g
- HEPES : 0,0408 g
- EGTA : 0,038 g
- MgCl₂ : 0,0407 g
- Sérum Albumine : 0,3 g
- Eau distillée : qsp 100ml

Ajuster le pH à 7,4.

Triphenylmethylphosphonium (TPMP : 10 mM) :

- TPMP : 1,8 mg
- Eau distillée : qsp 0,5 ml

Succinate (1,25 M) :

- acide succinique : 737 mg
- eau distillée : qsp 5 ml

Ajuster le pH à 7,4 avec du KOH 5N.

Nigéricine (80 $\mu\text{g/ml}$ éthanol)

Roténone (2,5 mM)

- roténone 1mg
- éthanol/DMSO (volume/volume) 1 ml

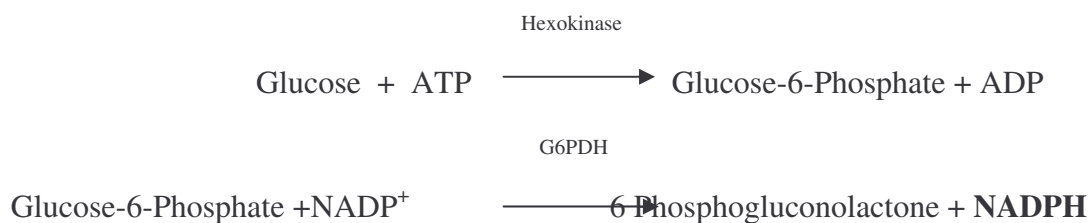
Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP : 8mM) :

- FCCP 2 mg
- Ethanol : 1ml

Fiche technique n°5 :

Détermination de la synthèse d'ATP par spectrophotométrie

Le principe du dosage repose sur la transformation de l'ATP produit par la mitochondrie en NADPH par l'utilisation d'un système d'enzyme.



Technique

Dans un tube à hémolyse:

	Volume (μl)	Concentration finale (mM)
Tampon de respiration	Qsp 1000	
Glucose		1
NADP		0,5
Mitochondries Isolées		200 μg
Hexokinase		0,9 U
G 6-PDH		1 U

- Ajouter du succinate à la concentration correspondante à l'oxygraphie.
- Incuber 1 minute à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 300 μM d'ADP

Réactifs :

Tampon de Respiration (pH 7,4) :

- KCl : 0,895 g
- Phosphate monopotassique : 1,36g
- HEPES : 0,0408 g
- EGTA : 0,038 g
- MgCl₂ : 0,0407 g
- Sérum Albumine : 0,3 g
- Eau distillée : qsp 100ml

Ajuster le pH à 7,4.

NADP (7 mM) :

- NADP 5 mg
- Eau distillée : qsp 1 ml

ADP (30 mM) :

- ADP : 7,25 mg
- Eau distillée : qsp 0,5 ml

Oligomycine (0,6 mg/ml éthanol)

Hexokinase (5 U/ml d'eau distillée)

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G 6-PDH : 10 U/ml d'eau distillée)

Fiche technique n° 6 :

Détermination du rapport ATP/O

Le dosage permet de déterminer la quantité d'ATP synthétisée en fonction de la consommation d'oxygène d'un échantillon de mitochondries isolées. Les différentes concentrations d'hexokinase permettent de faire varier la quantité d'ADP disponible pour les mitochondries et par conséquent le taux de synthèse d'ATP mitochondrial. Ainsi, nous obtenons différents points de rapport ATP/O avec une méthode plus « physiologique » (entre l'état 4 et l'état 3) que la détermination habituelle du rapport ATP/O à l'état 3 (avec une quantité d'ADP saturante).

Technique :

Dans la cuve de mesure (Oxigraphie) :

	Volume (μ l)	Concentration finale
Tampon de respiration	Qsp 2000	
Succinate		5 mM
Roténone		5 μ M
Mitochondries isolées		1 mg
ATP		125 μ M
Glucose		20 mM

- Démarrer la mesure par l'ajout d'hexokinase (5 – 180 mUI/ml)
- Attendre un taux de respiration stable et prélever 3 aliquots de 200 μ l à 3 temps différents.

- Précipiter la solution dans 200 μl d'acide perchlorique. Neutraliser le surnageant et congeler à -80°C .

