

Thèse de Doctorat

Romain RIVALIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie
Spécialité : Biologie Cellulaire
Unité de recherche : EA3143

Soutenue le 9 Décembre 2013

Thèse N° : 1366

Intégration de la régulation post-transcriptionnelle et des interactions mitochondries/cytosquelette dans les voies de contrôle du métabolisme mitochondrial.

JURY

Rapporteurs : **HOULGATTE Rémi**, DR1, INSERM UMR954, Université de Nancy
RAMSTEIN Gérard, MCU, HDR, Polytech, Université de Nantes

Examineurs : **MALTHIERY Yves**, PU-PH, INSERM UMR1063 /UMR 694, Université d'Angers
GUYETANT Serge, PU-PH, CHRU TROUSSEAU, Université de Tours

Directeur de Thèse : **SAVAGNER Frédérique**, MCU-PH, HDR, UPRES EA 3143/UMR694, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **EYER Joël**, DR1, LNBT/ UPRES EA 3143, Université d'Angers

Thèse de Doctorat

Romain RIVALIN

Intégration de la régulation post-transcriptionnelle et des interactions avec le cytosquelette dans les voies de contrôle du métabolisme mitochondrial.

Integration of post-transcriptional regulation and interaction with the cytoskeleton in the control pathways of mitochondrial metabolism.

Résumé

La mitochondrie fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire, grâce au mécanisme de phosphorylation oxydative. Cette fonction nécessite une expression coordonnée des génomes nucléaires et mitochondriaux assurée par la famille de coactivateurs transcriptionnels PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1), sensibles aux signaux endogènes et/ou environnementaux. Une régulation plus fine de la phosphorylation oxydative par des miRNAs est maintenant soupçonnée. Afin de préciser ces différents modes de régulation dans des modèles cellulaires de carcinomes thyroïdiens, nous avons exploré la voie PRC-dépendante (PGC-related coactivator) et les miRNAs spécifiquement exprimés dans ces modèles présentant une richesse en mitochondries et des niveaux de PRC et de PGC-1 α différents. Ce travail a permis de mettre en évidence miR-218 comme marqueur clé de régulation de la fonction mitochondriale. Au-delà de la régulation de l'expression génique, une fourniture énergétique adéquate nécessite également une répartition optimale des mitochondries au sein de la cellule, grâce à d'étroites connexions entre le cytosquelette et la mitochondrie. Des peptides issus de la sous-unité légère des neurofilaments, dont le NFL-TBS.40-63, sont capables d'entrer spécifiquement dans les cellules de glioblastomes humains et d'y déstabiliser le réseau microtubulaire, conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Pour étudier l'impact de ce peptide sur le réseau de mitochondries et leurs fonctions, nous avons traité le modèle cellulaire de glioblastomes humains T98G, par différentes concentrations de NFL-TBS.40-63. Ce travail révèle une perturbation du réseau de mitochondries et une diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules exposées. L'ensemble de ces travaux doit permettre le développement de traitements ciblés de la fonction mitochondriale.

Mots clés

Biogenèse mitochondriale, fonction OXPHOS, PGC-1 Related Coactivator, Cell-penetrating peptide NFL-TBS.40-63, Glioblastome, Cytosquelette.

Abstract

Mitochondrion provides energy for cell metabolism through the mechanism of oxidative phosphorylation. This function requires a coordinated expression of nuclear and mitochondrial genomes provided by the family of transcriptional coactivators PGC -1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator -1), responding to endogenous and/or environmental signals. A fine regulation of the oxidative phosphorylation by miRNAs is now suspected. To specify these regulatory pathways in cellular models of human follicular thyroid carcinomas, we have explored the PRC-related (PGC-related coactivator) pathway and specific microRNAs, in models presenting various mitochondrial abundance and differences in PRC and PGC-1 α expression levels. We have highlighted the role of miR-218 as a key regulatory factor of mitochondrial functions. An adequate energy supply also requires close connections between cytoskeleton and mitochondria to ensure an optimal distribution of mitochondria within the cell. Peptides derived from the light neurofilament subunit, as NFL - TBS.40 -63, are able to specifically enter into human glioblastoma cells and destabilize the microtubule network, leading to cell death by apoptosis. To study the impact of this peptide on mitochondrial network and oxidative phosphorylation, we have treated the T98G human glioblastoma cells by different concentrations of NFL- TBS.40 -63. Our work showed disturbance in mitochondrial network and reduction in mitochondrial respiration rate in the treated cells. All these results should allow the development of therapy targeting the mitochondrial function.

Key Words

Mitochondrial Biogenesis, OXPHOS function, PGC-1 Related Coactivator, Cell-penetrating peptide NFL-TBS.40-63, Glioblastoma, Cytoskeleton.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie personnellement Mr Rémi HOULGATTE et Mr Gérard RAMSTEIN d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner un peu de leur temps pour juger ce travail, ainsi que Messieurs Yves MALTHIERY et Serge GUYETANT pour leur contribution à ce jury de thèse.

Un grand merci à Monsieur Joël EYER pour m'avoir accepté au sein de son équipe EA 3143 ainsi que pour sa bonne humeur et ses nombreux (bons) conseils. Merci aux autres membres de l'équipe d'avoir aidé à mon intégration. Je leur souhaite une bonne continuation à tous, Claire pour sa dernière année de thèse et merci pour les manip que je n'aurai pu faire seul et à toi Julien pour ton post-doctorat, qu'il t'ouvre les portes d'une riche carrière de chercheur.

Je ne saurai assez remercier ma directrice de thèse, Mme Frédérique SAVAGNER, initiatrice de ce projet. Fred, tu as toujours su trouver les mots pour me pousser, être suffisamment pragmatique alors que je mettais ta patience à rude épreuve et à l'écoute des problèmes des gens. Si ce n'est cette légère malédiction, ton encadrement était parfait et depuis mon stage de master, tu m'inities au métier de la recherche du mieux qu'on puisse en juger. Merci d'avoir pris de ton temps pour relire et commenter mon manuscrit, tes conseils étaient les bienvenus.

Mes remercies mes colocataires de bureau qui furent nombreux et variés à mesure que je changeais de locaux. Nos conversations, nos rigolades, les ragots, tant de choses qui vont me manquer. Catherine, les débats que tu pouvais lancer et ces conversations instructives autour d'une tasse de thé ou de café resteront mémorables. Audrey, tes conseils techniques et ta disponibilité sont exemplaires, tout comme toi Marine, même si j'ai moins manipé avec toi, bonne fin de travaux dans ta nouvelle maison. Merci Edouard, Raluca et Audrey pour vos conseils en matière de Bioinfo, domaine que je ne maîtrisais pas du tout, mais maintenant je le comprends un peu mieux. Je vous souhaite à tous une très bonne continuation.

Merci à mes derniers colocataires, les membres de la toute nouvelle plateforme d'IPS, pour m'avoir fait une petite place dans leur bureau lors de la finalisation de ma thèse. Malgré que nos domaines n'étaient pas tout à fait les mêmes, votre ouverture d'esprit a permis que l'on puisse facilement échanger. Laurent, tu as une équipe du tonnerre, veille bien sur elle. Aude, j'espère que tout ira mieux pour toi. Anne, il va falloir assurer maintenant qu'il n'y aura plus qu'un homme dans le bureau, et Anne-catherine, si tu as des soucis sur Excell ou Word...tu sais à qui t'adresser. Quand à toi Steph, la petite dernière, je te souhaite bonne chance pour ta thèse qui démarre et que la réussite soit de ton côté.

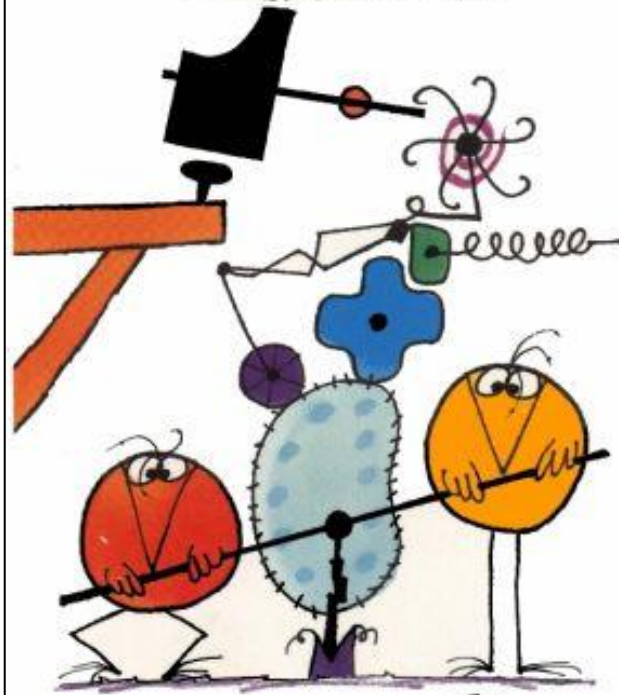
Ceci m'amène à remercier Messieurs Hervé LE MAREC et avant lui Pierre PACAUD pour avoir accepté de réaliser une partie de mes travaux dans les locaux de l'Institut du Thorax à Nantes. Merci également à Mr Richard REDON, pour m'avoir permis de travailler avec son équipe.

Je tiens à remercier de tout cœur les deux femmes les plus importantes de ma vie. Ma mère sans qui je ne serai pas là et qui m'a toujours poussé dans ce que j'entreprenais. Et bien sûr, ma femme qui a dû me supporter au cours de ces trois années qui ont dû parfois lui paraître plus longues qu'à moi-même. Vous avez cru en moi et si j'en suis là, c'est certainement en partie grâce à vous.

A côté, je remercie tous mes amis et toute ma famille pour votre soutien en dehors du labo pour tous ces bons moments qu'on a partagé. Merci à Gaëtan et Kilian qui partagent la même passion que moi. Merci aux joueurs du club de la Profondine pour m'avoir permis d'évacuer et de me défouler après le travail. Et merci à tous ceux que je ne n'aurai pas citer...

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier du fond pour la recherche de la Ligue Contre le Cancer et des subventions du programme de Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques (CIMATH-2) de la région des Pays de la Loire.

Les devises Shadok



Fouxel

POURQUOI FAIRE SIMPLE
QUAND ON PEUT FAIRE
COMPLIQUÉ ?!

ABREVIATIONS

4sU : 4-thiouridine
AC : Adénylate Cyclase
acétyl coA : acétyl coenzyme A
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt : Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
ADP : Adénosine DiPhosphate
Ago : Protéine Argonaute
Akt : Protéine Kinase B
ALA synthase : AminoLevulinic Acid synthase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : Adénosine MonoPhosphate-activated protein Kinase
ANT : Adénine Nucléotide Translocase
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ARNnc : Acide Ribonucléique non-codant
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATC : Carcinome thyroïdien anaplasique
ATF : Activating Transcription Factor
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAX : Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large
Bid : BH3-interacting domain death agonist
BN-PAGE : Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Ca²⁺ : Ion Calcium
CACT : Carnitine-AcylCarnitine Translocase
CaMK : Ca⁺⁺/CalModulin-dependent protein Kinase
CCCP : Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone
cdk1 : cyclin-dependent kinase 1
ChIP-chip : Chromatin ImmunoPrecipitation on chip
CO₂ : dioxyde de carbone
COX : Cytochrome c OXydase
CRE : cAMP Responsive Element
CREB : cAMP Response Element Binding
Cy : Cyanine
DAG : Diacylglycerol
DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region gene 8, Pasha

DO : Densité Optique
DTT: Dithiothreitol
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
ERR : Estrogen-Related Receptor
ERRE : ERR Response Element
FA: Adénome Folliculaire Thyroïdien
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée
FBS: Fetal Bovine Serum
FH : Fumarate Hydratase
FTC : Carcinome Folliculaire Thyroïdien
GABP : GA-Binding Protein
GDP : Guanosine DiPhosphate
GFP: Green Fluorescent Protein
GLUT-1 : GLUcose Transporter 1
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GSH/GSSG : Glutathion réduit/oxydé
GTP : Guanosine TriPhosphate
HCF-1 : Host Cell Factor-1
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
IP3: Inositol-1,4,5-triphosphate
kDa: kilo Dalton
KO : Knock Out
LDH : Lactate DésHydrogénase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
miRISC: miRNA-containing RNA-Induced Silencing Complex
miRNA : MicroARN
miRNA* : Brin complémentaire au miRNA mature
mTERF : mitochondrial transcription TERmination Factor
mtTFB : mitochondrial Transcription Factor B
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné
NF κ B : Nuclear Factor-kappa B
NIS : Na⁺/I⁻ symporter
NO : monoxyde d'azote
NOS : Nitric Oxide Synthase
NOX : NADPH OXidase
NRF : Nuclear Respiratory Factor
O2 : dioxygène
ORF :Phase Ouverte de Lecture (Open Reading Frame)
OxPhos : Oxidative Phosphorylation
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDH : Pyruvate DésHydrogénase

PDK1 : Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1
PGC-1 : Peroxisome proliferator-activated receptor _ Coactivator-1
Pi : Phosphate inorganique
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B ou AKT
PKC : Protéine Kinase C
PLC : PhosphoLipase C
POLRMT : POLymerase (RNA) MiTOchondrial
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRC : PGC-1-Related Coactivator
PTC : Carcinome thyroïdien papillaire
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
pVHL : protéine Von Hippel-Lindau
Q : ubiquinone
QH2 : ubiquinol
qRT-PCR : PCR en temps réel ou PCR quantitative
RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140
RPM : Rotations par minute
RT : Reverse-Transcription
RT-PCR : Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR : Retinoid X Receptor
SDH : Succinate DésHydrogénase
SDHAF2 : Succinate DeHydrogenase complex Assembly Factor 2
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
SNAP : (±)-S-Nitroso-N-AcetylPenicillamine
Sp1 : Specificity protein 1
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TSH : Thyroid Stimulating Hormone (thyrotropine)
UTR : Région Non-Traduite (Untranslated Region)
UTP : Uracile Triphosphate

Introduction	5
I : Mitochondrie et Métabolisme mitochondrial:.....	6
A : Structure de la Mitochondrie.....	6
1 : Membrane externe	6
2 : Espace intermembranaire	7
3 : Membrane interne	7
4 : Matrice.....	8
5 : Réseau mitochondrial et interactions	8
6 : ADN mitochondrial.....	9
B : La Phosphorylation Oxydative	9
1 : Principe de la réaction énergétique	10
2 : Structure des complexes	10
3 : Organisation en supercomplexes	14
C : La biogénèse mitochondriale :	15
1 : Régulation transcriptionnelle au niveau nucléaire	16
2 : Régulation transcriptionnelle au niveau mitochondrial	20
3 : La famille de coactivateurs PGC-1	22
D : Métabolisme Energétique et cancer:.....	27
1 : Effet Warburg.....	28
2 : Acteurs de la reprogrammation métabolique	29
3 : Modèles tumoraux	35
II: Les micro-ARN (miARN)	40
A : Biogénèse et Mécanismes d'action.....	40
1 : Biogénèse des miARNs.....	41
2 : Mécanismes d'action	45
B : miARN et Mitochondries.....	48
1 : La mitochondrie : réservoir de mito-miRs ?	49
2 : Cibles des mitomiRs	53
3 : Impact fonctionnel des miARNs sur la Mitochondrie	54
4 : miARNs, métabolisme et biogénèse mitochondriale	55
C : miARN et Cancers	57
1 : miRNA et Fonctions.....	58
2 : Modes d'Action	65
3 : miARNs : Biomarqueurs et cibles thérapeutiques.....	68
4 : MiARNs dans les Modèles Tumoraux	77
III: Problématique	83

Matériel et méthodes	86
I : Lignées cellulaires et réactifs	87
A : Cellules :	87
FTC-133:	87
XTC.UC1:	87
NIH-3T3 :	87
T98G :	88
II : Inhibition de l'expression de PRC par siARN et des miARNs par antimir	88
A : Inhibition de l'expression de PRC par siARN	88
B : Transfection des antimir™ miRNA Inhibitor	89
III : Mesure de l'activité cellulaire via l'activité déshydrogénase du complexe II de la chaîne respiratoire.....	90
A : Principe de la méthode	90
B : Protocole	90
IV : Extraction des ARNs totaux et miARNs à partir de cellules	90
A : extractions des ARN totaux.....	90
B : Extractions des ARN totaux dont miARNs	92
V : Transcription Inverse (RT)	93
A : ARN messagers	93
A : microARNs	93
VI : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (qPCR) en temps réel.....	94
A : Principe de la méthode	94
B : Protocole pour ARN messagers.....	95
B.1 Préparation de Standards	95
B.2 PCR quantitative en temps réel.....	96
B.3 Normalisation	97
B : Protocole pour microARNs.....	98
VII : Détection de protéines par Western-Blot (WB).....	99
A : Principe de la technique	99
B : Réactifs	99
B.1 Tampon Tris-SDS pH 8,8.....	99
B.2 Tampon Tris-SDS pH 6,8.....	99
B.3 Tampon échantillon 2X	100
B.4 tampon électrophorèse 10X	100
B.5 Tampon de transfert	101
B.6 Tampon TBS (Tris Buffered Saline) 10X	101
B.7 Anticorps monoclonaux	102
C : Protocole.....	102

C.1 Préparation des échantillons	102
C.2 Dépôt des échantillons et migration	104
C.3 Transfert sur membrane de PVDF	104
C.4 Saturation de la membrane	105
C.5 Incubation de la membrane avec l'anticorps primaire.....	105
C.6 Incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire.....	105
C.7 Révélation	105
C.8 Quantification	105
VIII : Oxygraphie sur XF-24	106
A : Principe de la méthode.....	106
B : Protocole	106
B.1 Hydratation du kit Cell Mito Stress :.....	106
B.2 Ensemencement sur plaque de culture XF-24	107
B.3 Hydratation de la cartouche XF24 extracellular flux assay kits	107
B.4 Préparation des réactifs.....	108
B.5 mesure polarographique	109
B.6 Normalisation	109
IX : Immunoprécipitation de la chromatine et hybridation sur puces à ADN (ChIP-on-chip)	110
A : Principe de la méthode.....	110
B : Réactifs	111
B.1 Solutions pour ChIP (à préparer le jour même et à garder sur glace jusqu'à utilisation) :	111
B.2 Salmon Sperm DNA.....	112
B.3 Protease Inhibitor Cocktail Tablets	112
B.4 Protéinase K (Invitrogen by Life Technologies)	112
B.5 Solutions Stocks Ioniques :.....	113
B.6 SDS Lysis Buffer	113
B.7 Dilution Buffer (DB).....	114
B.8 High Salt	114
B.9 TE Buffer	115
C : Protocole :.....	115
C.1 Préparation de l'échantillon.....	115
C.2 Contrôle de la sonication	117
C.3 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	117
C.4 Contrôle par qPCR.....	119
C.5 Amplification de l'ADN.....	120
C.6 Marquage de l'ADN.....	121
C.7 Hybridation sur lames Agilent	122

C.8 Extraction et analyse des données.....	123
X : Etude transcriptomique par hybridation sur puces à ADN.....	123
A : Principe de la méthode.....	123
B : Protocole	124
B.1 Contrôle de la qualité des ARN _{tot} par Bioanalyzer 2100.....	124
B.2 Marquage des ARN _{tot} et des spikes	124
B.3 Hybridation des ARNc marqués sur puce d'expression 4*44k	127
XI : Statistiques	130
Résultats	132
Article 1: PGC-1-related coactivator and miRNAs mediate mitochondrial biogenesis in thyroid cancer.....	133
Article 2: The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts both microtubules and mitochondrial networks in T98G glioma cell line.	167
Résultats complémentaires	202
Discussion, Conclusion et perspectives	205
Références bibliographiques.....	216
Annexes	253
Annexe 1 : Protocole détaillé de l'utilisation du Bioanalyseur 2100 avec des puces DNA 7500 :	254
Annexe 2 : Protocole détaillé de l'utilisation du Bioanalyseur 2100 avec des puces RNA 6000 Pico :.....	254
Annexe 3 : Protocole Agilent de marquage, d'hybridation et de lecture de sur puces Agilent d'expression 4*44k:	254

Introduction

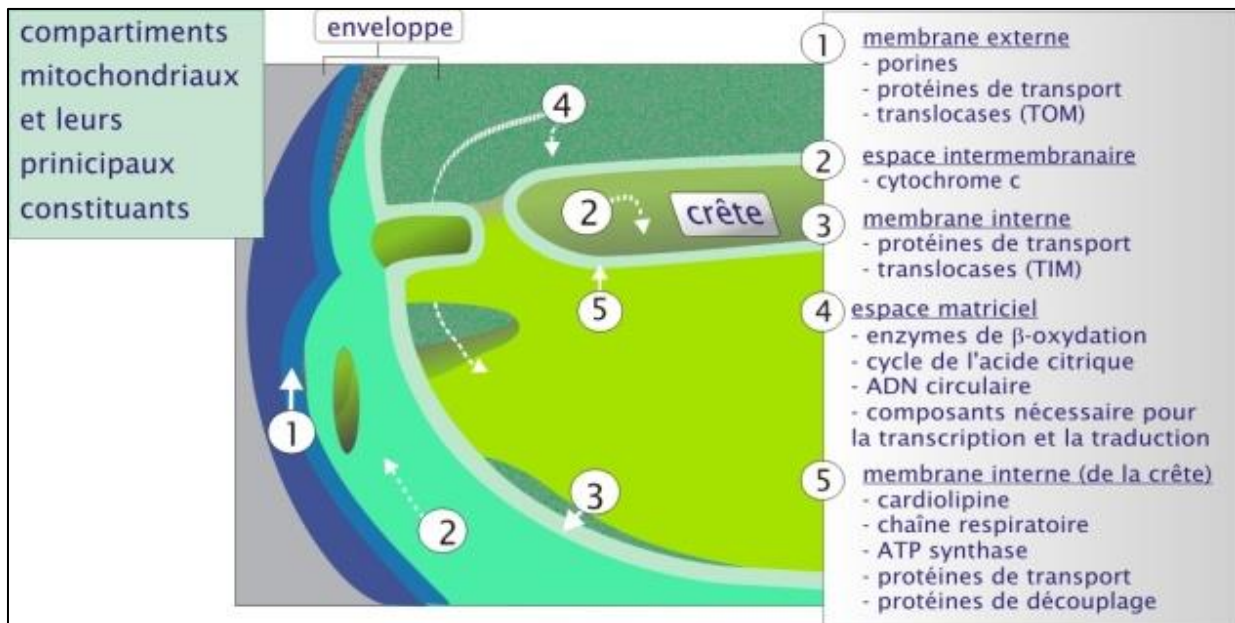


Figure I1 : Structure et composition de la mitochondrie. (d'après le site universitaire Unisciel)

I : Mitochondrie et Métabolisme mitochondrial:

A : Structure de la Mitochondrie

Les mitochondries sont des structures cytoplasmiques visibles en microscopie optique comme le réticulum endoplasmique de la cellule eucaryote. Elles doivent leur nom, issu du grec *mitos* (le fil) et *chondros* (le grain), à leur structure particulière en forme de grains ovoïdes dont la taille varie selon la cellule de 0,2 μm à 1 μm de diamètre et de 1 à 4 μm de long. Chaque mitochondrie comporte une membrane externe et une membranaire interne, la plus grande partie de celle-ci s'invaginant pour former des plis appelés crêtes. Ces deux membranes divisent l'organite en deux compartiments aqueux, l'espace intermembranaire, situé directement entre celles-ci, et un second situé au cœur de la mitochondrie, la matrice. La composition et les propriétés des deux membranes sont très différentes (figure I1).

1 : Membrane externe

La membrane mitochondriale externe (MME) possède une composition proche de celle des membranes plasmiques eucaryotes, avec jusqu'à 50% de lipides. Elle est donc imperméable, hormis au niveau de structures spécifiques, des porines telles le VDAC (*Voltage-dependent Anion Channel*), et des structures protéiques plus complexes, les translocases de la membrane externe ou TOM (*Translocase of the outer membrane*). Le VDAC permet le transport non-spécifique de molécules de petites tailles (<10kDa) telles le Ca^{2+} , l'ATP, l'ADP, les acides nucléiques, ainsi que d'autres métabolites. Le complexe TOM, comprenant un récepteur et un canal, permet le passage de protéines d'un poids moléculaire élevé à destination de la matrice mais aussi à destination des autres compartiments mitochondriaux (figure I2 et I3).

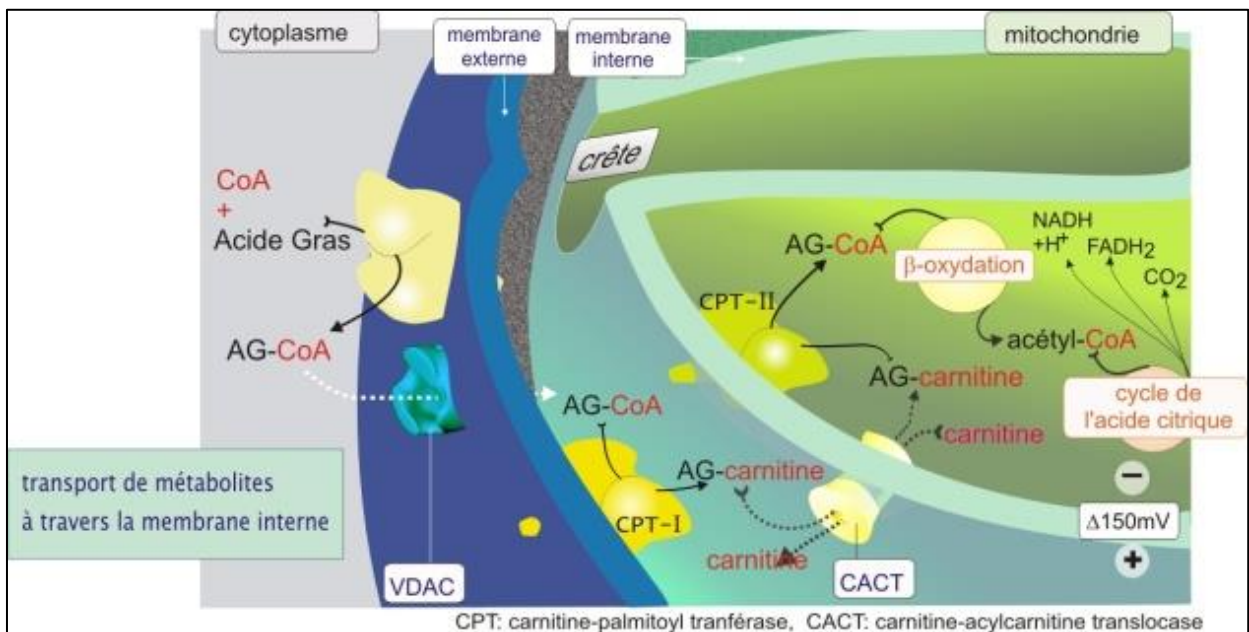


Figure 12 : Transport des produits et réactifs de la β -oxydation des acides gras. (d'après le site universitaire Unisciel)

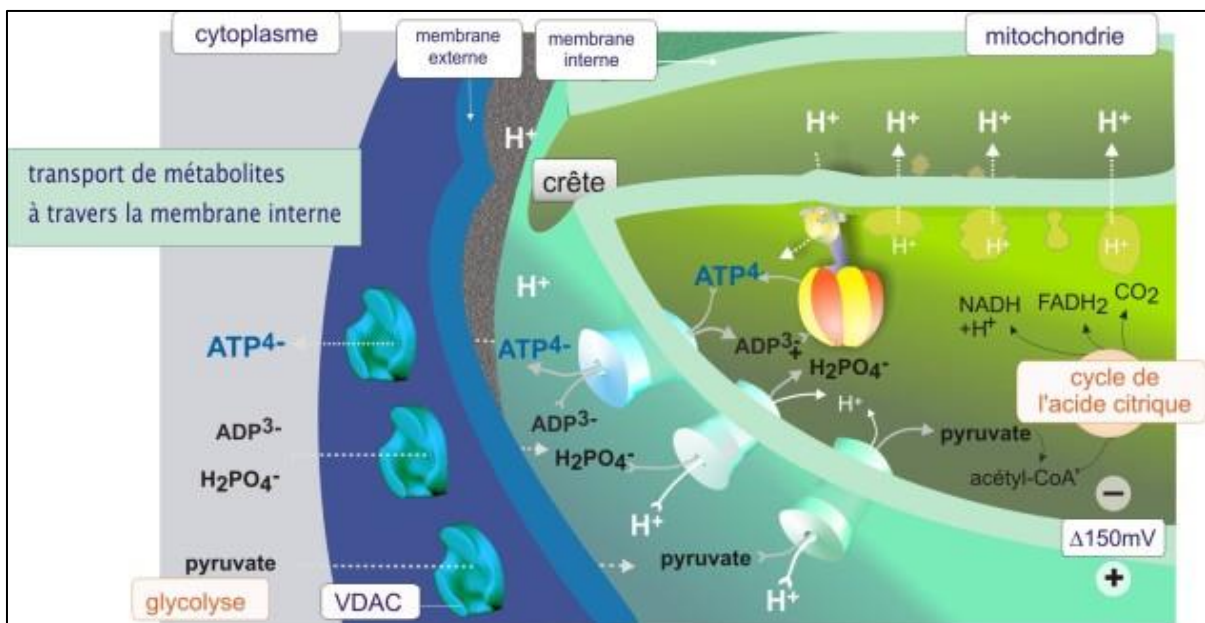


Figure 13 : Transport des produits et réactifs de la phosphorylation oxydative. (d'après le site universitaire Unisciel)

2 : Espace intermembranaire

Il est délimité par les deux membranes mitochondriales et possède une composition proche du cytosol. Ceci est en grande partie dû à la présence des porines dans la MME perméabilisant cette dernière et facilitant les échanges ioniques avec le cytosol. Il est également riche en protéines (Herrmann et Riemer, 2010), comprenant aussi bien des éléments structuraux nécessaires à la formation des complexes translocases ou bien encore à ceux de la chaîne respiratoire mais aussi d'autres enzymes (protéases, kinases, endonucléases,...).

3 : Membrane interne

La membrane mitochondriale interne (MMI) possède un rapport protéines/lipides élevé de l'ordre de 3:1. Elle est pratiquement dépourvue de cholestérol mais riche en un phospholipide particulier, la cardiolipine (diphosphatidylglycérol). Ces deux points sont caractéristiques de la membrane plasmique bactérienne en relation avec l'origine endosymbiotique de la mitochondrie (S.C. Grace, 1990). La cardiolipine comprend 4 acides gras assurant l'imperméabilité de la membrane. Toutes les molécules et ions nécessitent donc des transporteurs spécifiques pour atteindre la matrice. Parmi ceux-ci, on peut citer l'adénine nucléotide translocase (ANT), un antiport ATP/ADP et les translocases symports H^+ /pyruvate et H^+ / $H_2PO_4^-$. Les acides gras traversent la membrane interne grâce à une liaison avec la carnitine reconnue par l'antiport carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) avant d'être pris en charge par la carnitine palmitoyltransférase-II et d'entrer dans la voie de β -oxydation (figure I2 et I3). Comme la MME, la MMI présente un complexe protéique permettant aux macromolécules de les traverser, les TIM (*Translocase of the Inner Membrane*), composées également d'un récepteur et d'un canal protéique. Des protéines découplantes (UCP : Uncoupling Protein), permettent le passage de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice sans passage par l'ATP synthase, ce qui permet de réguler la synthèse d'ATP et de dissiper le gradient de protons sous forme de chaleur. Les crêtes formées par les invaginations de la MMI augmentent la

surface de contact avec la matrice, c'est aussi le siège de la phosphorylation oxydative assurée par les protéines composant la chaîne respiratoire.

4 : Matrice

Le second compartiment aqueux est délimité par la MMI et à la consistance d'un gel du fait d'une forte concentration en protéines hydrosolubles. Elle est très concentrée en divers enzymes nécessaires à l'oxydation des acides gras et du pyruvate ainsi qu'au cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs). L'espace matriciel renferme également le génome mitochondrial et les protéines nécessaires à sa transcription (ARNt, mitoribosomes,...).

5 : Réseau mitochondrial et interactions

Les mitochondries ne se présentent pas comme des organites distincts mais plutôt comme un réseau ramifié et interconnecté. La microscopie a pu montrer que ce réseau était dynamique qui s'étendait au sein du cytosol (Amchenkova *et al.*, 1988) et qu'il était étroitement lié au cytosquelette (Anesti et Scorrano, 2006), au réticulum endoplasmique (Szabadkai *et al.*, 2003), à l'appareil de Golgi et au noyau. La dynamique de ce réseau permet de s'adapter aux demandes énergétiques et de corriger d'éventuels défauts structurels ou fonctionnels, ceci grâce à des phénomènes de fusion et de fission. Les premières observations réalisées par Hackenbrock (Hackenbrock, 1966; Hackenbrock, 1968; Hackenbrock *et al.*, 1971) ont mis en évidence un rapide et réversible changement de la conformation mitochondriale d'un état « normal » à un état « condensé » en réponse à une demande accrue en ATP. Des altérations du métabolisme énergétique peuvent conduire à une fragmentation du réseau mitochondrial (Benard *et al.*, 2006) mais l'inverse est également vrai, à savoir des dysfonctionnements au niveau des processus de fusion/fission peuvent conduire à des troubles de la fonction énergétique (Benard *et al.*, 2006). Plus récemment, des études (Nekrasova *et al.*, 2011 ; Gentil *et al.*, 2012 ; Cagalinec *et al.*, 2013) ont confirmé que les interactions entre les filaments intermédiaires du cytosquelette, et notamment avec le NFL (*low-molecular-weight*

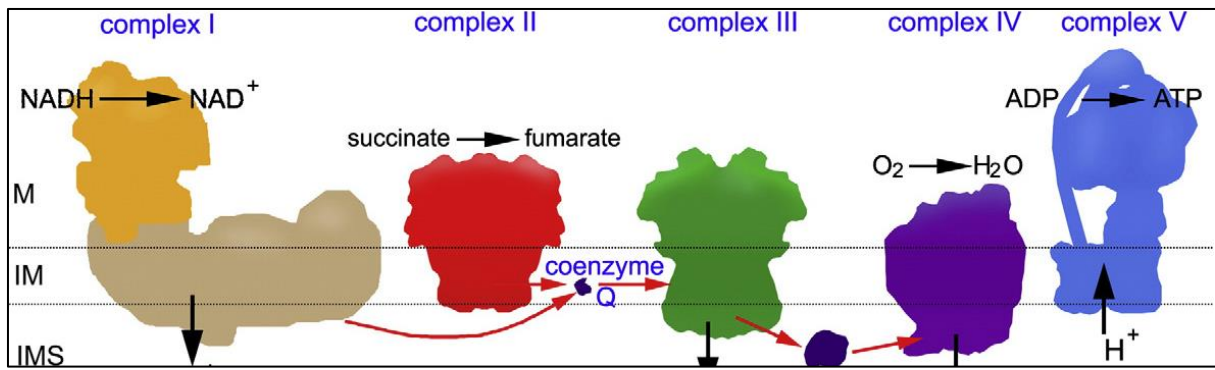


Figure I4: Représentation schématique du système OXPHOS.

Le schéma présente les différents composants sans leurs interactions structurales. Les positions de la matrice (M), de l'espace intermembranaire (IMS) et de la membrane interne (IM) sont également indiquées (D'après Dudkina *et al.*, 2010).

neurofilament), la vimentine, et des protéines impliquées dans cette dynamique (mitofusine, dynamine) étaient nécessaires pour le maintien de l'intégrité de l'organite mais également pour assurer sa mobilité et l'équilibre entre fusion et fission.

6 : Adn mitochondrial

Outre des enzymes et des ribosomes, la matrice mitochondriale possède un élément important et non des moindres, l'ADN mitochondrial (ou ADNmt). Bien que limité, cet ADN circulaire double-brin non-chromosomique, est indispensable car il code un petit nombre de protéines (13 chez l'homme) qui s'intègrent étroitement à la membrane interne avec des protéines d'origine nucléaire pour former les complexes de la chaîne respiratoire. La traduction de l'ADNmt utilisant un code génétique différent de celui du code nucléaire, ceci exige la transcription chez l'homme, de deux ARNr et de 22 ARNt nécessaires à la synthèse des protéines de l'organite.

B : La Phosphorylation Oxydative

Classiquement, on assimile les mitochondries aux « centrales énergétiques » de la cellule. On peut les voir comme des organites convertissant en ATP les liaisons moléculaires de molécules issues de l'alimentation. Le métabolisme oxydatif nécessite donc un apport en acides gras et en pyruvate produit par la glycolyse cytosolique. Ces éléments sont transportés spécifiquement au travers des membranes mitochondriales vers la matrice où leur dégradation libère de l'acétyl coenzyme A (acétyl coA). Ce dernier est ensuite pris en charge par le cycle de l'acide citrique afin de générer des équivalents réduits sous forme de coenzymes NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné), FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée) et Ubiquinone (CoQ₁₀H₂ ou QH₂, un équivalent du coenzyme Q₁₀) permettant à la chaîne respiratoire de générer la force protonique nécessaire à la synthèse d'ATP (figure I4).

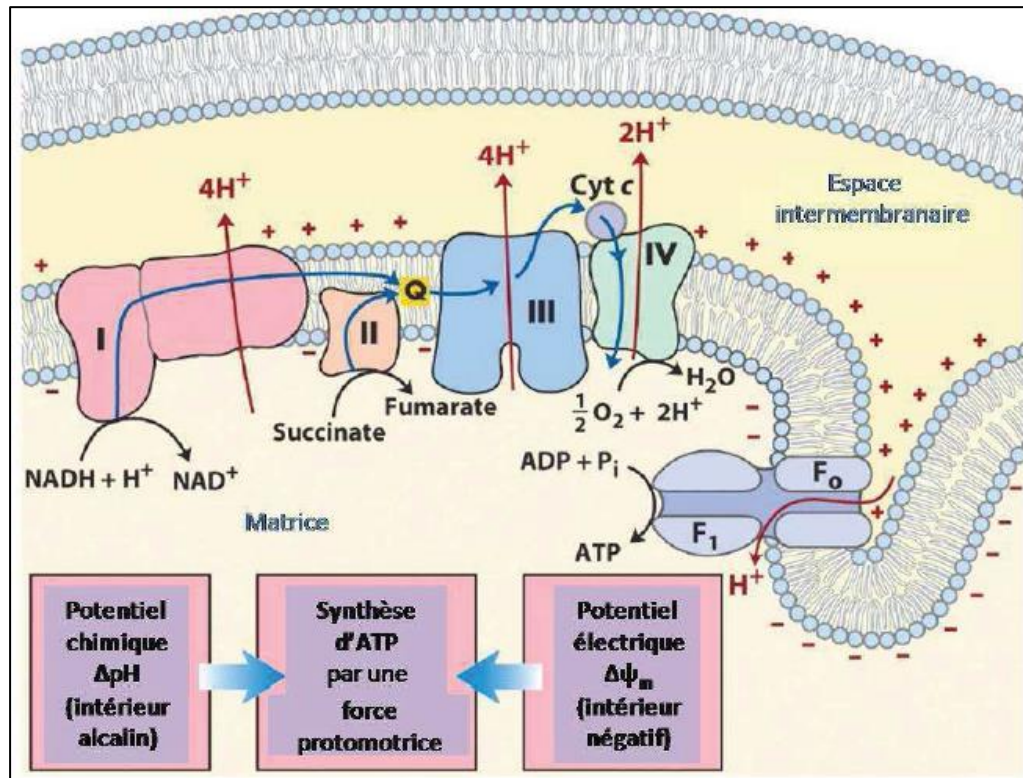


Figure I5 : Système de phosphorylation oxydative.

La chaîne de transport des électrons consiste en une série de transporteurs d'électrons (ubiquinone et cytochrome *c*) associés à des protéines (complexes I, II, III et IV) imbriquées dans la membrane interne mitochondriale. Le NADH et le FADH₂ transfèrent leurs électrons (flèches bleues) et les ions hydrogènes (H⁺) associés (flèches rouges) à la chaîne de transport des électrons. Les électrons, en passant d'un transporteur à l'autre, cèdent de l'énergie qui permet le transport des ions H⁺ vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie par l'intermédiaire des complexes I, III et IV. L'accumulation de ces ions crée un gradient d'énergie chimique résultant des différences de concentration d'hydrogène ($\Delta p\text{H}$) de chaque côté de la membrane interne ainsi qu'un gradient électrique ($\Delta\psi_m$) à travers la membrane interne mitochondriale. L'ATP est formée à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) lors du retour des protons vers la matrice par le biais de l'ATP synthase, constituée des sous-unités F₀ et F₁, grâce à la force protomotrice créée par les gradients électrique et chimique (D'après Soazig Le Pennec, 2010).

ADP : Adénosine DiPhosphate ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; Cyt *c* : Cytochrome *c* ; FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; O₂ : dioxygène ; Q : ubiquinone ou coenzyme Q.

1 : Principe de la réaction énergétique

Les hydrogènes et électrons produits lors de la dégradation du glucose et des acides gras dans le cytosol, sont transférés à l'accepteur terminal d'électrons, l'O₂ grâce à une série de réactions d'oxydoréduction le long de la chaîne respiratoire et conduisant à la formation d'H₂O. Ces réactions se déroulent au sein de la membrane interne, principalement à la base des crêtes, et fait intervenir quatre complexes enzymatiques. La direction du flux d'électrons est déterminée par la faculté des différents éléments à capter ou à perdre des électrons, selon leur potentiel d'oxydoréduction. Ainsi chaque complexe a une affinité plus importante pour les électrons que son prédécesseur, jusqu'à l'oxygène moléculaire, un très bon agent oxydant capable de capter avidement les électrons des autres molécules. Au cours de ces transferts, de l'énergie va être libérée et permettre la translocation de protons (H⁺) depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce processus crée un gradient protonique de part et d'autre de la membrane, et également un potentiel de membrane de par la différence de potentiel (négatif : matrice ; positif : espace intermembranaire). Ce gradient électrochimique ainsi généré est utilisé pour la phosphorylation d'ADP en ATP par l'ATP synthase (complexe V), visible au microscope électronique. Le couplage de l'oxydation des métabolites en H₂O et la production d'ATP est appelée Phosphorylation Oxydative (OXPHOS) (figure I5). Cette théorie chimiosmotique a été proposée pour la première fois en 1961 par Mitchell (Mitchell P., 1961).

2 : Structure des complexes

Le système de phosphorylation oxydative est constitué de 5 complexes protéiques enchâssés dans la membrane mitochondriale interne. Quatre d'entre eux, numérotés de I à IV, forment la chaîne respiratoire à proprement parlé et ils sont couplés au cinquième complexe l'ATP synthase (N.V. Dudkina *et al.*, 2008 ; N.V. Dudkina *et al.*, 2010). Parmi toutes les protéines composant ces complexes, seules 13 sont codées par l'ADN mitochondrial, les autres l'étant par le génome nucléaire.