Dosage de l'ATP :

Dans un tube à hémolyse :

	Volume (μl)	Concentration finale (mM)
Tampon de respiration	600	
NADP		0,5
Surnageant	200	

- Démarrer la réaction en ajoutant 0,1 UI de G 6-PDH
- Incuber 1 heure à 37°C .

Réactifs

Tampon de Respiration (pH 7,4) :

- KCl : 0,895 g
- Phosphate monopotassique : 1,36g
- HEPES : 0,0408 g
- EGTA : 0,038 g
- MgCl_2 : 0,0407 g
- Sérum Albumine : 0,3 g
- Eau distillée : qsp 100ml

Ajuster le pH à 7,4.

Roténone (2,5 mM) :

- Roténone : 1mg
- Ethanol/DMSO : 1 ml

ATP (8,4 mM)

- ATP : 5,07 mg
- Eau distillée : qsp 1 ml

Glucose (0,5 M) :

- Glucose : 90 mg
- Eau distillé : qsp 1 ml

Succinate (0,5 M) :

- Acide succinique : 737 mg
- Tampon de respiration : qsp 5 ml

Ajuster le pH à 7,4 avec du KOH 5N.

Acide perchlorique (7%)

Hexokinase (5 U/ml d'eau distillée)

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G 6-PDH : 0,1 U/ml d'eau distillée)

Fiche technique n°7 :

Extraction d'ARN au trizol

- Peser l'échantillon puis le réduire en poudre à l'aide du pilon et du mortier dans l'azote liquide en chambre froide.
- Verser la poudre de tissu dans un tube falcon et ajouter 1ml de TRIZOL pour 200mg de tissu. Homogénéiser (le volume de l'échantillon ne doit pas dépasser 1/10 du volume final).
- Verser l'homogénat dans un potter en téflon. Potteriser à +4°C.
- Remettre les échantillons en tube falcon et incuber 5 minutes à température ambiante pour permettre la complète dissolution des complexes nucléoprotéiques.
- Ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml de TRIZOL. Reboucher et mélanger vigoureusement pendant 15 secondes. Incuber 2 à 3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 10000g.

La phase inférieure rouge correspond au Phénol-chloroforme, séparée de la phase supérieure moins colorée par une interphase. Le volume de la phase aqueuse correspond à environ 60% du volume de TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation.

- Transférer la phase aqueuse dans un tube propre. La phase organique peut être conservé pour une extraction de protéines ou d'ADN.
- Ajouter 0,5 ml d'alcool isopropylique par ml de TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation.
- Incuber 10 minutes à température ambiante et centrifuger 10 minutes à 10000 (4°C).

L'ARN précipite et forme un gel au niveau du culot.

- Eliminer le surnageant et laver le culot une fois avec de l'alcool à 75% (1ml par ml de TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation). Vortexer et centrifuger à 7500g pendant 5 minutes (4°C).
- Sécher 15 minutes minimum sous la hotte.

- Dissoudre le culot d'ARN dans de l'eau RNase free (30µl). Reprendre par pipetage.
Incuber 10 minutes à 55°C.

Fiche technique n°8 :

Extraction d'ARN avec le kit qiagen « rneasy fibrous tissue kit »

Pour une biopsie de 30 mg :

- Allumer le bain-marie à 55°C
- Ajouter 300µl de tampon RLT
- Homogénéiser au polytron 20 à 40 secondes
- Ajouter 590µl d'eau RNase free à l'homogénat
- Ajouter 10µl de protéinase K
- Mixer délicatement par pipetage
- Incuber 10 minutes à 55°C
- Centrifuger 3 minutes à 10.000 g à 20-25°C
- Transférer le surnageant (environ 900µl) dans un eppendorf de 1,5 ou 2 ml.
- Ajouter 0.5 volumes (450µl) d'éthanol absolu au surnageant
- Transférer 700µl du mélange (incluant l'éventuel précipité) dans une colonne, dans un tube collecteur de 2 ml.
- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g puis éliminer l'éluat.
- Ajouter 350 µl de tampon RW1 dans la colonne.

- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g pour laver puis éliminer l'éluat.
- Ajouter 10µl de DNaseI à 70µl de tampon RDD, mixer par inversion.
- Ajouter les 80 µl de mix à la colonne
- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Ajouter 350µl de RW1 à la colonne.
- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g puis éliminé l'éluat.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml.
- Ajouter 500µl de tampon RPE à la colonne
- Fermer le tube et centrifuger 2 minutes à plus de 8000g pour sécher la membrane.
- Enlever le tube collecteur sans que la colonne ne le touche afin d'éviter le contact avec l'éthanol.
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et de centrifuger à vitesse maximale (<16000g) pour sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un tube collecteur de 1,5 ml.
- Ajouter 30 à 50 µl d'eau RNase free à la colonne.
- Fermer le tube et centrifuger 1 minute à plus de 8000g pour éluer.
- Si l'éluat contient plus de 30µg d'ARN, éluer de nouveau avec de l'eau RNase free.

Fiche technique n°9

Amplification d'ARN avec le kit Ambion 1753

Technique :

Synthèse du 1^{er} brin de cDNA :

- Décongeler sur glace les primers, nucléotides et 10X first strand buffer.
- Préparer X tubes 1,5 ml contenant pour chaque tube :
 - o 0,5 µg d'ARNt (dans moins de 10µl)
 - o 1µl de T7 Oligo(dt) primer
 - o Compléter le volume à 12µl avec de l'eau nucléase free
- Mettre 10 minutes à 70°C
- Centrifuger 5 sec et mettre sur glace
- Préparer le mélange pour la transcription pour X échantillon dans un tube de 1,5 ml :
 - o 2µl 10X first strand Buffer
 - o 4µl DNTP mix
 - o 1µl RNase inhibitor
 - o 1µl Arrayscript
- Ajouter 8µl du mix à chaque échantillon, mélanger en pipetant
- Mettre à 42°C pendant 2h
- Centrifuger 5 sec et mettre sur glace

Synthèse du deuxième brin de cDNA

- Mettre le bloc du thermocycler à 16°C
- Préparer le mix pour la synthèse dans un tube de 2 ml dans l'ordre suivant pour X échantillons :

- 63µl de nuclease free water
 - 10µl 10X second strand buffer
 - 4µl DNTP mix
 - 2µl DNA polymerase
 - 1µl Rnase H
- Mélanger en choquant doucement le tube
 - Ajouter 80µl du mix à chaque échantillon, mélanger en agitant légèrement le tube
 - Incuber 2h à 16°C dans le thermocycler
 - Mettre sur glace

Purification du cDNA

- Préchauffer l'eau nucléase free à 50°C pendant 10 minutes
- Ajouter 250µl de cDNA binding buffer dans chaque tube de l'étape précédente
- Déposer le mélangeur sur le filtre
- Centrifuger 10000 rpm pendant 1 minute
- Jeter l'éluat et replacer le filtre sur le tube
- Ajouter 500µl de tampon de lavage (wash buffer+éthanol)
- Centrifuger 10000 rpm pendant 1 minute
- Recentrifuger 10000 rpm pendant 1 minute
- Transférer le filtre sur un nouveau tube d'élution de 1,5 ml
- Ajouter 9µl d'eau nucléase free à 50°C
- Laisser incuber 2 minutes à Température ambiante
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 minute 30 seconde
- Refaire l'étape ci-dessus (élution des cDNA par l'eau nucléase free)
- Calibrer les échantillons à 14µl et remettre sur glace

Transcription In Vitro : amplification du cDNA et synthèse de aRNA

- Préparer le mix dans un tube de 1,5 ml stérile pour X échantillons :
 - 3µl aaUTP solution
 - 12µl ATP, CTP, GTP mix
 - 3µl UTP solution

- 4µl T7 10X reaction buffer
- 4µl T7 enzyme mix
- Mélanger en choquant doucement le tube
- Centrifuger 5 sec
- Ajouter 26µl du mélange aux échantillons calibrés à 14µl
- Incuber 10 heures à 37°C puis 4°C dans un thermocycler

Purification des aRNA

- Préchauffer l'eau nucléase free à 50°C pendant 10 minutes
- Placer un filtre aRNA sur un tube de collecte numéroté pour chaque échantillon
- Ajouter 60µl d'eau nucléase free à chaque échantillon
- Ajouter 350µl du tampon aRNA binding (passer immédiatement à l'étape suivante)
- Ajouter 250µl d'éthanol 100% au mélange
- Déposer l'échantillon de 700µl au centre du filtre
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 1 minute
- Jeter l'éluat et replacer le tube sur le filtre
- Ajouter 650µl de tampon de lavage
- Centrifuger 10000 rpm pendant 1 minute
- Recentrifuger 10000 rpm pendant 1 minute
- Ajouter 100µl d'eau nucléase free à 50°C sur le filtre
- Laisser incuber 2 minutes à T° ambiante
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 2 minutes
- Quantifier au nanodrop
- Congeler à -20°C pour marquage

Fiche technique n°10 :

Marquage et purification des aRNA.