2.1 Complexe I: NADH-Ubiquinone oxydoréductase ou NADH déshydrogénase

Le complexe I est la voie d'accès principale à la chaîne de transport des électrons, il catalyse le transfert d'une paire d'électrons du NADH vers l'ubiquinone qui, réduite, forme l'ubiquinol. Cette réaction est couplée à la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire depuis la matrice. Chez les mammifères, avec ses quarante-six sous-unités, il constitue le plus gros des complexes (près d'1MDa). Sept de ses sous-unités sont codées par le génome mitochondrial (*ND1-ND6* et *ND1L*), elles sont toutes des polypeptides hydrophobes transmembranaires homologues de polypeptides bactériens. En s'intégrant dans la membrane interne, il prend la forme d'un « L », avec deux bras perpendiculaires. Le premier, hydrophobe et contenant les sous-unités d'origine mitochondriale, s'enchâsse dans la membrane et va constituer le site catalytique de l'enzyme, tandis que le second, hydrophile, est présenté à la matrice (Fernandez-vizarra *et al.*, 2009 ; Papa *et al.*, 2012). Le complexe I est également un site de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) notamment d'ions Superoxyde (O_2^-). Les pathologies les plus fréquentes d'origine mitochondriale, ont pour cause une déficience de l'activité de ce complexe ou des mutations entraînant une surproduction d'EROs. Ceci peut avoir pour conséquence un développement de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Block, 2008) ou participer à la tumorigénèse (Ishikawa *et al.*, 2008)

2.2 Complexe II: Succinate déshydrogénase ou Succinate-Ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II consiste en plusieurs polypeptides formant un complexe lié à la membrane et impliqué à la fois dans la chaîne respiratoire mais aussi indispensable au cycle de Krebs. Il représente une voie alternative d'entrée d'électrons dans la chaîne respiratoire, permettant la livraison de ces derniers du Succinate à l'ubiquinone via le FAD. Ce complexe, situé uniquement à la face interne de la membrane, ne peut être lié à une quelconque translocation de protons comme dans le cas du

complexe I. Le complexe II se compose de quatre sous-unités (A-D), les sous-unités A et B forment la partie hydrophile et catalytique, tandis que les sous-unités C et D, hydrophobes, permettant l'intégration à la membrane. La flavination de la sous-unité A (SDHA) est un processus indispensable à la formation et à la fonction du complexe II (Hao *et al.*, 2009), et elle est liée à l'expression du gène *SDHAF2* (*Succinate DeHydrogenase complex Assembly Factor 2*) codant pour une protéine mitochondriale (Baysal, 2013). Les protéines SDHAF 1 et 2 ont un rôle essentiel dans l'assemblage du complexe II en participant à la biosynthèse mitochondriale des centres fer-souffre du complexe. Des mutations au niveau de ces gènes entraînent le développement des parangliomes (Hao *et al.*, 2009 ; Baysal, 2013).

2.3 Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase ou Complexe cytochrome bc₁

Le complexe III catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c, un transporteur d'électrons mobiles dans la membrane mitochondriale. Comme pour le complexe I, pour chaque paire d'électrons, ce transfert est couplé à une translocation de quatre protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Chez les mammifères, ce complexe est un homodimère, dont chaque monomère est constitué de onze sous-unités. Trois de ces-dernières contiennent des groupements redox acteurs du transfert d'électrons : le cytochrome *b₁* avec deux groupements hème différents, le cytochrome *c₁* et la protéine fer-souffre Rieske. Il est à noter que le cytochrome *b* est la seule sous-unité codée par l'ADNmt, et bien que rares, les pathologies liées à une déficience du complexe III sont dues à des mutations de la séquence du gène codant pour celle-ci.

2.4 Complexe IV : Cytochrome c Oxydase ou COX

La dernière étape du transport d'électrons dans la mitochondrie est le transfert successif d'électrons du cytochrome c réduit à un oxygène moléculaire, qui sera par la suite réduit en H₂O.

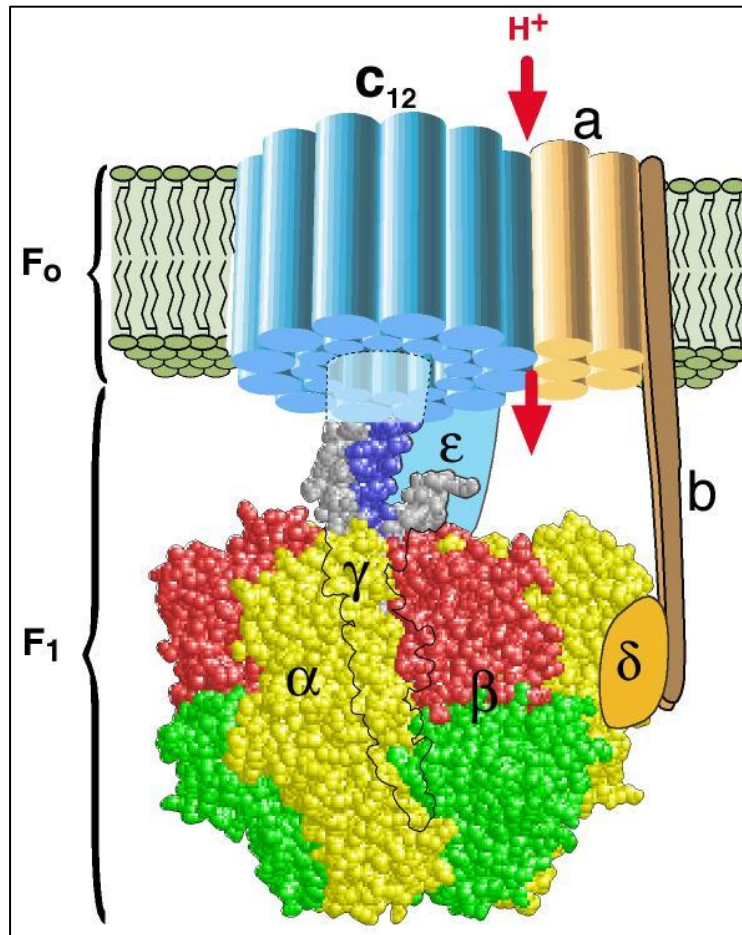


Figure I6 : Structure de l'ATP synthase F₁F₀ mitochondriale.

L'ATP synthase est constituée de deux parties principales : l'une polaire et enchâssée dans la membrane apolaire, notée F₀, l'autre globulaire et au contact de la matrice mitochondriale, notée F₁. F₀ comprend un nombre variable selon les espèces de sous-unités membranaires c (12 chez l'homme) ainsi que les sous-unités a et b. F₁ comprend 3 sous-unités β catalytiques responsables de la synthèse d'ATP, 3 sous-unités α structurales, ainsi que les sous-unités ε, γ et δ. Ces différentes sous-unités constituent le « rotor » (partie mobile : sous-unités γεc₁₂) et le « stator » (partie fixe : sous-unités αβ3δ du segment F₁ et ab₂ de F₀). (D'après Wang et Oster, 1998).

ADP : Adénosine Di Phosphate ; ATP : Adénosine Triphosphate ; H⁺ : protons ; Pi : phosphate inorganique.

Chez les mammifères, le complexe IV est un énorme assemblage de 13 sous-unités polypeptidiques désigné comme la cytochrome oxydase. Les trois sous-unités les plus grosses sont toutes codées par l'ADNmt, COX I-III, et contiennent les hèmes a et a₃ ainsi que les centres cuivres CuA et CuB. Les dix sous-unités restantes (COX IV-XIII) sont codées par l'ADN nucléaire et contribuent à la régulation de l'activité catalytique ainsi qu'à l'assemblage et la stabilisation du complexe (Stiburek *et al.*, 2006 ; Fernandez-vizarra *et al.*, 2009 ; Papa *et al.*, 2012).

2.5 Complexe V : ATP Synthase

L'ATP synthase fonctionne comme une enzyme réversible capable, d'une part de synthétiser de l'ATP en utilisant la force motrice générée par le pompage de protons de la chaîne respiratoire, et d'autre part de pomper des protons depuis la matrice en cas d'absence de gradient (comme la pompe H⁺-ATPase des lysosomes). Chez les mammifères, il s'agit d'un complexe protéique constitué de multiples sous-unités, dont deux codées par l'ADNmt (ATP6 et ATP8), l'ensemble formant deux domaines fonctionnels (figure I6). La sphère F₁ est la partie catalytique de l'enzyme, présentée à la matrice, tandis que la partie F₀ forme la fraction basale, enrobée dans la membrane interne. Les portions F₁ des ATP synthases bactériennes et eucaryotes possèdent les mêmes structures, 5 polypeptides différents avec une stœchiométrie α₃β₃δγϵ, avec les unités α et β alternant au sein de la tête F₁. Chez les eucaryotes, la portion F₀ est plus complexe que celle des bactéries et se compose de 3 polypeptides différents avec une stœchiométrie a b₂c₁₂. En présence du gradient de protons établi entre les deux faces de la membrane mitochondriale interne et en absence de concentrations élevées d'ATP dans la matrice, l'ATP synthase laisse passer les protons, au niveau du domaine membranaire F₀, un passage qui permet la production d'ATP par le domaine F₁ (12 H⁺ pour 3 ATP). C'est le potentiel de membrane et le passage des protons qui en résulte, qui permet l'expulsion de l'ATP vers l'espace matriciel au cours d'un mouvement de rotation de la sous-unité γ dans le domaine F₁. La place de l'ATP est immédiatement prise par un nouvel ADP + Pi.

3 : Organisation en supercomplexes

Deux visions s'opposent sur l'organisation des complexes de la chaîne respiratoire au sein de la membrane. La première, la plus ancienne, est un modèle dit d'« état-fluide » (*fluid-state model*) basé sur la possibilité d'isoler indépendamment chaque complexe de façon homogène et fonctionnellement actif. Elle postule que les complexes diffusent librement dans la membrane et que le transfert d'électrons se fait par collision aléatoire des différents complexes (Hackenbrock *et al.*, 1986). Mais elle est cependant remise en question par la seconde, un modèle dit d'« état-solide » qui propose diverses interactions stables entre les complexes OXPHOS composant des structures nommées des « supercomplexes ». Ce modèle se base sur les observations réalisées par électrophorèses en « blue native » (BN-PAGE) (Schägger et Pfeiffer, 2000 ; Eubel *et al.*, 2003 ; Eubel *et al.*, 2004) et en microscopie électronique (Dudkina *et al.*, 2005 ; Schäfer *et al.*, 2006). Dans de nombreux organismes, les complexes I, III et IV ont été trouvés associés sous forme de supercomplexes (Dudkina *et al.*, 2008 ; Dudkina *et al.*, 2010). Seul le complexe II semble à ce jour ne pas former de structures avec d'autres complexes de la chaîne respiratoire. L'une des possibles explications peut être son implication directe dans le cycle de l'acide citrique. Le supercomplexe I+III₂+IV₁₋₂ (un complexe I, deux complexes III et un ou deux complexes IV) est appelé respirasome, car il assure de manière autonome la respiration en présence d'ubiquinone et de cytochrome c. Outre l'aspect fonctionnel, ces structures sont nécessaires à l'assemblage et à la stabilité de la chaîne respiratoire. Par exemple, le complexe I est indispensable à la formation du complexe III (Ugalde *et al.*, 2004) et inversement, l'absence de complexe III conduit à une perte du complexe I (Blakely *et al.*, 2005). De fait, l'existence de supercomplexes et des complexes OXPHOS coexistent et l'association/dissociation des complexes en supercomplexes représente un procédé dynamique dépendant de l'état physiologique de la cellule.

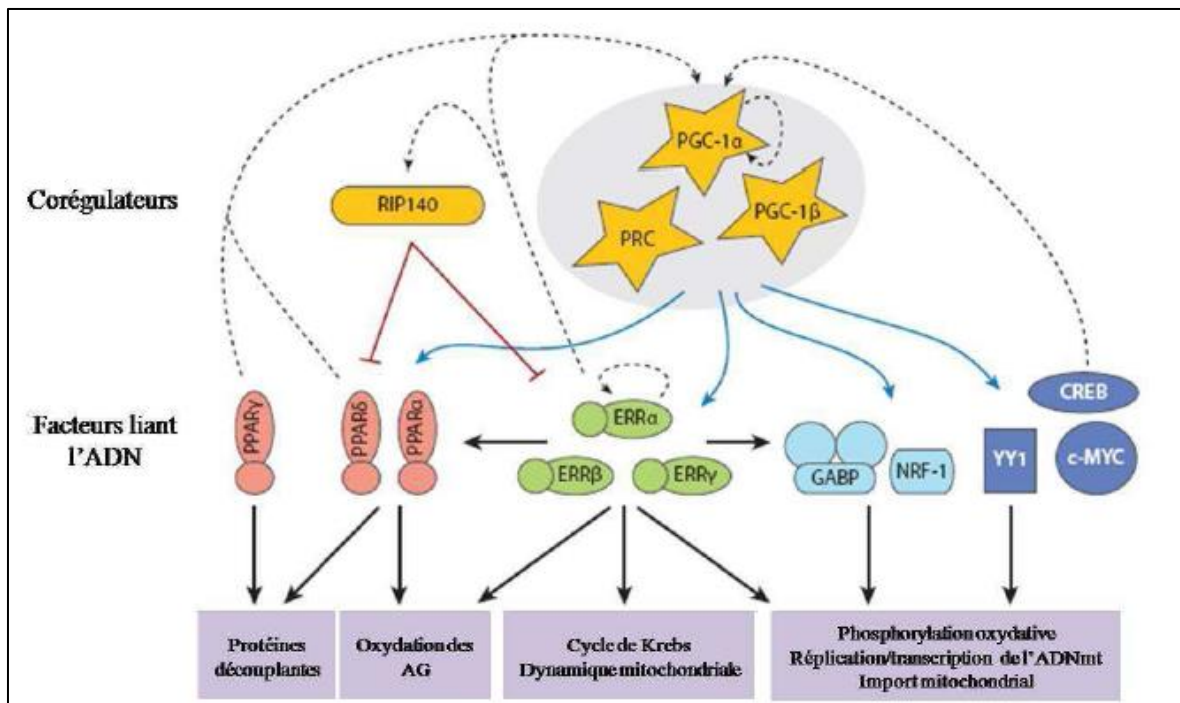


Figure I7 : Réseau transcriptionnel contrôlant le métabolisme mitochondrial

Les facteurs de transcription (PPARs, ERRs, GABP, NRF-1, CREB, YY1, c-MYC) régulent de nombreux gènes codant pour des protéines de la mitochondrie (flèches pleines noires). Les niveaux d'expression et d'activité de ces facteurs dans différents tissus ou en réponse à des signaux peuvent donner naissance à des mitochondries ayant des fonctions spécialisées. Les corégulateurs (PGC-1 α , PGC-1 β , PRC) interagissent avec de multiples facteurs de transcription pour coordonner la régulation de nombreuses classes de gènes codant pour des protéines mitochondriales (les flèches bleues indiquent les coactivations et les flèches rouges les corépressions). Les niveaux d'expression et d'activité de ces corégulateurs sont des déterminants majeurs de la biogenèse mitochondriale. Plusieurs boucles d'autorégulation ou de rétrocontrôle (flèches pointillées) contrôlent l'activité de ce réseau. (D'après Hock et Kralli, 2009).

ADNmt : ADN mitochondrial ; AG : acides gras ; CREB : cAMP Response-Element Binding protein ; ERR : Estrogen-Related Receptor ; GABP : GA-Binding Protein ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor-1 ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; PGC-1 : PPAR α Coactivator-1 ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140 ; YY1 : Yin Yang 1.

C : La biogénèse mitochondriale :

La biogénèse mitochondriale, qui peut être décrite comme la croissance et la division de mitochondries déjà présentes, est influencée par des facteurs environnementaux, tels l'effort physique, le jeûne, les basses températures, le stress oxydatif et la division cellulaire (Jornayvaz et Shulman, 2010). Cette biogénèse implique plusieurs processus, incluant la formation de la double membrane, l'importation de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire (la vaste majorité), la synthèse d'une minorité de protéines (13), mais néanmoins essentielles, codées par l'ADNmt et la réplication du génome mitochondrial (Shutt et Shadel, 2010). La biogénèse mitochondriale nécessite donc une expression coordonnée des deux génomes, régulée par des facteurs de transcription nucléaires agissant de manière très hiérarchisée. L'équipe de Scarpulla (Evans et Scarpulla, 1989 ; Scarpulla, 2006 ; Scarpulla, 2008a) a été la première à décrire ces différents acteurs et leurs différents niveaux de régulation. Ils ont mis en évidence un ensemble de facteurs de transcription nucléaire, NRF-1 et -2 (*Nuclear Respiratory factor 1* et 2) responsables de la synthèse de sous-unité de la chaîne respiratoire. Ils ont ensuite montré que ces facteurs contrôlaient indirectement l'expression du génome mitochondrial en induisant celle des facteurs de transcription mitochondriaux, *tfam*, *tfb1m* et *tfb2m* (respectivement *Transcription Factor A/B1/B2 Mitochondrial*). Un nouveau niveau de régulation a été élucidé avec la découverte de coactivateurs nucléaires capables de réguler la transcription des facteurs de transcription préalablement cités, ceux-ci appartenant à la famille PGC1 (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator 1*) et mis en évidence d'abord chez la souris (Puigservier *et al.*, 1998) puis chez l'homme (Esterbauer *et al.*, 1999).

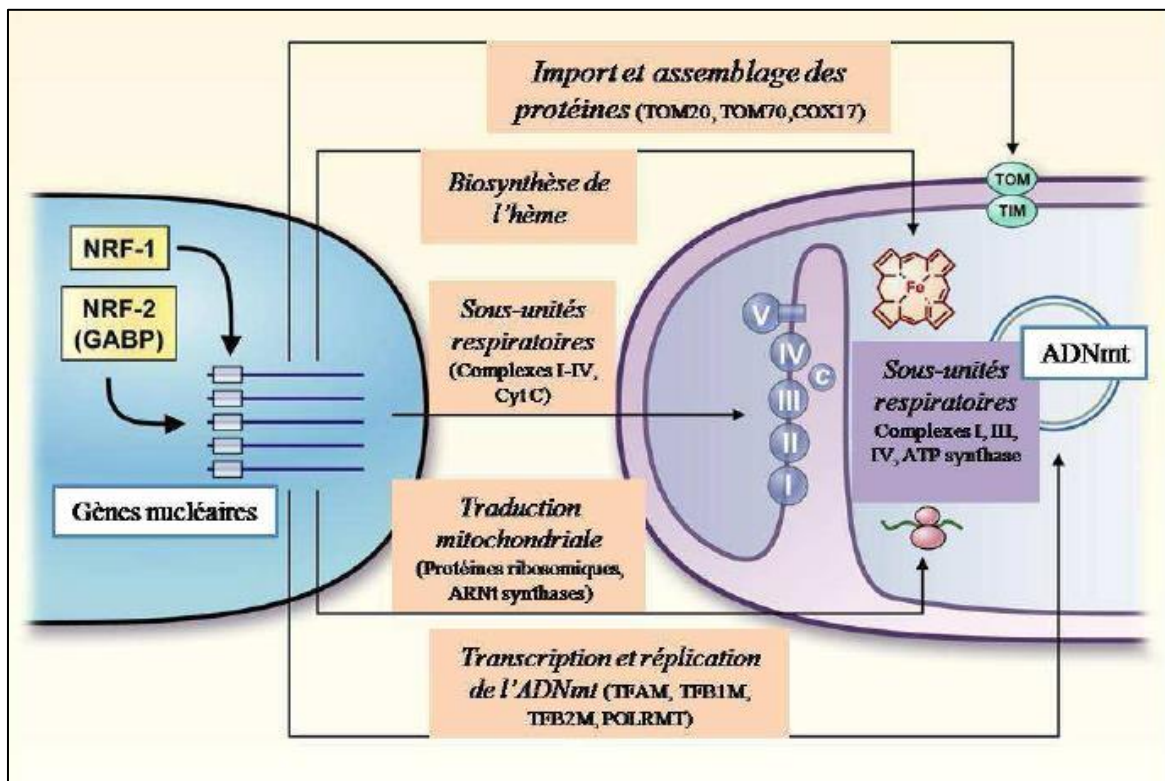


Figure I8 : Contrôle nucléaire des fonctions mitochondriales par NRF-1 et NRF-2.

Les NRFs contribuent directement et indirectement à l'expression de nombreux gènes nécessaires pour la maintenance et le fonctionnement de l'appareil respiratoire mitochondrial. Les NRFs agissent sur des gènes codant pour le cytochrome c, la majorité des sous-unités nucléaires des complexes de la chaîne respiratoire et l'enzyme limitante de la biosynthèse de l'hème, la 5-aminolevulinate. De plus, les NRFs induisent l'expression de facteurs clés de la machinerie de transcription et de traduction qui sont nécessaires pour la production des sous-unités respiratoires codées par le génome mitochondrial. Parmi eux, TFAM, TFB1M, TFB2M et de nombreuses protéines ribosomiques et ARNt synthases. Les NRFs sont également impliqués dans l'expression de facteurs clés de la machinerie d'import et d'assemblage des protéines. (D'après Scarpulla, 2008a).

ADNmt : ADN mitochondrial ; COX17 : sous-unité 17 de la Cytochrome c OXYdase ; CytC : Cytochrome c ; GABP : GA-Binding Protein ; NRFs : Nuclear Respiratory Factors ; POLRMT : POLymerase (RNA) MiTochondrial ; TFAM : Transcription Factor A, Mitochondrial ; TFB1/2M : Transcription Factor B1/2, Mitochondrial ; TIM : Translocase of the Inner Membrane ; TOM : Translocase of the Outer Membrane.

1 : Régulation transcriptionnelle au niveau nucléaire

Le premier niveau de régulation est assuré par des facteurs de transcription nucléaires qui gouvernent l'expression coordonnée des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale. Parmi eux, on peut trouver les facteurs NRFs (1 et 2), ERR α , CREB, PPARs (γ et δ), YY1, c-MYC et Sp1 (figure 17).

1.1 Nuclear Respiratory Factors (NRFs)

1.1.1 NRF-1

L'étude d'un site palindromique de fixation sur le promoteur du gène codant le cytochrome c a permis à l'équipe de Scarpulla (Evans et Scarpulla, 1989) de mettre en évidence le facteur de transcription NRF-1 (figure 18). L'année suivante, ils établissent que ce site de liaison est présent sur le promoteur de nombreux gènes impliqués dans la mise en place et le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Evans et Scarpulla, 1990). Ce site correspond à un domaine unique de liaison à l'ADN, reconnu par NRF-1 sous forme homodimérique et régulant positivement la transcription (Scarpulla, 2008b). En plus d'être au centre de la régulation de la chaîne respiratoire (Scarpulla, 2002), NRF-1 participe également à la coordination de l'expression des génomes mitochondriaux et nucléaires au travers de l'expression de régulateurs de la transcription mitochondriale, *tfam*, *tfb1m*, *tfb2m*, de celui de l'ARN polymérase mitochondriale (*polrmt*) (Gleyzer *et al.*, 2005), mais aussi celle des transporteurs mitochondriaux ou bien encore celle des protéines ribosomales mitochondriales (Scarpulla, 2008a). L'inhibition de NRF-1 conduit à une diminution de l'expression des gènes cibles, suggérant que ce facteur est constitutif et important pour une expression basale des protéines mitochondriales (Cam *et al.*, 2004 ; Dhar *et al.*, 2008). *In vivo*, il a été montré que l'expression de NRF-1 était induite pendant l'exercice chez le rat (Murakami *et al.*, 1998) ou bien en réponse à une concentration accrue de calcium dans des myotubes en culture (Ojuka *et al.*, 2003).

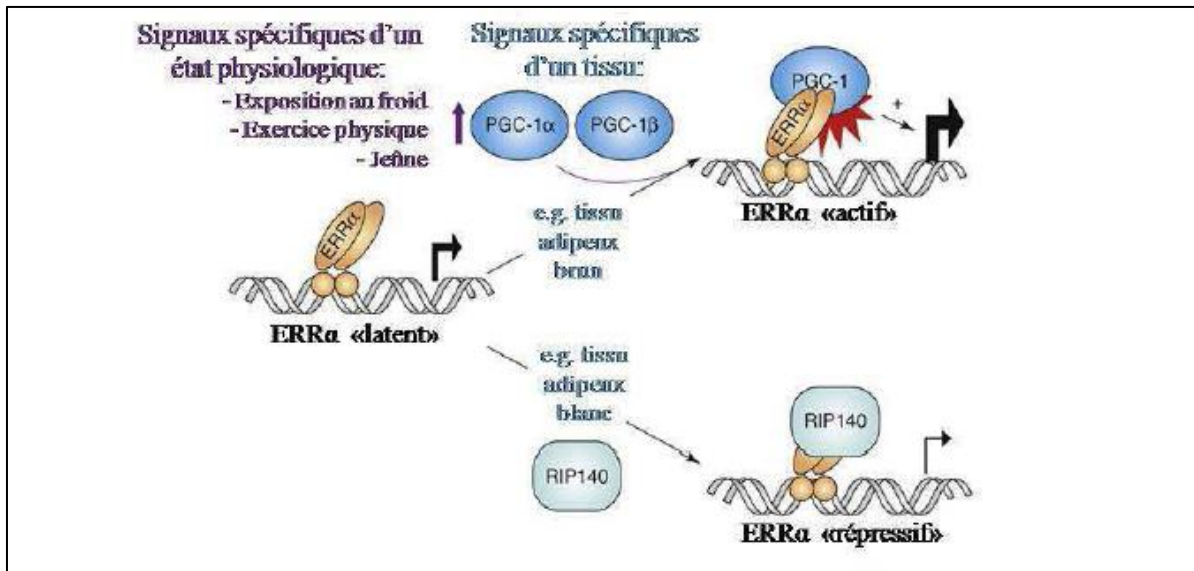


Figure I9 : Régulation d'ERRα par des interactions protéine-protéine avec des corégulateurs.

La capacité d'ERRα à moduler l'expression de gènes est contrôlée par son association avec des corégulateurs tels que les coactivateurs PGC-1α et PGC-1β et le corépresseur RIP140. En conséquence, l'activité d'ERRα est régulée par les signaux, spécifiques du tissu et de l'état physiologique, qui contrôlent le niveau d'expression et l'activité de ces corégulateurs. (D'après Villena et Kralli, 2008).

ERRα: Estrogen-Related Receptor α ; PGC-1 : PPARγ Coactivator-1 ; RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140.

1.1.2 NRF-2

NRF-2 (aussi nommé GABP) a également été identifié par l'équipe de Scarpulla (Virbasius *et al.*, 1993) comme un activateur du promoteur de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase (figure I8). NRF-2 agit sous forme d'hétérodimère ou d'hétérotétramère, avec une sous-unité α assurant la liaison à l'ADN qui va s'associer à des sous-unités possédant un domaine d'activation de la transcription (β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2). Les séquences cibles de NRF-2 ont été identifiées sur les promoteurs de nombreux gènes mitochondriaux, incluant des composants de la chaîne respiratoire, des protéines d'importation mitochondriale et les facteurs de transcriptions mitochondriaux (Scarpulla, 2008b ; Hock et Kralli, 2009). L'invalidation de GABP α dans des cellules entraîne une expression réduite des dix gènes *Cox* codés par le noyau ainsi que *Tfam* et *Tfb1m*, affectant ainsi de 20% l'activité de la cytochrome oxydase (Ongwijitwat *et al.*, 2006). NRF-2 est régulé par des signaux de développement ou physiologiques affectant la biogénèse mitochondriale (Ristevski *et al.*, 2004).

1.2 Estrogen-Related Receptors (ERRs)

Les récepteurs orphelins ERR α , ERR β et ERR γ appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Comme leur nom l'indique, ces facteurs présentent des similarités avec les séquences des récepteurs aux œstrogènes, surtout au niveau des domaines de liaison à l'ADN. Malgré cela, ils ne sont pas activés par les œstrogènes et leur activation se fait sans ligand spécifique (Greschik *et al.*, 2002 ; Kallen *et al.*, 2004) mais plutôt au travers de coactivateurs de la famille SRC et PGC-1 (Villena et Kralli, 2008) ou des corépresseurs, comme RIP140 (*Receptor-Interacting Protein 140*) (Giguère, 2008) (figure I9). Associé aux coactivateurs de la famille PGC-1, ERR α devient un puissant facteur de transcription (Huss *et al.*, 2002 ; Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010), mais associé à RIP140, il réprime la transcription (White *et al.*, 2008). Les ERRs, sont aussi régulés par la phosphorylation et la sumoylation (liaison covalente de protéines SUMO), affectant la liaison à l'ADN, la dimérisation et l'interaction avec les coactivateurs (Giguère, 2008). Ces facteurs de transcription sont actifs sous

forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères en se liant à l'ADN au niveau des ERREs (*ERR Response Element*), présents au niveau des promoteurs de nombreux gènes impliqués dans le système OXPHOS ou régulés par PGC1- α , et souvent associés aux sites cibles de NRF-1 et NRF-2 (Mootha *et al.*, 2004 ; Huss *et al.*, 2004). L'expression d'une protéine chimère ERR α -VP16, ne nécessitant ni PGC-1 α ni PGC-1 β pour être active, peut seule induire l'expression de protéines de la biogénèse mitochondriale, ce qui suggère que les cibles des ERRs jouent un rôle central dans la fonction mitochondriale (Schreiber *et al.*, 2004). Parmi ces cibles, on peut citer des protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras, le cycle de l'acide citrique, la fonction OXPHOS et l'expression du génome mitochondriale (Giguère, 2008).

1.3 Peroxysome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides. PPAR α et PPAR δ régulent principalement l'oxydation lipidique, tandis que PPAR γ contrôle la synthèse et le stockage. Ces trois récepteurs ont une distribution tissulaire et des fonctions physiologiques bien distinctes, PPAR α se retrouve fortement dans le foie, le cœur et le tissu brun (Evans *et al.*, 2004), PPAR δ dans le muscle squelettique et le cœur (Burkart *et al.*, 2007) et PPAR γ dans le tissu adipeux (Evans *et al.*, 2004). Ces récepteurs forment des hétérodimères avec le récepteur X des rétinoïdes (RXRs) pour contrôler l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et l'oxydation des acides gras. Ils permettent l'adaptation des mitochondries aux besoins énergétiques et métaboliques (Hock et Kralli, 2009) et sont directement intégrés à la régulation de la biogénèse et des fonctions mitochondriales via les coactivateurs de la famille PGC-1, avec lesquels ils interagissent physiquement pour induire leur activité transcriptionnelle (Vega *et al.*, 2000).

1.4 cAMP Response Element Binding (CREB)

La protéine CREB régule l'expression du gène codant pour le cytochrome c. Des sites de liaisons de CREB ont également été trouvés sur les promoteurs des gènes *Cox5a*, *Cox8a*, *Idh3g*, *Nnt* et *Ucp1* (Scarpulla, 2008b). L'augmentation du signal AMPc est associée à des changements de la demande en énergie, et CREB intervient sur la fonction mitochondriale en agissant, d'une part directement sur l'expression de gènes cibles mitochondriaux, et d'autre part indirectement en induisant l'expression de PGC-1 α ou de PRC (Herzig *et al.*, 2001 ; Vercauteren *et al.*, 2006).

1.5 Yin-Yang 1 (YY1)

YY1 a été identifié comme régulateur de l'expression de gènes de la cytochrome oxydase à la fois de manière positive et négative (Basu *et al.*, 1997 ; Scarpulla, 2008b). Associé à PGC-1 α , YY1 augmente l'expression des gènes mitochondriaux et de la respiration cellulaire (Cunningham *et al.*, 2007). Cette interaction nécessite l'activité de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) suggérant que ce facteur intègre les informations de deux voies de signalisation : PGC-1 α , qui relaie les signaux de baisse de l'état énergétique de la cellule (Gerhart-Hines *et al.*, 2007 ; Jager *et al.*, 2007), et mTOR, qui favorise la croissance cellulaire. Des souris KO pour YY1 présentent, comme celles KO pour *nrf-1* et *nrf-2*, une létalité embryonnaire précoce (Donohoe *et al.*, 1999).

1.6 C-Myc

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p sont des effecteurs de la voie de signalisation rétrograde, un mécanisme permettant de détecter des dysfonctionnements mitochondriaux et d'initier des réajustements du métabolisme des glucides et de l'azote (Erol, 2005). Rtg3p est séquestré dans le cytoplasme avec la protéine Rtg1p jusqu'à activation de la voie rétrograde par, entre autres, Rtg2p, ce qui induit une translocation du complexe Rtg1p/Rtg3p au noyau où ils vont agir comme facteur de transcription. La protéine MYC présente une homologie fonctionnelle avec Rtg3p de levure. Elle est impliquée dans

la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la progression du cycle cellulaire, la régulation de la glycolyse, la réponse au stress et l'apoptose.

Un nombre croissant d'études rapporte l'influence du facteur c-Myc comme un régulateur de l'expression des gènes mitochondriaux (Scarpulla, 2008b). Ce facteur possède de nombreux sites cibles dans la région promotrice du gène codant pour *nrf-1* induisant l'expression du cytochrome c et indirectement celle de gènes cibles de NRF-1. Récemment, il a été montré que PRC et c-Myc étaient co-exprimés en cas d'apoptose induite (Gleyzer et Scarpulla, 2013), suggérant une potentielle régulation fonctionnelle entre ces deux facteurs dans la médiation de la réponse au stress cellulaire.

1.7 Specificity protein 1 (Sp1)

Ce facteur de transcription générale permet une activité maximale de plusieurs promoteurs, dont celui du cytochrome c (Evans et Scarpulla, 1989), et est donc impliqué dans le contrôle de la biogénèse mitochondriale et de la fonction OXPHOS (Freyssenet *et al.*, 2004 ; Kraft *et al.*, 2006).

2 : Régulation transcriptionnelle au niveau mitochondrial

Les molécules d'ADNmt sont composées de deux brins : le lourd ou H (*Heavy*) et le léger ou L (*Light*) du fait de leur densité en gradient de chlorure de césium, le brin lourd étant riche en guanine. Cet ADNmt est également compact avec une absence d'intron et la seule région non-codante contient les éléments de contrôle de la réplication et de la transcription (Shadel et Clayton, 1997). Chez l'homme, chaque brin ne contient qu'une seule région promotrice de la transcription, le LSP (*light-strand promotor*) pour le brin léger et le HSP (*High-strand promotor*) pour le brin lourd avec deux sites d'initiation (H1 et H2) sur lesquels viendront se fixer le facteur Tfam. La transcription produit pour chacun d'entre eux, un précurseur ARN polycistronique qui sera ensuite clivé pour former les différentes molécules d'ARNm, d'ARNr et d'ARNt spécifiques de la mitochondrie. La

mitochondrie contient son propre système enzymatique responsable de la réplication de l'ADNmt et de sa transcription, différent de celui du noyau (Falkenberg *et al.*, 2007).

La protéine TFAM contient deux domaines en tandem, les HMG (*High Mobility Group*), permettant la fixation à l'ADN, séparés l'un de l'autre par 27 acides aminés et suivis en position C-terminale par une queue de 25 résidus. L'analyse de protéines TFAM mutantes a révélé que cette dernière région était importante pour la reconnaissance spécifique de l'ADN et essentielle pour l'activation de la transcription (Dairaghi *et al.*, 1995b). Les niveaux de TFAM régulent directement l'activité de transcription de l'ADNmt par les complexes entre facteurs de transcription et polymérase : TFB1M/POLRMT et TFB2M/POLRMT (Falkenberg *et al.*, 2002). En effet, la fixation de TFAM introduit des changements de conformation de l'ADNmt, déroulant la région promotrice et facilitant ainsi l'initiation de la transcription (Dairaghi *et al.*, 1995a). Deux autres facteurs participent à la régulation transcriptionnelle de l'ADNmt.

Le facteur TFB1M humain est une protéine avec une double fonction, la transcription de l'ADNmt et une activité d'ARNr méthyltransférase (Seidel-Rogol *et al.*, 2003). Des mutations ponctuelles sur les motifs conservés de méthyltransférase de TFB1M n'affectent pas la transcription *in vitro* (McCulloch et Shadel, 2003). TFB2M possède également une activité d'ARNr méthyltransférase mais plus efficiente que le facteur précédent (Cotney et Shadel, 2006). Il a été suggéré que TFB2M ait évolué en se spécialisant comme facteur de transcription dans les mitochondries de mammifères (Rantanen *et al.*, 2003). Pour conforter cette théorie, il a été démontré que cette protéine a une activité transcriptionnelle plus importante que TFB1M *in vitro* (Falkenberg *et al.*, 2002).

Contrairement à l'ARN polymérase T7 de phage, POLRMT ne peut interagir avec le promoteur et initié la transcription seule. Elle nécessite l'assistance de TFAM ou de l'une des isoformes de TFBM (McCulloch *et al.*, 2002).

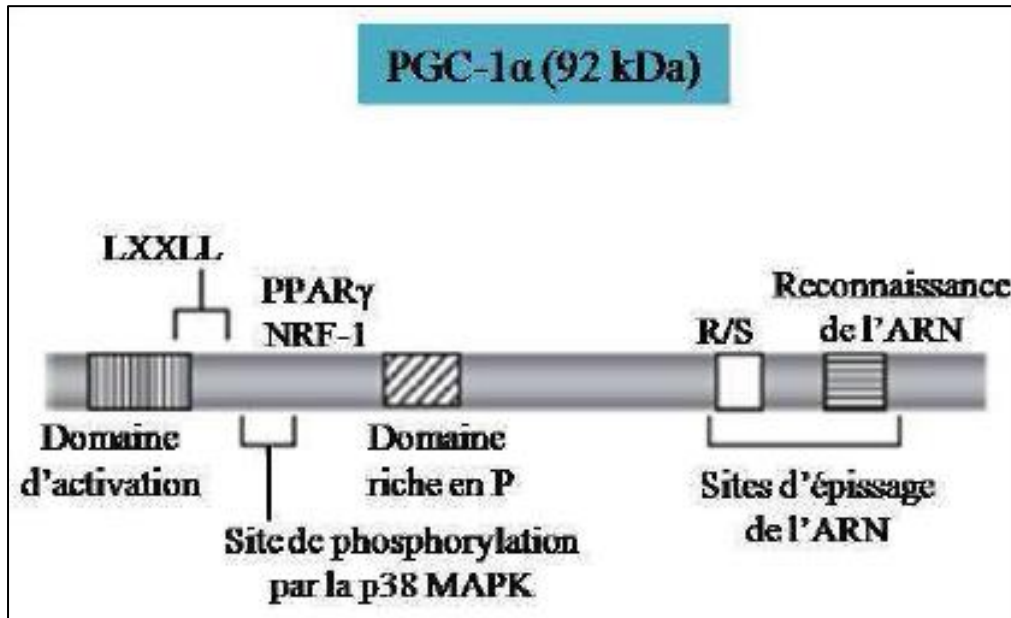


Figure I10 : Domaines fonctionnels de la protéine PGC-1 α .

Cette représentation linéaire de PGC-1 α indique les domaines fonctionnels clés de la protéine. Le domaine d'activation NH₂-terminal (hachures verticales) est le site d'interactions avec les cofacteurs modifiant les histones tels que SRC-1 et CBP/p300. Les positions approximatives pour l'interaction avec PPAR γ et NRF-1 ainsi que la région centrale riche en prolines (P) (hachures diagonales) et le domaine COOH-terminal, comprenant le domaine riche en arginines et en sérines (R/S) et le motif de reconnaissance de l'ARN (hachures horizontales), sont indiqués. Les régions contenant les sites de phosphorylation par la protéine p38 MAPK et le motif LXXLL, site d'interactions protéiques, sont également inscrites. (D'après Scarpulla, 2008a).

CBP : CREB Binding Protein ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor 1 ; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; PGC-1 α : PPAR γ Coactivator-1 α ; SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator 1.

Enfin, des études *in vitro et in vivo*, ont montré que le facteur mTERF (Mitochondrial transfection TERmination Factor) avait différents rôles et n'était pas limité au contrôle de la terminaison de la transcription, mais également dans son initiation et la réplication de l'ADNmt (Roberti *et al.*, 2009).

3 : La famille de coactivateurs PGC-1

Les recherches sur un niveau d'intégration supplémentaire dans la régulation transcriptionnelle nucléaire de la biogenèse mitochondriale ont été lancées après la découverte d'un coactivateur nucléaire PGC-1 α , membre d'une famille de corégulateurs nucléaires (Puigserver *et al.*, 1998 ; Esterbauer *et al.*, 1999). Les corégulateurs forment de gros complexes multiprotéiques, dans lesquels au lieu de se lier à l'ADN, ils vont présenter les récepteurs nucléaires aux facteurs de transcription et ainsi moduler leur potentiel transcriptionnel. Cette modulation est permise en favorisant des interactions requises pour induire ou réprimer l'expression d'un gène, celles-ci incluent des modifications allostériques des liaisons à l'ADN par les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription, des remodelages de la chromatine et l'initiation de la transcription (O'Malley et Kumar, 2009). Trois coactivateurs ont été identifiés dans cette famille : PGC-1 α , PGC-1 β et PRC (*PGC-1 Related Coactivator*).