Marquage des aRNA avec le Cy5 et Cy3

-Préparer le fluorochrome juste avant de commencer la procédure de marquage. Ajouter 11µl de DMSO à la dose de Cy3 ou Cy5 et vortexer.

La solution de dye resuspendue peut être conservée une heure à l'abris de la lumière et à température ambiante.

-Placez 10 µg de solution d'aRNA, et assécher au speedvac. Reprendre les aRNAs sec dans 9 µl de tampon de couplage.

- Ajouter les 11µl de solution de dye. Laisser incubé 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

- Ajouter 4,5 µl d'hydroxylamine 4M pour arrêter la réaction, mélanger par pipetage. Incuber 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Purification des aRNA :

- Préchauffer l'eau RNase free à 50-60°C.

- Ajouter 105µl de aRNA binding buffer à chaque échantillon de aRNA marqué. Procéder la prochaine étape immédiatement.

- Ajouter 75µl d'éthanol 100% à chaque échantillon. **Ne pas vortexer et ne pas centrifuger.**

- Placer l'échantillon sur une cartouche à filtre aRNA.

- Centrifuger 1 minute à 10.000g.

- Jeter l'éluat, et replacer la cartouche sur un tube.

- Ajouter 500 µl de Wash Buffer sur chaque cartouche.

- Centrifuger 1 minute à 10.000g. Jeter l'éluat.

- Recentrifuger 1 minute à 10.000g.

- Placer la cartouche sur un nouveau tube « aRNA collection tube ».

- Ajouter 10µl d'eau RNase free préchauffée à la cartouche.

- Laisser incubé 2 minutes à température ambiante.

- Centrifuger 1,5 minute à 10.000 g.

- Refaire l'étape précédente.
- Vérifier l'incorporation du dye au nanodrop.
- Congeler à -20°C en vue de la fragmentation.

Fiche technique n°11 :

Fragmentation de l'ARN marqué

Assécher le aRNA marqué au speedvac.

Resuspendre le aRNA marqué dans 9µl d'eau Nuclease free

Ajouter 1 µl de tampon de fragmentation 10X, mélanger et centrifuger brièvement

Incuber 15 minutes à 70°C

Ajouter 1µl de solution stop. Congeler à -80°C à l'abris de la lumière.

Fiche technique n°12 :

Hybridation des puces à ADN

Protocole élaboré par Martine le Cunff -Plate forme transcriptome-Ouest Génopôle.

- Préhybrider 1 heure à 42°C dans 150 ml de SSC 3.5 X, SDS 0.3%, BSA 1% (solution filtrée et préchauffée à 42°C)
- Lavage des lames par 5 up and down dans 5 bain d'H₂O différents à T. ambiante
- Cg. 1000 rpm, 3 min. à T. amb.
- Dénaturer les cibles 2 min. à 100°C, puis incuber 30 min. à 37°C
- Cg. 2 min. à 13 000 rpm
- Placer la sonde sur la zone spotted, recouvrir d'une lamelle en évitant les bulles
- Placer l'ensemble dans une chambre d'hybridation Telechem
- Mettre 20 µl de 3X SSC dans le réservoir de la chambre et 3 gouttes de 3 µl de 3X SSC sur la lame près de la lamelle.
- Fermer hermétiquement la chambre d'hybridation et l'immerger dans un bain-marie fermé (dans l'obscurité) à 42°C.

Lavages :

- Placer les lames sur un portoir et les immerger dans un tampon SSC 2X, SDS 0.1%. Laisser tomber les lamelles au fond du bain puis placer sous agitation douce 2 min.
- Transférer dans un bain de tampon SSC 1X en évitant de transférer trop de tampon contenant du SDS. Laisser agiter 2 min.
- Transférer dans un bain de SSC 0.2 X Laisser agiter 2 min.
- Refaire un autre lavage de 2 min. en SSC 0.2 X
- Centrifuger 3 min. à 1000 rpm à température ambiante
- Conserver au sec, à température ambiante et dans le noir.
- Lire au scanner