3.1 PGC-1 α

Il s'agit du membre fondateur de cette famille de coactivateurs transcriptionnels. Ses nombreuses similarités structurelles avec PGC-1 β ont été attribuées à un éventail de fonctions biologiques proches voire semblables. L'identification de PGC-1 α a été la première fois réalisée lors de son activation pendant l'adaptation thermogénique du tissu adipeux brun et sa liaison au récepteur PPAR γ , d'abord chez la souris (Puigserver *et al.*, 1998), puis chez l'Homme (Esterbauer *et al.*, 1999). Il ne possède pas d'activité propre de remodelage des histones, mais, par l'intermédiaire d'un puissant domaine d'activation en position N-terminale, il va interagir avec des cofacteurs liés au remodelage de la chromatine. D'autres domaines fonctionnels ont été référencés (Scarpulla, 2008a),

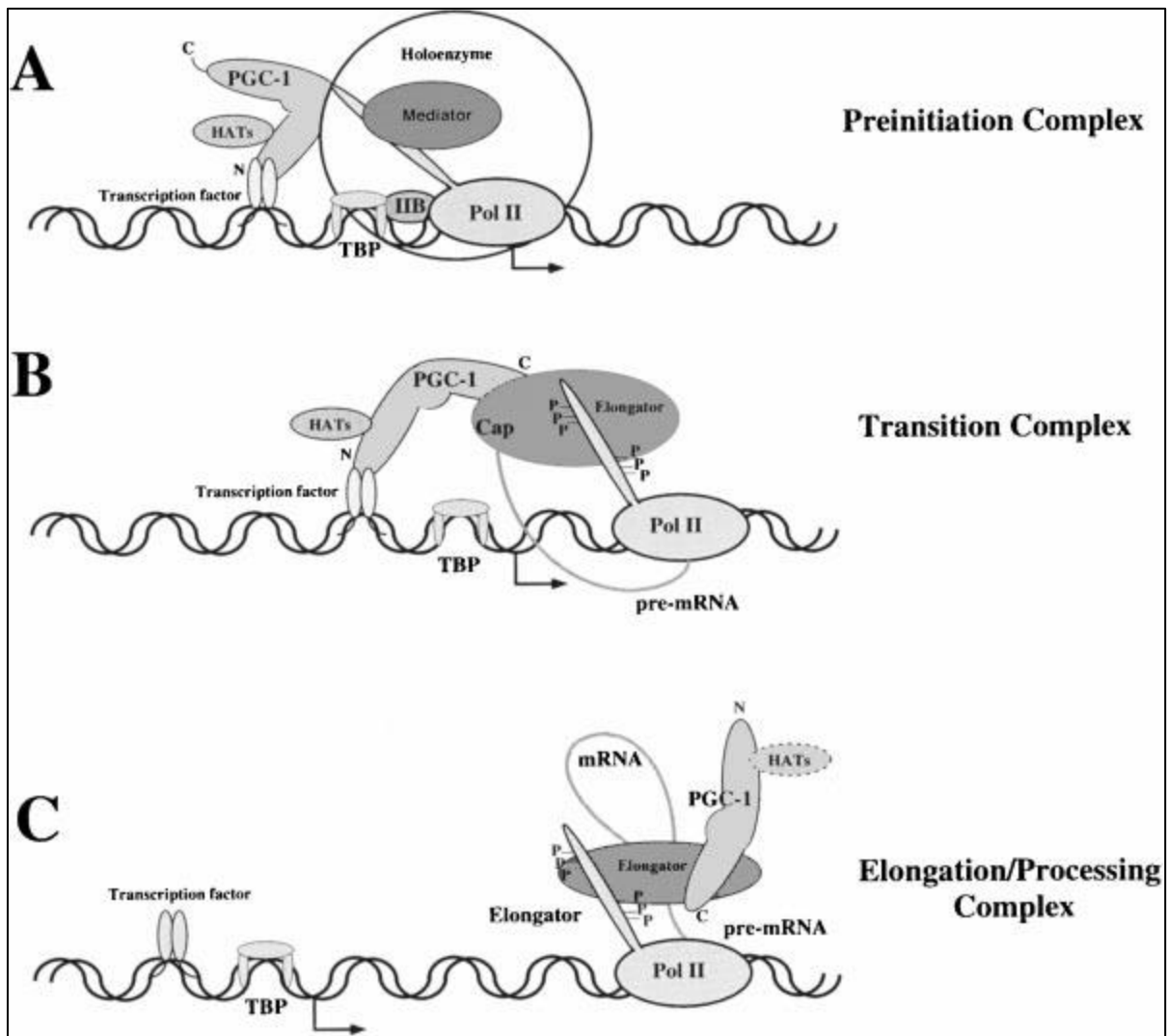


Figure I11 : Représentation schématique du mode d'action de PGC-1 α .

En premier lieu (A), PGC-1 α est pris en charge par des facteurs de transcription spécifiques et associé au complexe de pré-initiation (PIC). La transcription est initiée (B), le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Pol II) est phosphorylé, et un ensemble de protéines s'associe à lui, PGC-1 α inclus via la région C-terminale. Le complexe d'élongation (C) contenant PGC-1 α assure une régulation coordonnée de la synthèse de l'ARNm (D'après Monsalve *et al.*, 2000). TBP (*TATA-Binding Protein*); HAT (*Histone Acetyl Transferase*).

comme le motif LXXLL adjacent au domaine d'activation reconnu par certains récepteurs nucléaires (PPAR α ou le récepteur β aux hormones thyroïdiennes), un domaine en position C-terminale riche en sérines et en arginines ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN (figure I10) qui permettrait l'épissage de l'ARN pré-messager (figure I11) (Monsalve *et al.*, 2000). PGC-1 α possède de nombreuses cibles d'interactions parmi lesquelles des facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires aux hormones, certains sont directement impliqués dans la régulation de la fonction mitochondriale (NRF-1, ERR α , YY1 ou PPAR α). L'expression de PGC-1 α peut être régulée par plusieurs voies de signalisation (figure I12). L'élévation du niveau d'AMPc, observable lors de l'adaptation thermogénique due au froid, conduit à une activation de CREB via sa phosphorylation par une protéine kinase A (PKA). Le promoteur de PGC-1 α possède un élément de réponse à l'AMPc (CRE : *cAMP Response Element*) cible de la transcription par CREB (Herzig *et al.*, 2001 ; Cannon et Nedergaard, 2004 ; Cao *et al.*, 2004). La carence énergétique, liée entre autre à l'exercice, entraîne une diminution des ratios intracellulaire ATP/AMP et NADH/NAD⁺ et une activation de la transcription de PGC-1 α . Cette dernière peut être liée soit à la phosphorylation de ses résidus sérines et thréonines par une AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) (Steinberg *et al.*, 2009), soit à la désacétylation multiple de résidus lysines par SIRT1, une désacétylase NAD⁺ dépendante (Gerhart-Hines *et al.*, 2007).

Comme vu précédemment, PGC-1 α tient un rôle important dans la thermogénèse adaptative, et donc dans la biogenèse mitochondriale, comme le prouve la surexpression de son ARNm dans le tissu adipeux brun après exposition au froid (Puigserver *et al.*, 1998). Ces observations sont appuyées par des expériences de gain de fonction sur cultures cellulaires (Wu *et al.*, 1999) et sur souris transgéniques (Lehman *et al.*, 2000). En culture, l'expression ectopique de PGC-1 α augmente les niveaux des protéines COXIV et cytochrome c tout comme le niveau d'ADNmt. Chez la souris transgénique, une surexpression spécifique cardiaque montre une élévation importante du contenu

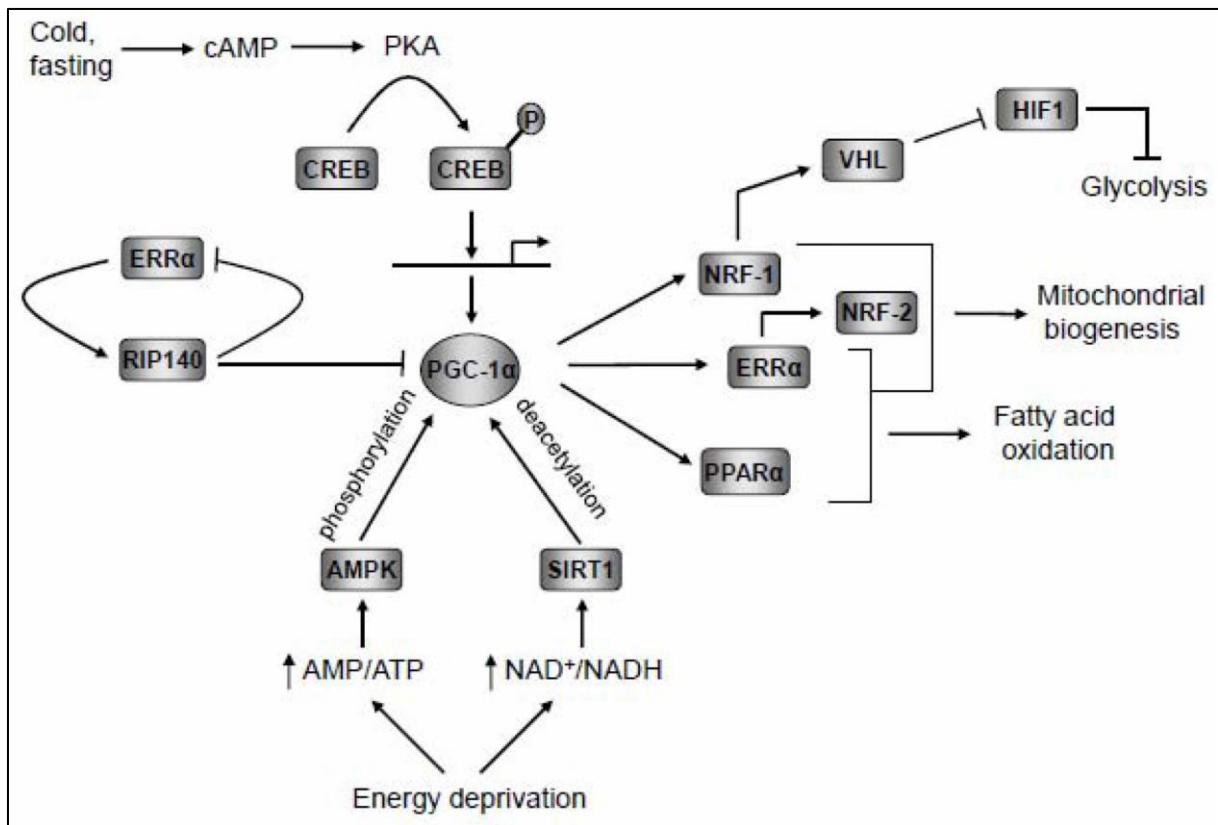


Figure I12 : Réseau de régulation gouvernant les fonctions mitochondriales orchestrées par PGC-1 α .

Ce diagramme résume la régulation de PGC-1 α par voie transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle et ses interactions avec une partie de ses facteurs de transcriptions cibles impliqués dans la régulation métabolique. La répression de la glycolyse par le contrôle de l'expression du suppresseur de tumeurs VHL et le contrôle négatif de l'expression du corépresseur RIP-140 sont également indiqués (D'après Scarpulla, 2011).

mitochondrial des cardiomyocytes. Ce coactivateur permet l'expression indirecte de *tfam*, *tfb1m* et *tfb2m* au travers NRF-1 et NRF-2 entraînant ainsi une transcription accrue de l'ADNmt (Gleyzer *et al.*, 2005). Il est également associé au fonctionnement oxydatif mitochondrial en permettant l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et de synthèse des hèmes. En effet, la fixation sur le motif LXXLL de PPAR α active les promoteurs PPAR α -dépendant, entraînant l'expression des enzymes impliquées dans la β -oxydation lipidiques (Vega *et al.*, 2000). PGC-1 α est donc un coactivateur capable d'intégrer les activités de nombreux facteurs de transcription responsable de la fonction oxydative et de la biogenèse mitochondriale. En 2009, l'équipe de Zhang Y. a mis en évidence un épissage alternatif de l'ARNm de PGC1- α conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée du coactivateur perdant les domaines impliqués dans sa localisation nucléaire, son interaction avec les facteurs de transcription et la dégradation protéique. Ils proposent que l'unique fonction de ce coactivateur tronqué est de produire un ensemble de réponses dépendant du contexte cellulaire qui compléterait, remplacerait ou prolongerait l'action de PGC-1 α . Ceci représente un nouveau composant et un niveau additionnel de complexité des voies de signalisations assurant la réponse adaptative des tissus métaboliquement actifs (Zhang *et al.*, 2009b).

3.2 PGC-1 β

Il s'agit d'un homologue de PGC-1 α avec lequel il partage de nombreuses similarités de séquences (Kressler *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2002), comme le domaine d'activation N-terminal, le motif LXXLL et le domaine de reconnaissance de l'ARN C-terminal. Cependant, il est dénué du domaine riche en arginines et en sérines associé à l'épissage de l'ARNm (Monsalve *et al.*, 2000). Ces deux coactivateurs sont enrichis dans les tissus présentant un nombre important de mitochondries tel le cœur, le muscle squelettique ou encore le tissu adipeux brun, même si dans ce dernier cas, la transcription de PGC-1 β n'est pas induite par l'exposition au froid (Kressler *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2002). Du fait de son incapacité à interagir avec le récepteur HNF-4 α (*Hepatic Nuclear Factor 4 α*) et

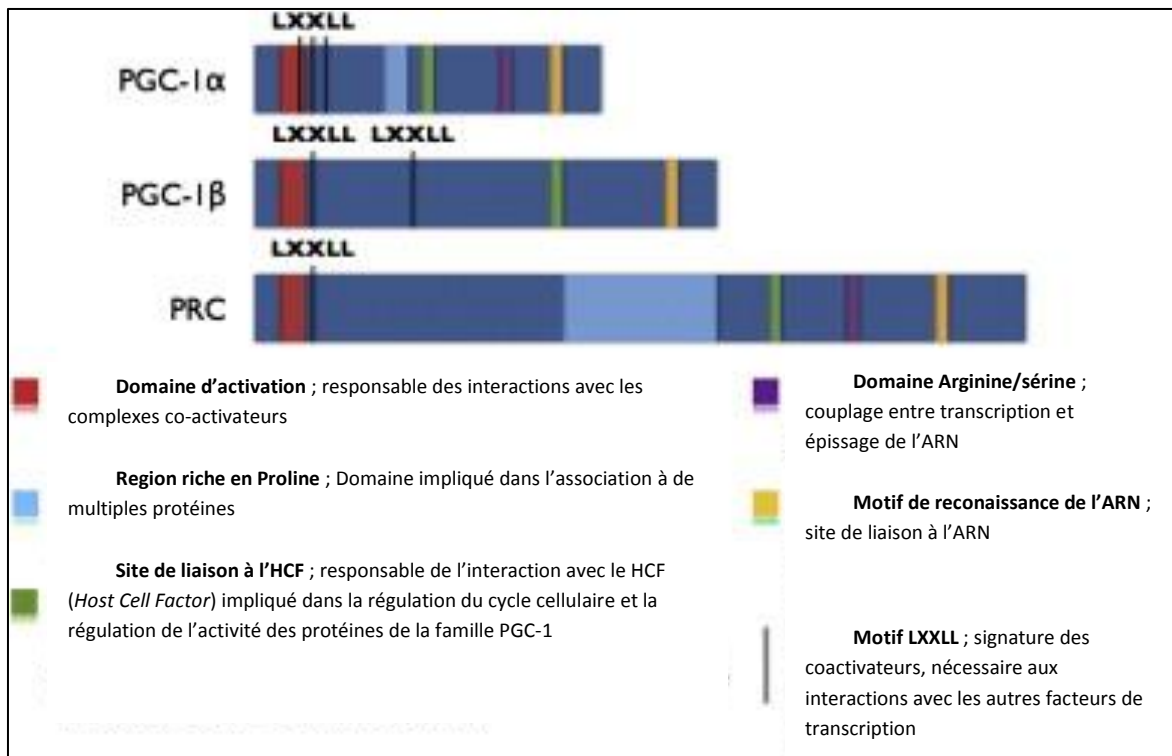


Figure I13 : Comparaison des motifs conservés entre les différents membres de la famille de coactivateurs PGC-1. (D'après Jones *et al.*, 2011)

du facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead transcription factor O1*), il constitue un faible inducteur de l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse hépatique (Meirhaeghe *et al.*, 2003). Cependant, il est proche de PGC-1 α dans ses interactions fonctionnelles avec NRF-1 et sa capacité à induire l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la respiration et dans la biogenèse mitochondriale (Lin *et al.*, 2003). Malgré ces similarités fonctionnelles, PGC-1 β entraîne un meilleur couplage de la respiration que PGC-1 α , du fait d'une moindre fuite de protons (St-Pierre *et al.*, 2003). Une surexpression de PGC-1 β dans des cellules de muscle squelettique murin, entraîne un accroissement de la biogenèse mitochondriale, liée à la fois au génome mitochondrial et au génome nucléaire (Arany *et al.*, 2007). Cette biogenèse résulte de l'activation de facteurs de transcription tels qu'ERR α et PPAR α .

3.3 PRC (PGC-1 related coactivator)

L'équipe de Scarpulla a pu identifier un membre additionnel de la famille PGC-1 capable de répondre à des signaux alternatifs de régulation (Andersson et Scarpulla, 2001). Une étude des similarités avec PGC-1 α a mis en évidence le domaine riche en sérines et arginines en position C-terminale et le motif de reconnaissance à l'ARN (Andersson et Scarpulla, 2001). Le clonage de l'intégralité de l'ADNc révèle d'autres motifs conservés intégrés dans des séquences différentes. Ceci inclut le domaine d'activation N-terminal et le motif LXXLL, signature des coactivateurs de récepteurs nucléaires. La conservation de la position et de la séquence de ces motifs suggère fortement des fonctions communes, la protéine issue de l'expression de cet ADNc est appelé PRC (Andersson et Scarpulla, 2001).

PRC est semblable aux autres membres dans sa liaison à des facteurs de transcription nucléaire associés à la régulation des fonctions mitochondriales tels NRF-1, CREB et ERR α (figure I13) (Vercauteren *et al.*, 2006 ; Vercauteren *et al.*, 2008). Des immunoprécipitations confirment que des anticorps dirigés contre PRC peuvent précipiter NRF-1 et CREB dans des extraits cellulaires, indiquant

que ces molécules sont certainement associées *in vivo* (Andersson et Scarpulla, 2001 ; Vercauteren *et al.*, 2006 ; Vercauteren *et al.*, 2008). En plus du motif de reconnaissance de l'ARN et du domaine riche en arginines et sérines, PRC et PGC-1 α partagent un domaine d'activation transcriptionnelle très puissant requis pour la *trans*-activation NRF-1 dépendant par PRC. PRC *trans*-active donc un grand nombre de gènes nucléaires requis pour la fonction respiratoire mitochondriale incluant le cytochrome c, la 5-aminolévulinate synthase (ou ALA synthase), *tfam* et les isoformes de *tfbm* (Gleyzer *et al.*, 2005). PRC cible également les sites de reconnaissance de NRF-2 et CREB pour, respectivement, activer les promoteurs du facteur *tfbm* et du cytochrome c (Gleyzer *et al.*, 2005). PRC, comme PGC-1 α , en complexe avec NRF-2 et HCF-1 (*Host Cell factor 1*), une importante protéine associée à la chromatine, induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Vercauteren *et al.*, 2006).

Malgré ces similarités avec les autres membres de la famille, PRC possède également d'importantes différences ciblant des fonctions biologiques bien distinctes. Chez la souris, PGC-1 α est abondamment exprimé dans les tissus demandeurs en énergie comme le cœur ou le rein (Puigserver *et al.*, 1998). Contrairement à PRC (Andersson et Scarpulla, 2001), l'expression de l'ARNm de PGC-1 α est aussi induite dans le tissu adipeux brun après exposition au froid et liée à son rôle dans la thermogénèse, alors que celle de PRC ne présente qu'une légère induction dans ces conditions. Cependant l'expression de PRC est importante dans les cellules prolifératives contrairement à celles où la croissance est arrêtée par absence de sérum ou inhibition de contact (Vercauteren *et al.*, 2006). Cette étude a également montré que l'ajout de sérum dans des cellules quiescentes induit l'activité de PRC sans synthèse *de novo* de protéines, ce qui montre une induction rapide via les facteurs déjà présents. En effet, son induction par du sérum est associée à un profil d'expression similaire à celui observé en réponse à une forte activité de PGC-1 α . Ceci inclut l'expression de *tfam*, *tfb1m* et d'ARNm nucléaires ou mitochondriaux codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire (Scarpulla,

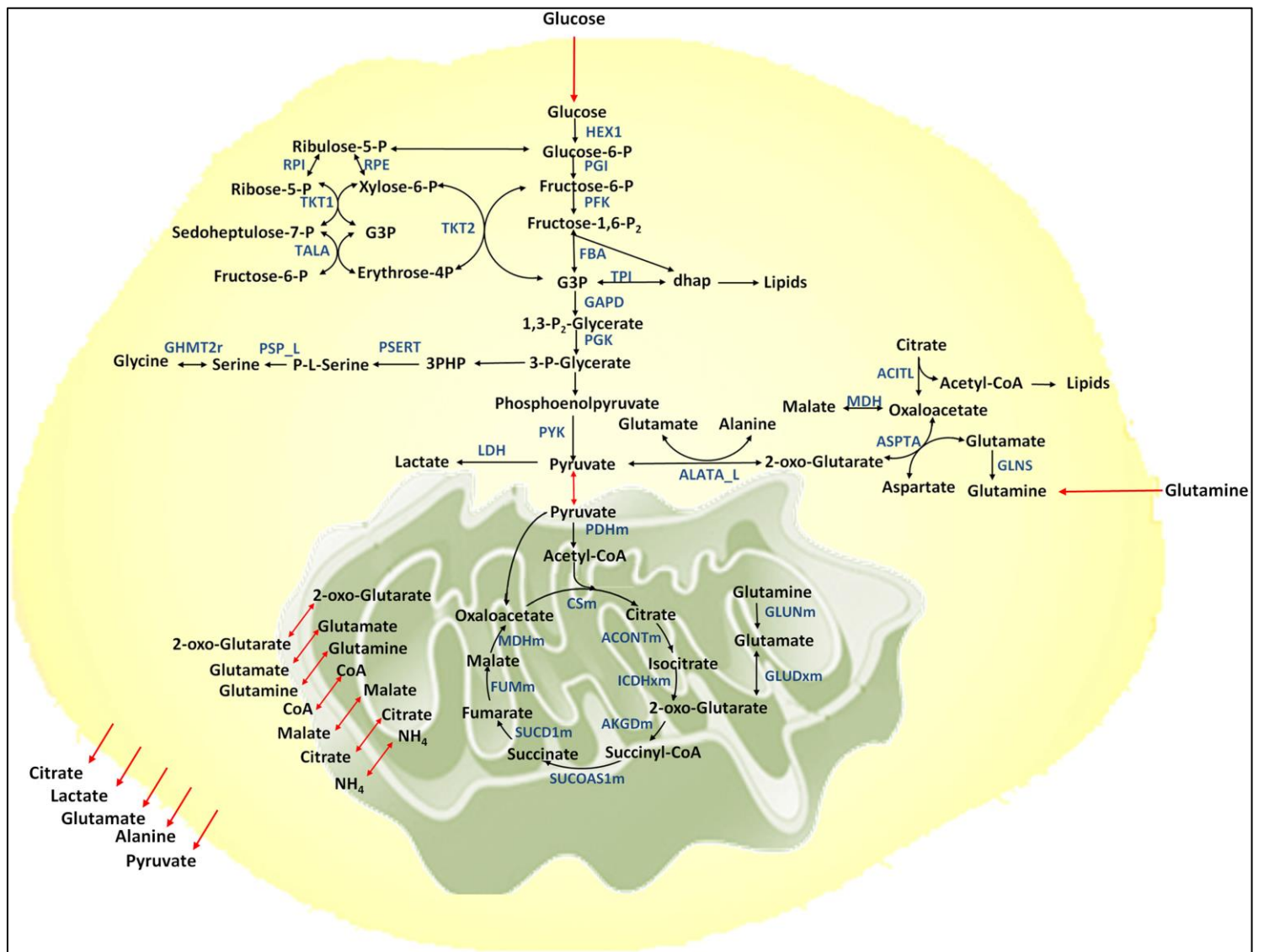


Figure I14 : Métabolisme du Glucose :

Les réactions métaboliques sont représentées par des flèches noires, les réactions de transport entre les différents compartiments par des flèches rouges et les enzymes impliquées apparaissent en bleu (D'après Khazaei *et al.*, 2012).

2008a). L'inhibition de l'expression de PRC par shRNA (*short hairpin RNA*), dans des ostéosarcomes U2OS où l'expression de PGC-1 α est absente, entraîne une diminution de la croissance des cellules. Ceci est accompagné d'une baisse de l'expression à la fois des gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la biogenèse de la chaîne respiratoire (Vercauteren *et al.*, 2009). Au contraire, des niveaux élevés de PRC, NRF-1 et TFAM sont présents dans les tumeurs oncocytaires thyroïdiennes et accompagnés d'une augmentation de l'activité cytochrome oxydase et du contenu en ADNmt (Savagner *et al.*, 2003). Tout ceci fait de PRC, le seul coactivateur transcriptionnel connu comme régulateur de la croissance cellulaire et mitochondriale, suggérant une intégration par PRC de l'expression de la chaîne respiratoire selon les phases du cycle cellulaire (Scarpulla, 2011).

D : Métabolisme Energétique et cancer:

Dans les années 1920, Otto Warburg mis en évidence que les cellules cancéreuses produisaient préférentiellement leur énergie sous forme d'ATP par la voie de la glycolyse plutôt que via le cycle de Krebs (Warburg *et al.*, 1924 ; Warburg, 1956), et ce même en présence d'oxygène moléculaire. De nombreuses études ont tenté d'expliquer ce métabolisme tumoral, mais seules les récentes avancées en matière de séquençage haut-débit ont permis d'identifier les nombreuses mutations conduisant à la tumorigenèse (Stratton *et al.*, 2009). Il y a en effet de nombreux point de mutations, de translocations, d'amplifications et de délétions qui peuvent contribuer au développement d'un cancer, et ces changements mutationnels peuvent varier entre tumeurs histopathologiquement identiques. Les analyses bio-informatiques suggèrent que des mutations reliées à des profils cancéreux affectent plusieurs voies de signalisation et des mécanismes importants conduisant à la tumorigenèse (Parsons *et al.*, 2008). Il apparaît donc que des altérations dans certaines voies métaboliques sont essentielles au développement de tumeurs malignes. De récentes études montrent que les cellules tumorales sont capables de changer de voies métaboliques afin de faciliter

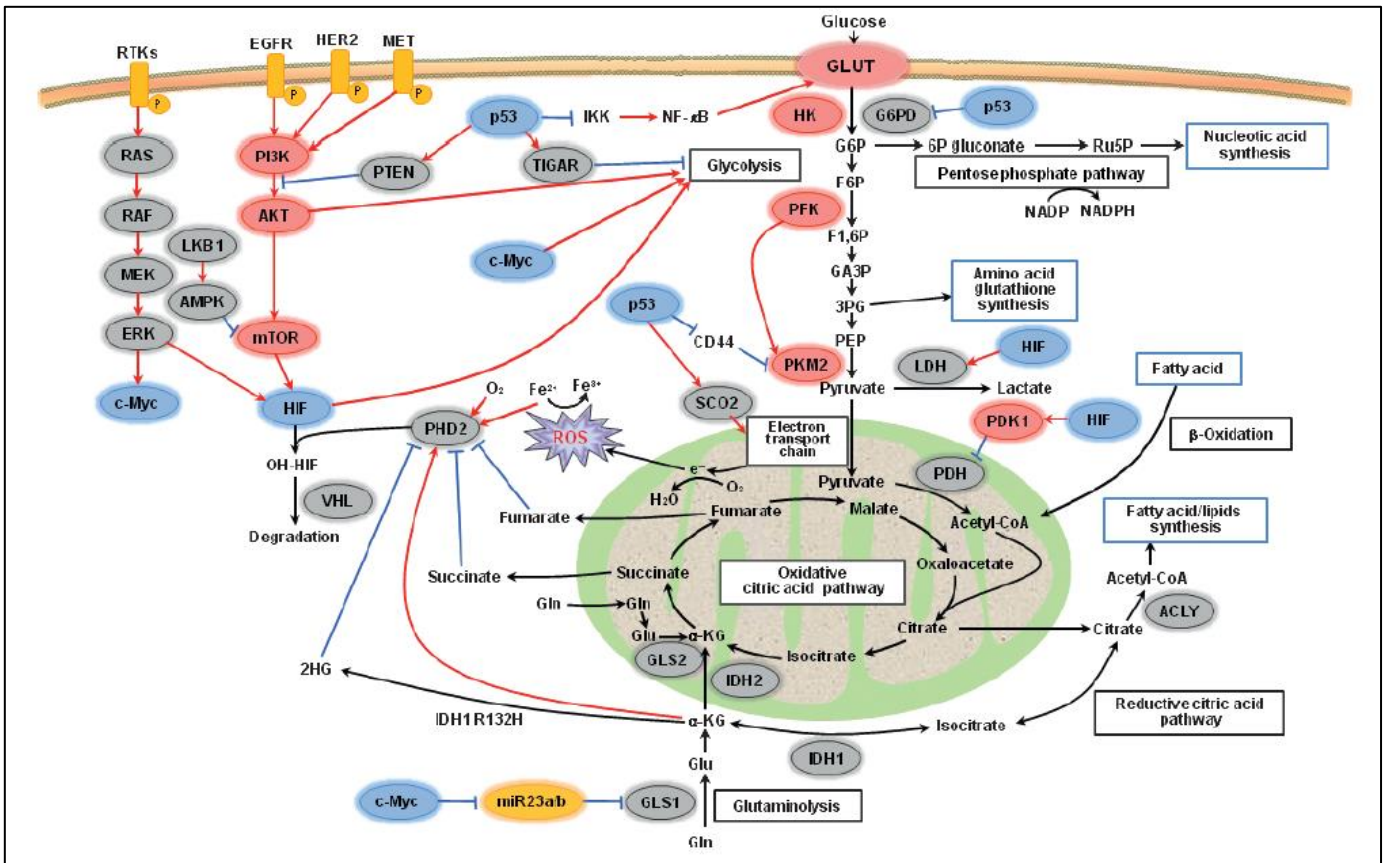


Figure I15 :Réseau de signalisation et de régulation du métabolisme dans les cellules cancéreuses :

Le schéma inclut la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, la glutaminolyse, la voie de biosynthèse des acides gras et les voies de signalisation PI3K et RAS-MAPK. Les trois facteurs de transcription HIF-1, c-Myc et p53 sont les facteurs clés de la régulation coordonnée du métabolisme des cellules cancéreuses de ces différentes voies (D'après Soga *et al.*, 2012).

2HG (2-hydroxyglutarate) ; 3PG (3-phospho-glycerate) ; 6P gluconate (6-phospho-gluconate) ; α -KG (α -cétoglutamate) ; ACLY (acetyl-CoA by ATP-citrate lyase) ; AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue) ; AMPK (AMP-activated protein kinase) ; CD44, est une glycoprotéine ; EGFR (epidermal growth factor receptor) ; F1,6P (fructose-1,6-bisphosphate) ; F6P (fructose-6-phosphate) ; G6P (glucose-6-phosphate) ; G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) ; Gln (glutamine) ; GLS (glutaminase) ; Glu (Glutamate) ; GLUT (Glucose Transporter) ; HER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) ; HIF (hypoxia-inducible factor) ; HK (hexokinase) ; IDH (isocitrate déshydrogénase) ; IKK, (nuclear factor- κ light-chain-enhancer of activated B cells Kinase) ; LDH (lactate déshydrogénase) ; LKB1 (liver kinase B1) ; MET (hepatocyte growth factor receptor) ; mTOR (mammalian target of rapamycin) ; NF- κ B, (nuclear factor- κ light-chain-enhancer of activated B cells kinase) ; OH (hydroxyle) ; P (phosphate) ; PDH (pyruvate déshydrogénase) ; PEP (phosphoénolpyruvate) ; PFK (phosphofructokinase) ; PHD2 (prolyl hydroxylase 2) ; PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) ; PKM2 (pyruvate kinase isozyme type 2) ; PTEN (phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10) ; RAF (regulation of alpha-fetoprotein) ; RAS (rat sarcoma virus peptide) ; ROS (reactive oxygen species) ; RTK (receptor tyrosine kinases) ; Ru5P (ribulose-5-phosphate) ; SCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2) ; TCA (tricarboxylic acid) ; TIGAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator) ; VHL (von Hippel–Lindau tumor suppressor).

l'absorption et l'incorporation des nutriments, comme les nucléotides, les acides aminés et les lipides, nécessaires à la prolifération cellulaire (Vander *et al.*, 2009). En présence d'oxygène, la plupart des cellules métabolisent principalement le glucose en pyruvate au cours de la glycolyse et oxyde ensuite la majeure partie de ce pyruvate en dioxyde de carbone au sein du cycle de Krebs de la mitochondrie (Ward et Thompson, 2012). Durant ce processus, la phosphorylation oxydative va générer 34 molécules d'ATP par métabolisation complète d'une molécule de glucose, contre 2 molécules d'ATP pour la glycolyse (figure I14).

1 : Effet Warburg

L'une des caractéristiques marquante pour une croissance rapide des cellules tumorales consiste en leur capacité à soutenir de forts taux de glycolyse génératrice d'ATP, et ce, sans tenir compte de la disponibilité en oxygène. Ce phénomène est connu comme effet Warburg, ou glycolyse aérobie (Warburg, 1956 ; Pedersen, 1978 ; Bustamente et Pedersen, 1977). Cette caractéristique semble être une propriété générale des tumeurs malignes indépendamment de leur origine carcinogénique (Bustamente *et al.*, 1981). Une activation significative de la glycolyse a été observée dans les tissus cancéreux humains grâce à des méthodes de profilage métabolique basées sur l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse (Hirayama *et al.*, 2009 ; Soga *et al.*, 2003). Cette réorientation métabolique de l'utilisation du glucose par la voie glycolytique confère à la cellule cancéreuse un avantage sélectif qui se définit, en pathologie, par la plus grande "agressivité" de ces tumeurs. Cette adaptation métabolique est d'ailleurs utilisée par les tissus sains lors des grands besoins de prolifération (renouvellement cellulaire et cicatrisation). La littérature récente montre que plusieurs facteurs de transcription et enzymes du métabolisme sont essentiels dans la médiation du comportement métabolique des cellules tumorales (figure I15) (Yeung *et al.*, 2008 ; Soga, 2012).

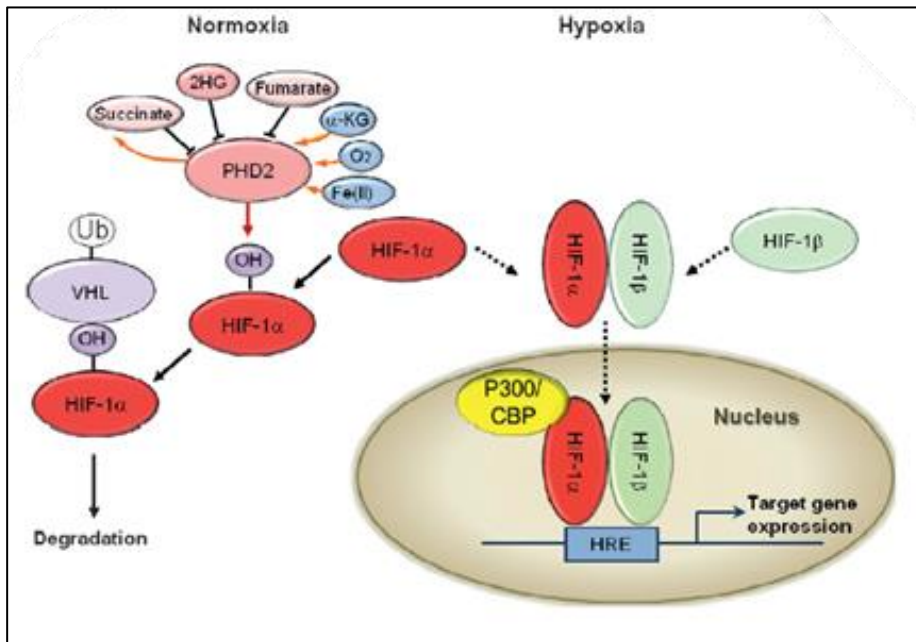


Figure I16: Régulation de HIF en conditions de normoxie ou d’hypoxie.

En conditions normales, la sous-unité HIF-1a est hydroxylée par PHD2, ce qui la rend susceptible de se lier au VHL, lui-même associé à de l’Ubiquitine, et d’être dégradé. Cependant, en conditions hypoxiques, PHD2 est supprimé, HIF-1a échappe donc à l’hydroxylation et s’accumule. HIF-1a se dimérise avec une sous-unité HIF-1b dans le noyau où ils vont recruter un facteur p300/CBP (*CREB-binding Protein*) et se lier à HRE. Ceci entraîne l’activation de la transcription des gènes cibles du facteur HIF-1 (D’après Soga *et al.*, 2012).

2HG : 2-hydroxyglutarate ; α-KG, α-cétoglutarate ; HIF : hypoxia-inducible factor ; HRE : hypoxia-response element ; OH : hydroxyle ; PHD2 : prolyl hydroxylase 2 ; Ub : ubiquitin ; VHL : von Hippel–Lindau tumor suppressor.

2 : Acteurs de la reprogrammation métabolique

2.1 HIF (Hypoxia-Inducible Factor)

Les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 sont des complexes hétérodimériques responsables des changements d'expression de certains gènes en conditions hypoxiques. Composés de la sous-unité constitutive HIF-1 β et, soit de la sous-unité HIF-1 α , soit de la sous-unité HIF-2 α , toutes deux rapidement exprimées en hypoxie ou en condition pseudohypoxique. L'expression de HIF-1 α est ubiquitaire tandis que celle de HIF-2 α est spécifique de l'endothélium, des poumons, des reins et des cellules hépatiques (Wiesener *et al.*, 2003). En condition normale d'oxygénation, HIF-1 α est hydroxylée par des prolyl hydroxylases (PHD) telles PHD-2 et ainsi reconnue par le suppresseur de tumeurs VHL (Von Hippel-Lindau), la ligase E3 de l'ubiquitine, en permettant sa dégradation au travers du protéasome (Cairns *et al.*, 2011).

En condition hypoxique, les PHDs sont inhibées, assurant un échappement de HIF-1 α à sa dégradation médiée par VHL et conduisant à la stabilisation de ce facteur et à son accumulation au niveau nucléaire (Schofield et Ratcliffe, 2004). Il va y avoir association avec la sous unité HIF-1 β et une activation de l'expression de gènes cibles (figure I16) par liaison au niveau des éléments de réponses à l'hypoxie (Brahimi-Horn *et al.*, 2001 ; Gordan *et al.*, 2007). La plupart des cellules cancéreuses sont exposées à des conditions hypoxiques dans les stades précoces de leur développement (Vaupel *et al.*, 1989), et certaines tumeurs présentent une forte hypoxie (Vaupel *et al.*, 2003), résultant en une activation de HIF-1 et, *in fine*, en l'expression des transporteurs du glucose (GLUT) et l'activation de la voie de la glycolyse. Une inactivation du suppresseur de tumeur VHL par mutation peut également conduire à ce phénotype et ce même en conditions de normoxie, principalement dans le glioblastome humain et le carcinome rénal (Ohh, 2006). Les métabolites du cycle de Krebs que sont le fumarate et le Succinate peuvent inhiber les PHD et l'hydroxylation d'HIF-1 α de manière compétitive (King *et al.*, 2006), conduisant également à une accumulation d'HIF-1

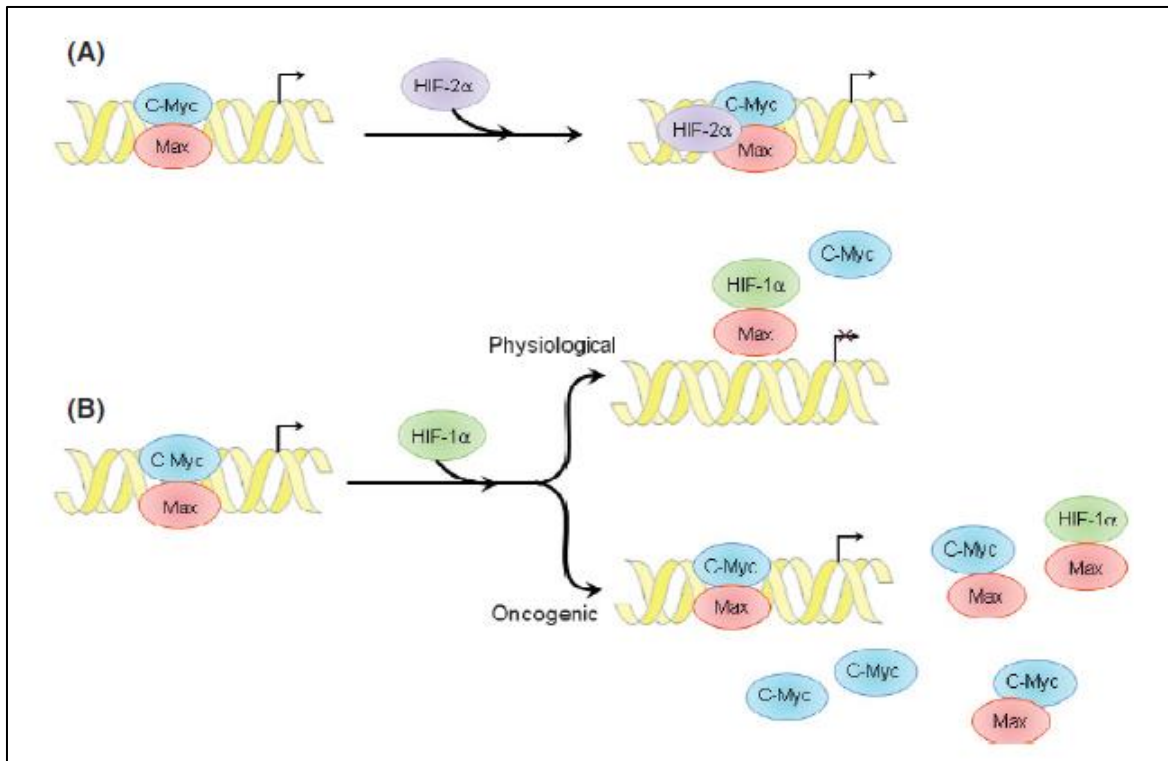


Figure I17: Réseau transcriptionnel d'HIF-1, HIF-2 et interactions protéine-protéine avec c-Myc.

(A) L'activation de la transcription par l'hétérodimère c-Myc/Max est accentuée grâce à la stabilisation du complexe par HIF-2a.

(B) Quand c-Myc est présent à des niveaux normaux, HIF-1a se lie à Max, ce qui inactive c-Myc et réduit donc l'expression de ses gènes cibles. Cependant, les cancers surexpriment c-Myc et ces hauts niveaux assurent un maintien du complexe c-Myc/Max capable de stimuler l'expression des gènes cibles (D'après Dang et al., 2008).

HIF: hypoxia-inducible factor ; Max: c-Myc-associated protein X.

avec les conséquences décrites ci-dessus. Cette accumulation de métabolites du cycle est associée à des mutations des sous-unités B, C et D de la Succinate déshydrogénase (SDH) et de la fumarate hydratase (FH) (Gottlieb et Tomlinson, 2005 ; Pollard et Ratcliffe, 2009). Les mutations de la SDH conduisent au développement de paragangliomes ou de phéochromocytomes (Rustin *et al.*, 2002) tandis que celles de la FH ont été retrouvées dans des léiomyomatoses, des léiomyosarcomes et des cancers du rein (Stewart *et al.*, 2008). HIF-1 est également capable d'inhiber le métabolisme oxydatif mitochondrial en augmentant l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) qui phosphoryle et inactive la pyruvate déshydrogénase (PDH), l'enzyme responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Semenza, 2012). HIF-1 active également l'expression de la lactate déshydrogénase A (LDHA) qui convertit le pyruvate en lactate, produit final de la glycolyse (Le *et al.*, 2010). L'activation d'HIF-1 contribue donc à l'orientation métabolique vers la glycolyse en induisant l'expression des transporteurs du glucose et de la plupart des enzymes glycolytiques.

2.2 c-Myc

c-Myc est un facteur de transcription de type hélice-boucle-hélice contenant un domaine LZ (*leucine zipper*) qui forme un hétérodimère avec MAX (*c-Myc Associated protein X*) au niveau du domaine LZ pour se lier sur une séquence consensus de l'ADN, CACGTG ou *E-box* (Blackwood *et al.*, 1992). En conditions normales, cet effecteur de la voie rétrograde voit son expression induite par des facteurs de croissance, mais dans les cellules transformées, son expression devient importante et constitutive (figure 117). Ces hauts niveaux de c-Myc entraînent une production accrue d'énergie et de molécules requises dans la prolifération, et ce, indépendamment des stimulations de facteurs de croissance (Yeung *et al.*, 2008). Comme HIF-1, c-Myc promeut la voie de la glycolyse en induisant l'expression de gènes tels des transporteurs du glucose, la pyruvate kinase ou la lactate déshydrogénase, ce qui conduit à la métabolisation du glucose en lactate (Osthus *et al.*, 2000).

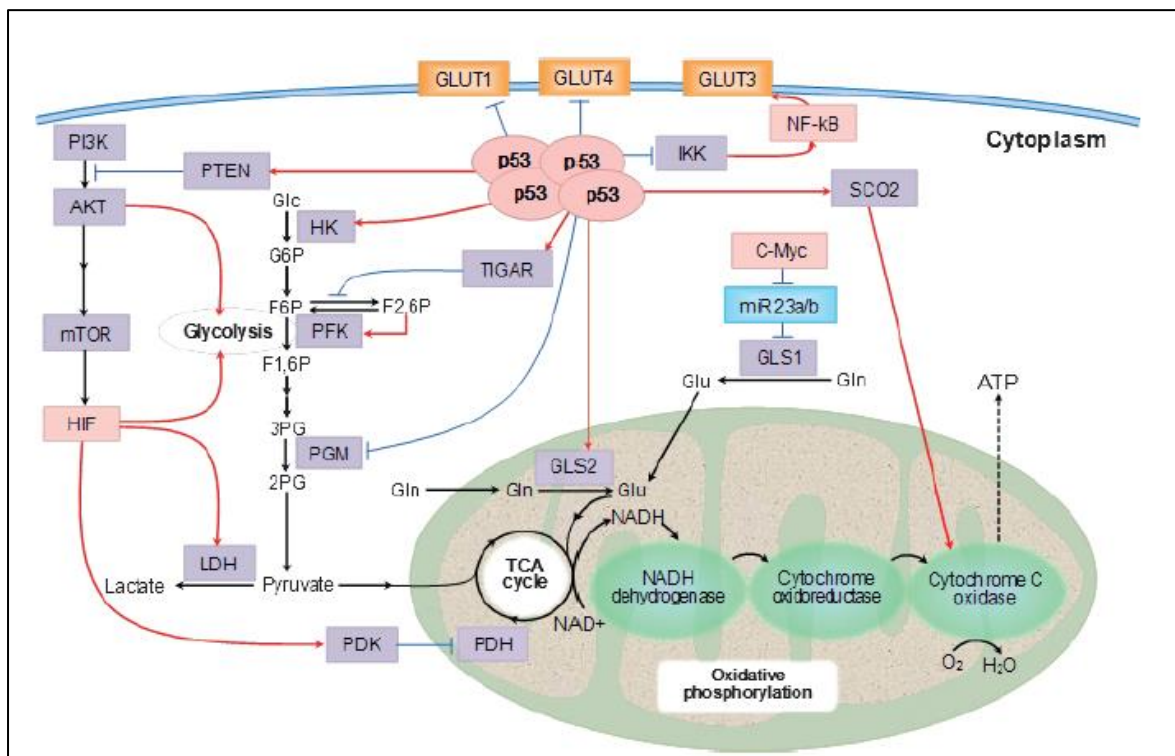


Figure I18: Régulation du métabolisme énergétique par p53:

De nombreuses fonctions de p53 réduisent la voie glycolytique ce qui accroît la voie de la phosphorylation oxydative et régule PTEN. A l'inverse, des mutations de p53 peuvent activer les transporteurs du glucose, la glycolyse et la voie de signalisation PI3K et inhiber la fonction OXPHOS (D'après Soga *et al.*, 2012).

2PG : 2-phospho-glycerate ; 3PG : 3-phospho-glycerate ; AKT : v-akt murine thymoma viral oncogene homologue ; F1,6P : fructose-1,6-bisphosphate ; F2,6P : fructose-2,6-bisphosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; Glc : glucose ; Gln : glutamine ; GLS : glutaminase ; Glu : glutamic acid ; GLUT : glucose transporter ; HIF : hypoxia-inducible factor ; HK : hexokinase ; IKK : IκB kinase ; LDH : lactate dehydrogenase ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; NF-κB, nuclear factor kappa B ; PDH : pyruvate dehydrogenase ; PDK : pyruvate dehydrogenase kinase ; PFK : phosphofructokinase ; PGM : phosphoglycerate mutase ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; PTEN : phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10 ; SC02 : synthesis of cytochrome c oxidase 2 ; TCA : tricarboxylic acid ; TIGAR : Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator.

2.3 p53

Le facteur de transcription et suppresseur de tumeurs p53 est connu pour son rôle dans l'induction de l'apoptose en cas de dommages irréversibles de l'ADN. Il joue également un rôle dans la régulation de la glycolyse et de la fonction OXPHOS (figure I18) (Vousden et Ryan, 2009 ; Soga, 2012).

Le facteur p53 inhibe l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4, et diminue celle de la phosphoglycérate mutase, enzyme convertissant le 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate (Kondoh *et al.*, 2005). Il régule également indirectement la glycolyse en diminuant l'expression de NF- κ B (*Nuclear Factor κ light-chain enhancer of activated B cells*), facteur contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse, ce qui entraîne entre autres la suppression de l'expression de GLUT3 (Kawauchi *et al.*, 2008). En parallèle, p53 induit l'expression de l'enzyme TIGAR (*Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) réduisant les niveaux de fructose-2,6-biphosphate, activateur de la phosphofructokinase (Pilkis *et al.*, 1981). Il augmente également la fonction OXPHOS en activant la synthèse de cytochrome c (Vousden et Ryan, 2009). Enfin, il induit l'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), inhibiteur de la voie de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) qui conduit à l'activation d'AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homologue 1*) et d'HIF, vecteurs importants de la glycolyse (Cairns *et al.*, 2011). Au niveau mitochondrial, la p53 cible également la Glutaminase 2 (GLS2), catalysant l'hydrolyse de la glutamine en glutamate, un des intermédiaires du cycle de Krebs (Hu *et al.*, 2010).

En conditions normales, p53 réduit donc l'utilisation de la voie de la glycolyse au profit de la phosphorylation oxydative (figure I18). Des mutations ou une suppression de l'expression de P53, évènement fréquent dans le cancer, résulte en une perte de sa fonction de contrôleur de la régulation métabolique (Johnson et Perkins, 2012). Les cellules cancéreuses exprimant un p53 mutant voient leur glycolyse augmentée de plusieurs façons: expression des transporteurs de glucose (GLUT1, GLUT3 et GLUT4), induction d'une enzyme glycolytique (phosphofructokinase),

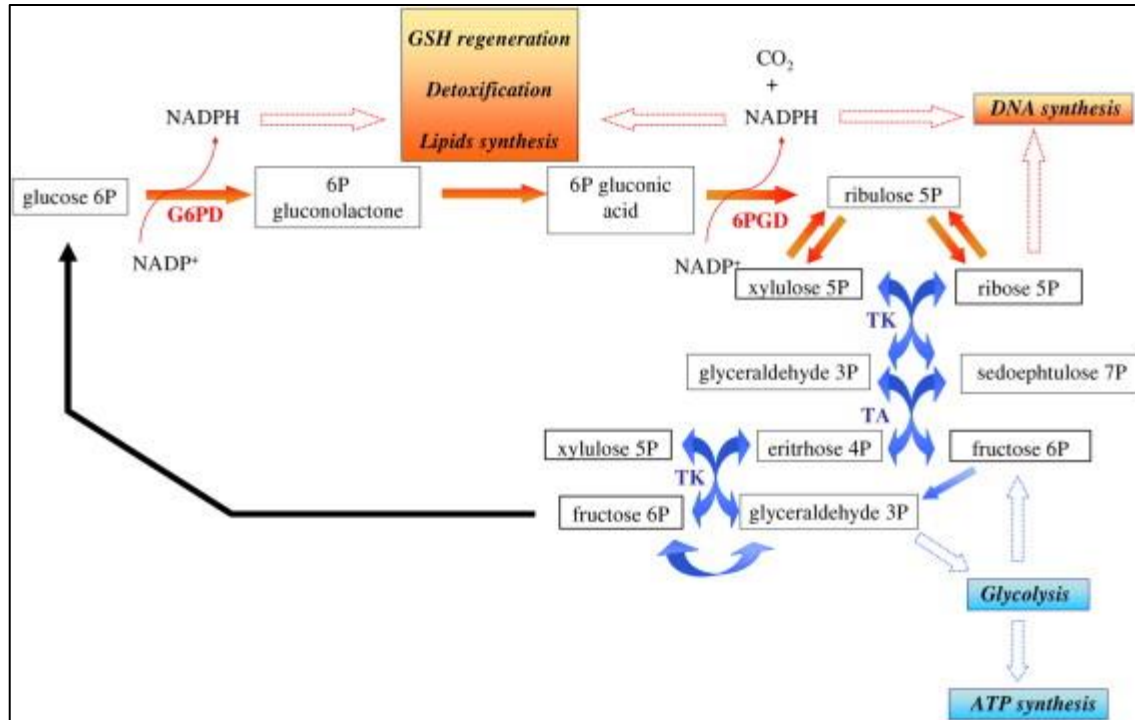


Figure I19: Représentation schématique des branches oxydatives et non-oxydatives de la voie des pentoses phosphates.

Dans la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates (flèches rouges), le G6P est oxydé et décarboxylé en Ri5P. Ce dernier est isomérisé en R5P, un composant essentiel de la synthèse des acides nucléiques. Deux molécules de NADPH, par molécule de G6P entrant dans la voie des pentoses phosphates, sont produites et utilisées comme équivalents réducteurs pour la synthèse de GSH par la glutathion réductase, celle des acides gras et stérols, ainsi que pour la détoxification de xénobiotiques et la synthèse d'ADN.

Dans la branche non-oxydative (flèches bleues), les pentoses phosphates subissent des réactions d'échanges réversible de deux et trois carbones pour finalement former du F6P et du G3P qui vont entrer dans la voie de la glycolyse afin d'être reconvertit en G6P ou bien oxydé pour répondre à une demande en ATP (D'après Riganti *et al.*, 2012).

P: phosphate ; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase ; 6PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase ; GSH: reduced glutathione ; TK: transketolase ; TA: transaldolase.

suppression de la respiration mitochondriale (inhibition GSL2 et cytochrome c) et activation des voies de signalisation AKT et HIF (Levine et Puzio-Kuter, 2010).

2.4 Voie des pentoses phosphates (PPP) et statut redox

La partie oxydative de cette voie assure la synthèse de ribose-5-phosphate (R5P) à partir du glucose-6-phosphate (G6P) et la production de NADPH à partir de NADP⁺ grâce à l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Mason *et al.*, 2007). En conditions normoxiques, ce R5P est métabolisé en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) dans la partie non-oxydative de la voie PPP, lui-même convertit en pyruvate par la glycolyse (Figure I19). Sa fonction première reste d'être le précurseur des acides nucléiques, et ce principalement lorsque la cellule entre en phase proliférative. La demande en pentose-phosphate est donc importante pour des cellules cancéreuses, pour lesquelles la voie PPP (*Pentose Phosphate Pathway*) produit près de 85% des pentoses incorporés dans l'ADN (Rais *et al.*, 1999). Le NADPH produit est un substrat limitant de la glutathion réductase (GSR), l'enzyme assurant la régénération du glutathion (GSH) qui permet le maintien du potentiel redox de la cellule.

Dans les cellules cancéreuses, la voie PPP permet donc d'approvisionner la cellule avec des équivalents réduits (NADPH), maintenant les niveaux de GSH, avec du R5P, utilisé pour synthétiser les acides nucléiques mais également avec des sources potentielles d'ATP sous la forme d'intermédiaires glycolytiques. Pour ces raisons, des cellules avec une voie PPP très active sont protégées contre le stress oxydatif et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Tian *et al.*, 1999), et présentent des avantages prolifératifs (Jonas *et al.*, 1992). Cette voie PPP va impacter le métabolisme tumorale à plusieurs niveaux (figure I20) (Riganti *et al.*, 2012).

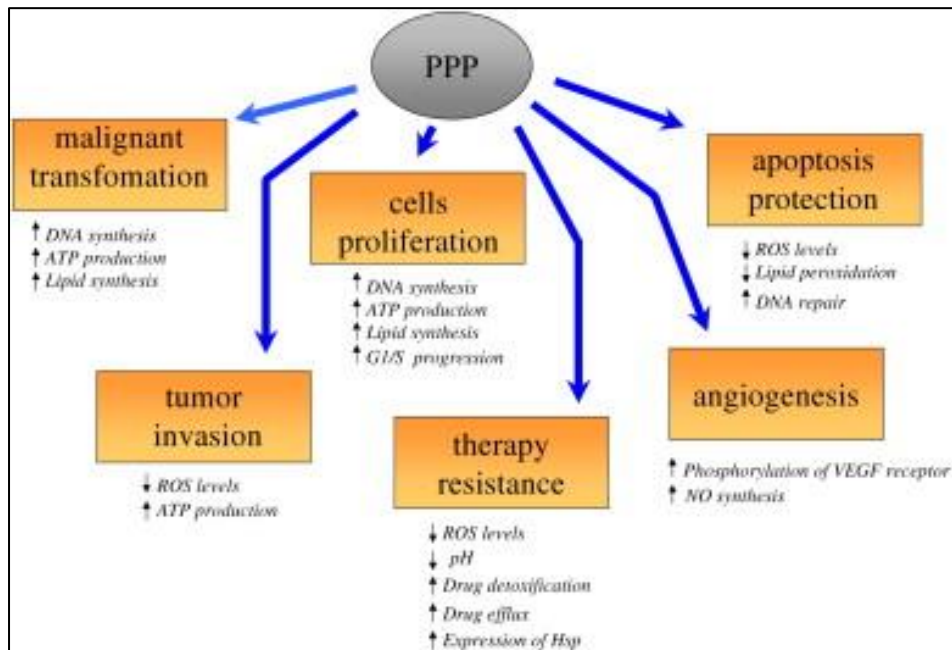


Figure I20: Effets de la voie des pentoses phosphates sur le métabolisme tumoral.

Une voie des pentoses phosphates active a de multiples effets sur le métabolisme tumoral, e.g elle accroît la transformation maligne, la prolifération et la progression de la tumeur, protège les cellules contre l'apoptose, favorise la migration de la tumeur et la formation de métastases, augmente l'angiogénèse et réduit la réponse aux thérapies anti-cancéreuses (D'après Riganti *et al.*, 2012).

PPP: pentose phosphate pathway ; ROS: reactive oxygen species ; VEGF: vascular endothelial growth factor ; NO: nitric oxide ; Hsp: heat shock protein.

2.5 PKM2, IDH, GLS et Fumarate

Plusieurs effecteurs de la reprogrammation métabolique sont également à signaler, la pyruvate kinase M2 (PKM2), l'isocrate déshydrogénase (IDH), la Glutaminase (GLS) et le fumarate (figure I15).

PKM2 est une enzyme qui catalyse la réaction finale de la glycolyse, convertissant le phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate, produisant par la même de l'ATP. Pour être active, elle doit former un tétramère qui requiert la présence de fructose-1,6-phosphate (Van Berkel *et al.*, 1974). Elle est retrouvée sous cette forme dans les tissus différenciés et les cellules en prolifération, tandis que dans les cancers, elle est présente sous forme dimérique, donc moins active. Ceci entraîne une accumulation d'intermédiaires glycolytiques redirigés vers les processus d'anabolisme impliqués dans la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides et des acides aminés, tous des éléments important pour des cellules très prolifératives comme les cellules cancéreuses (Ye *et al.*, 2012).

Dans les cellules, l'acétyl-coA est généré à partir du pyruvate grâce à l'action de la PDH au sein de la mitochondrie. Ce dernier ne peut rejoindre le cytosol sans conversion préalable en citrate avant d'être de nouveau métabolisé en acétyl-coA par l'ATP-citrate lyase (Hatzivassiliou *et al.*, 2005). Cet acétyl-coA cytosolique servira de précurseur pour la synthèse d'acides gras et de cholestérol. Dans les cellules cancéreuses, les conditions hypoxiques ou pseudohypoxiques entraînent une stabilisation d'HIF et donc une inhibition de l'activité de PDH. De récentes publications ont présenté la glutamine et l' α -cétoglutarate (α -KG), dérivé de la glutamine, comme voie possible de synthèse d'acétyl-coA dans le cytosol via l'action des IDH 1 et 2 (Metallo *et al.*, 2012).

Des mutations des deux isoformes d'IDH sont retrouvées dans 70% des gliomes et glioblastomes, et dans 10% des leucémies myéloïdes chez l'Homme (Yan *et al.*, 2009). Ces deux enzymes catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocrate en α -cétoglutarate (α -KG) dans le cytosol et dans la mitochondrie au cours du cycle de Krebs. Des mutations au niveau des arginine R132 pour l'IDH1 et

R140 pour l'IDH2 situées toutes deux sur des sites actifs, entraînent un gain de fonction pour ces enzymes, qui peuvent dès lors produire un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir de l' α -KG (Dang *et al.*, 2010). Une accumulation de ce dernier entraîne une inhibition compétitive des enzymes utilisant l' α -KG, ce qui inclut l'altération d'histones, la méthylation de l'ADN, la synthèse de collagène et de L-carnitine, ainsi qu'une réponse de type adaptée à l'hypoxie (Dang *et al.*, 2010). Ce dernier aspect est lié à PHD2 car cette enzyme utilise comme substrat l' α -KG, l'inhibition par le 2-HG réduit donc son activité et de fait stabilise HIF-1 α , résultant en une activation des gènes de la glycolyse (voir 2.3.1).

Récemment, la production d'énergie par les cellules cancéreuses, en particulier en conditions hypoxiques et carence nutritives, a été associée à la métabolisation du Fumarate (Sakai *et al.*, 2012 ; Tomitsuka *et al.*, 2010). Bien que d'autres études soient nécessaires, il semble que la conversion du Fumarate en Succinate, comme dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire au lieu de l'oxygène en eau, permet la synthèse d'ATP au cours de la réaction inverse de la SDH (Kita et Takamiya, 2002). Le Succinate, produit final de la respiration du fumarate est retrouvé en fortes concentrations, tout comme le Malate et le Fumarate, dans le colon, les poumons et les tumeurs de la prostate par rapport aux tissus normaux (Hirayama *et al.*, 2009). De telles concentrations dans des tissus tumoraux doivent être liées à une augmentation de la respiration du fumarate, qui va faciliter la croissance tumorale et la prolifération. Il est suggéré que le complexe II puisse agir comme une fumarate réductase (FRD) dans les cellules de mammifères (Weinberg *et al.*, 2000), et l'activité FRD de mitochondries isolées de cellules de la lignée DLD-1 (adénocarcinome colorectal) est retrouvée élevée (Tomitsuka *et al.*, 2009). De plus, cette étude montre que les cellules cancéreuses ont un ratio FRD/SQR (Succinate-Quinone Réductase) plus élevé que des cellules normales et que ce ratio augmente en condition hypoxique et hypoglycémique. Ce changement d'orientation métabolique semble être lié à une surexpression de l'isoforme de type 2 de la flavoprotéine constitutive du

complexe II par rapport à l'isoforme de type 1 (Tomitsuka *et al.*, 2003). Cependant, cette voie de reprogrammation nécessite encore d'être explorée.

3 : Modèles tumoraux

Toutes les tumeurs ne présentent pas un métabolisme glycolytique accru, et pour les tumeurs endocrines, la phosphorylation oxydative assure toujours la majeure partie de la production énergétique. Les tumeurs folliculaires thyroïdiennes et les variants oncocytaires de ces tumeurs sont un exemple de tumeurs présentant un métabolisme oxydatif.

3.1 Les tumeurs thyroïdiennes

Les cancers de la thyroïde représentent la forme la plus commune de tumeur maligne endocrine chez l'Homme. La majorité des cancers thyroïdiens sont des carcinomes thyroïdiens différenciés (DTC), incluant les carcinomes papillaires thyroïdiens (PTC) et les carcinomes folliculaires thyroïdiens (FTC). Ces tumeurs malignes ont conservé certaines des propriétés des cellules folliculaires comme la production de thyroglobuline et surtout la fixation de l'iode (Feng *et al.*, 2011). Aussi les traitements basés sur l'iode radioactif sont efficaces contre ce genre de tumeurs, et les patients atteints de DTC ainsi traités voient leur espérance de vie nettement améliorée (Woodrum et Gauger, 2005). Cependant, près d'un tiers des métastases de cancers thyroïdiens subissent un phénomène de dédifférenciation, conduisant à une perte de la capacité des cellules à fixer l'iode et engageant du coup le pronostic vital (Jeong *et al.*, 2006). Des études *in-vivo* récentes ont montré que des PTC et des FTC bien différenciées peuvent évoluer en cancers anaplasiques thyroïdiens (ATC), par le partage d'altérations génétiques comme les mutations de *ras* et *braf* (Ringel, 2009).

Les cellules FTC-133 sont utilisées comme modèle d'étude des cancers folliculaires thyroïdiens (Hölting *et al.*, 1994). Ces cellules dérivées d'un nodule de métastase de cancer folliculaire thyroïdien chez un homme de 42 ans. Elles conservent les fonctions des cellules thyroïdiennes différenciées et une réactivité à la thyrotropine et à l'action de facteurs de transcriptions. L'abondance en

mitochondries avec une activité OXPHOS efficace fait de ces cellules un modèle intéressant dans l'étude du métabolisme et de la biogénèse mitochondriale.

3.2 Oncocytome thyroïdien

La caractéristique principale des tumeurs oncocytaires est leur richesse en mitochondries. Souvent bénignes, elles se développent préférentiellement dans le rein, les glandes parathyroïdes et la thyroïde où peuvent apparaître des carcinomes oncocytaires, et essentiellement au niveau des cellules folliculaires. La fonction endocrine et l'importante vascularisation du tissu thyroïdien normal semblent expliquer la fréquence et la malignité de ces cancers dans ce tissu. De nombreux évènements initiateurs ont été envisagés, notamment un mécanisme de compensation d'un déficit fonctionnel de la chaîne respiratoire, une délétion commune de l'ADNmt et des mutations du gène *grim19* codant pour une sous-unité du complexe I (Maximo *et al.*, 1998 ; Maximo *et al.*, 2005). Cependant, la délétion commune est plus liée au vieillissement et les mutations liées à *grim19* n'ont pu être trouvée dans le matériel tumoral du laboratoire. L'analyse polarographique des oncocytomes thyroïdiens révèle que les complexes de la chaîne respiratoire sont fonctionnels mais que la production en ATP est plus faible en comparaison de tissus sains (Savagner *et al.*, 2001b). Ceci indique un découplage entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP qui serait lié à une surexpression de la protéine découplante UCP2 capable d'adapter la production en ATP de ces tumeurs aux besoins énergétiques réelles de la cellule. La surexpression de gènes impliqués dans les fonctions OXPHOS et celles de la matrice (Cycle de Krebs, β -oxydation et synthèse de l'hème) de la mitochondrie a été confirmée par l'étude des profils d'expressions de plusieurs oncocytomes thyroïdiens (Baris *et al.*, 2004). La sous-expression du gène codant pour la lactate déshydrogénase A confirme l'utilisation de la voie oxydative comme source d'énergie principale. Les gènes codant pour les facteurs PRC, NRF-1 et TFAM, impliqués dans la biogénèse mitochondriale, sont surexprimés dans ces oncocytomes, ceci étant couplé à une activité accrue de la cytochrome oxydase (Savagner

et al., 2003 ; Baris *et al.*, 2004). Dans ce modèle tumorale, les profils transcriptionnels sont donc bien corrélés à la présence d'un grand nombre de mitochondries fonctionnelles capables d'assurer le métabolisme oxydatif des cellules.

A ce jour, un seul modèle cellulaire d'oncocytome thyroïdien est disponible, il s'agit de la lignée XTC.UC1, établie à partir d'une métastase mammaire d'un variant oncocytaire d'un carcinome folliculaire thyroïdien (Zielke *et al.*, 1998). Ces cellules présentent de nombreuses mitochondries et le contenu en ADNmt, l'expression des transcrits mitochondriaux ND2 et ND5, ainsi que celle de l'UCP2 sont plus élevés que ce qui peut être observé pour la lignée B-CPAP issue d'un carcinome papillaire (Savagner *et al.*, 2001a). De plus, cette étude révèle des taux de base en ATP plus élevés pour la lignée XTC.UC1, ce qui peut être rapproché du maintien du métabolisme oxydatif dans ces cellules. Le découplage entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP n'est pas significatif malgré l'augmentation notable de l'expression d'UCP2, certainement liée à une biogénèse mitochondriale moins importante dans ces cellules par rapport aux tumeurs. Des différences d'efficacité du métabolisme mitochondrial peuvent être observées entre différents laboratoires selon les méthodes n utilisées et l'évolution des clones de XTC.UC1 au cours du temps. En effet, une forte sélection clonale s'applique aux lignées cancéreuses, qui ne vont reproduire que partiellement le phénotype de la tumeur *in vivo* et ainsi présenter des caractéristiques plus ou moins différentes de celles présentées lors de leur établissement (Schweppe *et al.*, 2008 ; Van Staveren *et al.*, 2009). L'une des pressions de sélection possible est la culture en présence ou non de TSH (*thyroid Stimulating Hormone*), hormone permettant le maintien de la différenciation des cellules XTC.UC1. Aussi, pour se prémunir du risque de modifications métaboliques, le modèle cellulaire sera cultivé en présence de cette hormone et dans un intervalle de passages relativement court pour toutes les expérimentations de transfection en relation avec l'étude de la fonction mitochondriale.

3.3 Glioblastome

Les gliomes malins sont les tumeurs du système nerveux central les plus abondantes. Malgré des thérapies de plus en plus agressives combinant de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, la médiane de survie post-diagnostic n'excède pas un an (Stupp *et al.*, 2009). Le pouvoir infiltrant de nombreux gliomes et le manque d'agents anti-glioblastomes efficaces sont des facteurs limitant l'efficacité des thérapies actuelles.

Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, des analyses à large spectre en génomique, transcriptomique et protéomique ont été réalisées sur des glioblastomes et des carcinomes ovariens et révèlent une surexpression de nombreuses isoformes de tubulines (Katsetos *et al.*, 2007 ; Kanakkanthara *et al.*, 2012 ; Kanakkanthara *et al.*, 2013). Des molécules capables de se lier à la tubuline sont une importante classe de médicaments anticancéreux, qu'elles soient capables d'augmenter la stabilité des microtubules, comme la famille des Taxanes (Rowinsky, 1997), ou au contraire d'en induire la dépolymérisation, comme les alcaloïdes de la famille Vinca (Budman, 1997). Ces composés capables de moduler la dynamique des microtubules, vont entraîner une perte de motilité cellulaire, l'arrêt de la mitose et l'induction de l'apoptose (Dumontet et Jordan, 2010). Cependant, de nombreux mécanismes cellulaires diminuent leur efficacité sur le long terme comme l'augmentation de pompes transmembranaires d'efflux et la surexpression d'isoformes de tubuline résistantes aux composés (Dumontet et Sikic, 1999). De plus, ces composés, par leur manque de spécificité pour les cellules cancéreuses, possèdent une forte toxicité (Windebank, 1999). En conséquence, l'identification de molécules capables de se lier aux microtubules, de déstabiliser leur dynamique et surtout, de présenter une meilleure affinité pour les cellules cancéreuses constitue un enjeu important pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.

Récemment, les études ont montré que les protéines constituant les filaments intermédiaires possèdent de courts motifs capables de fixer la tubuline dépolymérisée, appelés TBS (*tubuline Binding Site*), et qu'une séquence peptidique de 24 acides aminés intégrant ces TBS assure le

maintien de la capacité à lier la tubuline (Bocquet *et al.*, 2009). Dans cette étude, il a été également démontré qu'un peptide TBS dérivé de la sous-unité légère de neurofilament (NFL-TBS.40-63) inhibe la polymérisation de la tubuline *in vitro*. Ce TBS est également capable de s'intérioriser dans des cellules de la lignée T98G, dérivée de glioblastomes humains, de perturber leur réseau de microtubules et ainsi de réduire leur viabilité (Bocquet *et al.*, 2009). Une étude comparative a montré que ce peptide s'intériorise plus efficacement dans des cellules de gliomes *in vitro* que, par exemple, dans des astrocytes primaires ou des neurones, et que cette différence n'est pas espèce-spécifique (Berges *et al.*, 2012 ; Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013). Cette étude confirme que l'intériorisation du peptide NFL-TBS.40-63 affecte fortement le réseau de microtubules, diminue la prolifération et augmente l'apoptose (Berges *et al.*, 2012).

De nombreux vecteurs pour le traitement ciblé de cancers ont été développés au cours de ces dernières années. Certains d'entre eux sont en essais cliniques, comme les liposomes (Lammers *et al.*, 2008) ou les microparticules (Menei *et al.*, 2005), et les innovations apportées à certains de ces vecteurs permettent, entre autre, de cibler les cellules de gliomes, comme des liposomes coatés à la vitamine E polyéthylène glycol (Muthu *et al.*, 2011). Des nanocapsules lipidiques, développées par Heurtault *et al* (Heurtault *et al.*, 2002), permettent d'intérioriser différentes molécules, comme le Paclitaxel, dans des cellules de gliomes de rat (Garcion *et al.*, 2006). Tout récemment, l'utilisation de ces nanocapsules lipidiques incorporant du Paclitaxel et du peptide NFL-TBS.40-63, augmente l'efficacité du Paclitaxel dans la réduction de la croissance cellulaire de gliomes, comparé à des nanocapsules incorporant uniquement du Paclitaxel (Balzeau *et al.*, 2013). Ceci démontre que l'adressage et l'efficacité de ces nanovecteurs peut être améliorée par l'utilisation de ce peptide, ce qui représente un outil intéressant dans l'amélioration des traitements de gliomes actuels.

II: Les micro-ARN (miARN)

Ils font partis de la classe des « petits ARN », un terme qui était utilisé pour désigner les ARN non codants (ARNnc) tels que les snARN (*small nuclear RNA*) et les ARNt. Ce qui permet désormais de caractériser les petits ARN impliqués dans les processus d'ARN interférence sont leur taille limitée comprise entre 20 et 30 nucléotides et leur association avec les protéines de la famille des argonautes. Ces protéines peuvent elles-mêmes être subdivisées en deux classes, la sous-famille Ago et la sous-famille Piwi. Aussi, il existe trois classes de petits ARNs codés par notre génome, les microARNs (miARN), les siARN endogènes (esiARN) et les ARNs interagissant avec les protéines Piwi (piARN).

Les plus détaillés dans la littérature sont les miARNs, dont la forme mature fait environ 22 nucléotides et sont capables, en interaction avec les protéines Ago, d'agir comme des régulateurs post-transcriptionnels. Les piARNs sont la classe présentant les plus longues séquences de leur ARN mature, de 24 à 31 nucléotides, leur synthèse n'est pas liée à l'enzyme Dicer et ils sont associés aux protéines Piwi (Vagin *et al.*, 2006). Ils sont abondants dans les cellules germinales et pour la plupart impliqués dans l'extinction des transposons par formation d'hétérochromatine ou déstabilisation de l'ARN. Malgré leurs similitudes, les endo-siARNs diffèrent des miARNs du fait qu'ils dérivent d'un long ARN double brin et que leur synthèse dépend uniquement de Dicer et non pas de Drosha (Kawamura *et al.*, 2008).

A : Biogénèse et Mécanismes d'action

Le premier miARN découvert chez les eucaryotes fut lin-4 en 1993 par screening des gènes du ver nématode (Lee *et al.*, 1993). Depuis le nombre de miARNs découverts n'a cessé de croître, grâce aux techniques de clonage et de séquençage des ARN totaux (Lee et Ambros, 2001), puis par le développement récent des techniques de séquençage à haut-débit (Lu *et al.*, 2005b) et des

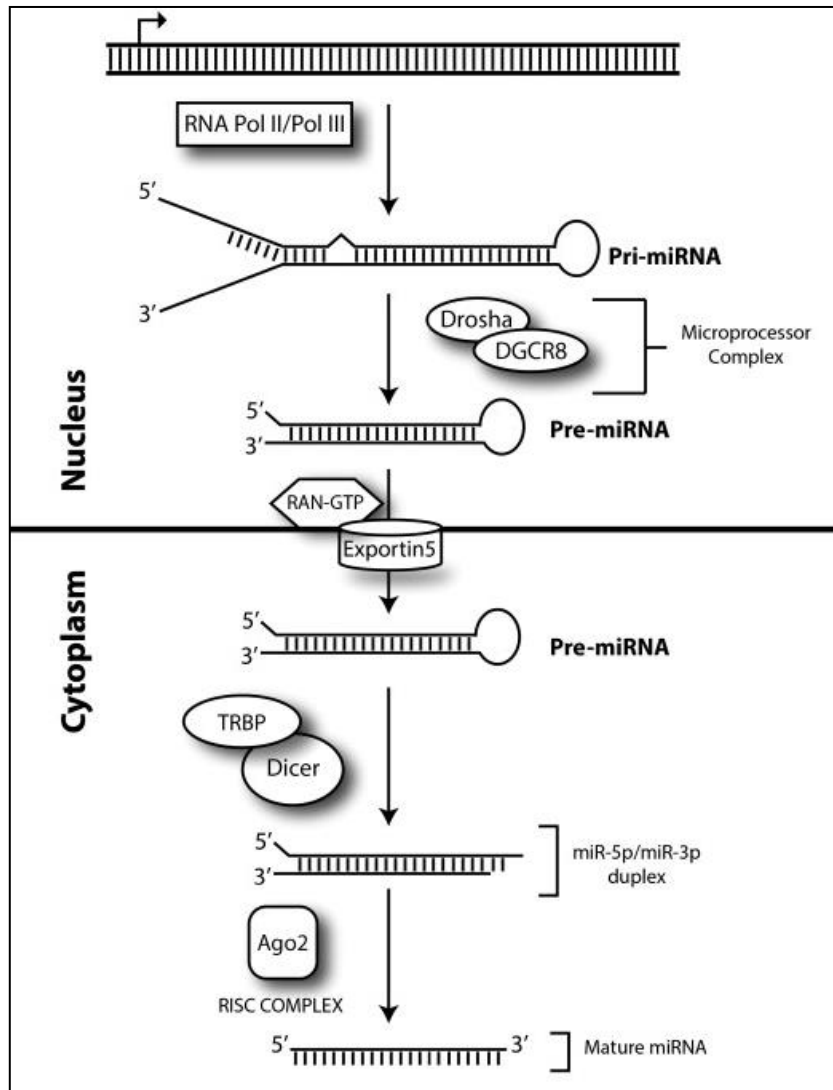


Figure I21 Biogenèse des microARNs (miARNs)

La biogenèse des miARNs commence par la transcription d'un pri-miARN par l'ARN polymérase II (ou III). Elle est suivie d'un clivage de ce transcrit primaire en un pré-miARN par l'action du microprocesseur, formé de Drosha et DGCR8. L'étape suivante implique la protéine Exportin-5 dépendant du RAN-GTP et qui permet un export nucléaire du pré-miARN. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est pris en charge par la RNase Dicer, couplée à la protéine de liaison à l'ARN TRBP, pour être clivé en duplex « imparfaits » de 22 nucléotides de long et 2 nucléotides libres en position 3'. Ago2, selon les règles de thermodynamiques, va sélectionner les brins appropriés, permettant ainsi la formation du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) qui va réguler l'expression d'ARN messagers cibles (D'après Tétreault et De Guire, 2013).

méthodes prédictives informatiques (Li *et al.*, 2006) permettant la mise en évidence de miARNs peu abondants. Ces miARNs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'ontogenèse, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire, le contrôle du métabolisme ou encore la défense antivirale. Les miARNs sont des ARNnc simples brins d'une longueur avoisinant les 22 nucléotides générés à partir d'un transcrit endogène formé d'une succession de séquences en épingles à cheveux (Kim, 2005). Les miARNs fonctionnent comme des régulateurs post-transcriptionnels, en s'appariant à la séquence 3'-UTR (*UnTranslated Region*) de leurs ARNm cibles. Cette liaison conduira en majorité à une répression de la traduction ou à une dégradation de l'ARNm, mais d'autres types ont été décrits comme l'activation de la traduction (Filipowicz *et al.*, 2008) et la modification de l'hétérochromatine (Kim *et al.*, 2008). Un peu plus du tiers des gènes humains sont potentiellement ciblés par un ou des miARNs, ce qui implique qu'une combinaison unique de miARNs dans chaque type cellulaire puisse influencer l'expression de plusieurs centaines d'ARNm.

1 : Biogénèse des miARNs

Les miARNs sont générés à partir de structures nucléaires en forme d' « épingles à cheveux » par l'action de deux ribonucléases de type III, Drosha et Dicer, pour former des miARNs matures d'une vingtaine de nucléotides qui vont être présentés à la séquence cible par des protéines de la famille Argonaute (figure I21) (Kim *et al.*, 2009 ; Tétreault et De Guire, 2013).

1.1 Transcription nucléaire

La plupart des gènes de miARNs ont de multiples formes (paralogues) résultant probablement de diverses duplications au cours de l'évolution. Par exemple, le génome humain possède douze loci pour la famille de miARNs let-7. Les paralogues possèdent souvent des séquences identiques de nucléotides en position 2-7 de l'extrémité 5' du miARN. Cependant, l'extrémité 3' contribue également à la reconnaissance de la séquence cible, et les variations de séquence à ce niveau entraînent des fonctions biologiques *in vivo* différentes (Ventura *et al.*, 2008). Près de 50%

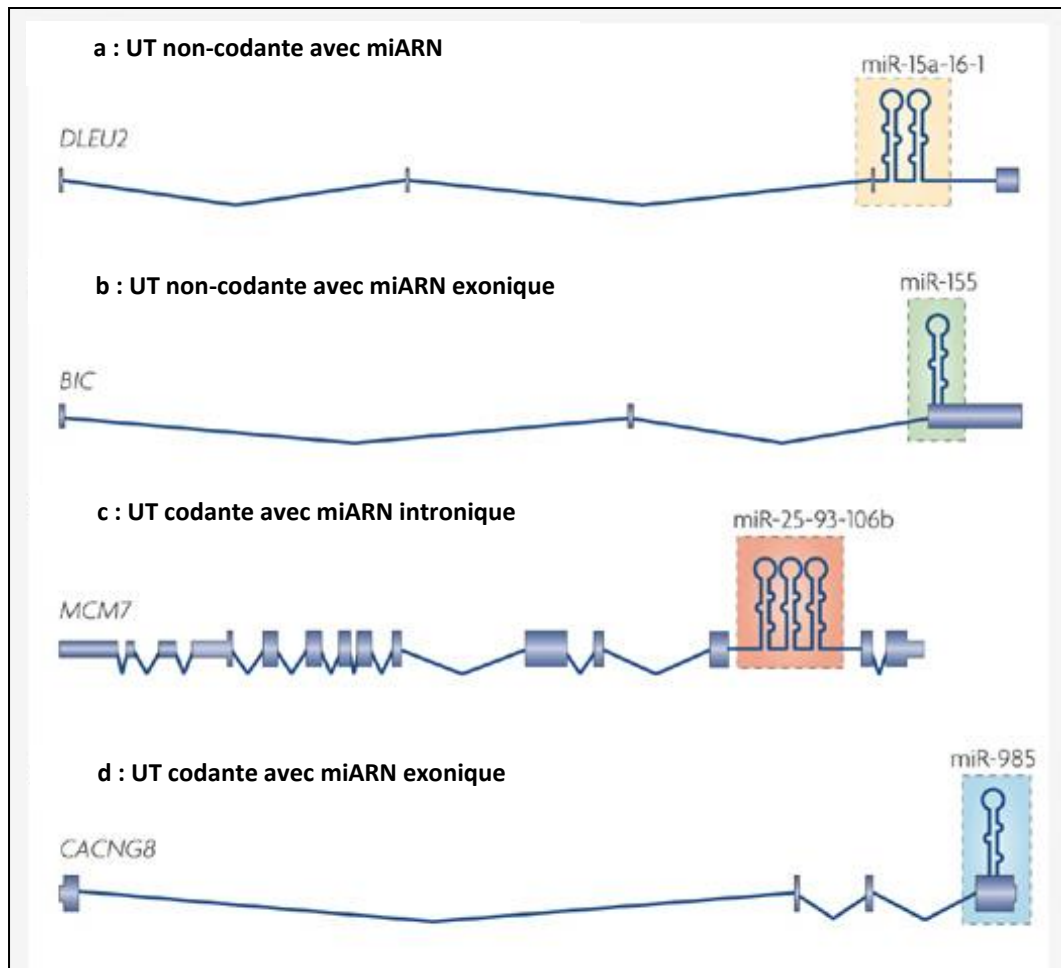


Figure I22: Classement des microARNs (miARNs).

Les miARNs peuvent être classés dans quatre groupes selon la localisation génomique de l'unité transcriptionnelle (UT) et fonction de leur position exonique ou intronique.

a : les miARNs introniques dans un transcrit non-codant, comme le cluster de miARNs 15a/16-1 retrouvé dans un intron du gène *DLEU2*.

b : les miARNs exoniques dans un transcrit non-codant, comme miR-155 retrouvé dans la séquence de l'ARN non-codant de *BIC*.

c : les miARNs intronique dans un transcrit codant, comme le cluster miR-25/93/106b positionné dans l'intron de la séquence du facteur de réplication de l'ADN *MCM7*.

d : les miARNs exoniques dans un transcrit codant, comme la séquence en épingle à cheveu de miR-985 retrouvé dans le dernier exon du transcrit du gène *CACNG8*

Les séquences en "épingle à cheveux" représentent les séquences « tiges-boucles » des miARNs tandis que les rectangles bleus indiquent les réions codant pour des protéines (d'après Kim *et al.*, 2009).

des loci de miARNs de mammifères ont été retrouvés à proximité les uns des autres, formant des clusters de miARNs transcrits simultanément en un seul transcrit polycistronique (Lee *et al.*, 2002). Dans de rares cas, des miARNs individuels dérivent de promoteurs de gènes séparés. Une partie des miARNs est générée à partir de transcrits polycistroniques non-codants, tandis qu'une autre l'est dans une unité transcriptionnelle codant pour une ou des protéines (figure 122). Près de 40% des loci de miARNs se trouvent au niveau d'une région intronique non-codante tandis qu'environ 10% sont placés dans une région exonique. En majorité, les loci de miARNs associés à un transcrit codant pour une protéine sont retrouvés dans des introns. La transcription des miARNs est réalisée par l'ARN polymérase II (Pol II) (Lee *et al.*, 2004), même si une fraction d'entre eux, associée à des répétitions de séquences Alu (séquence cible de l'endonucléase Alu I) peut-être transcrite par l'ARN polymérase III (Borchert *et al.*, 2006). De nombreux facteurs de transcription associés à Pol II contrôlent la transcription des miARNs (Lee et Dutta, 2009), permettant une expression minutieuse de ces derniers selon des conditions spécifiques et suivant le type cellulaire.

1.2 Droscha

Le transcrit primaire, ou pri-miARN, généré par la Pol II est long de plusieurs kilobases (kb) et contient plusieurs structures de type tige-boucle, ou « épingle à cheveux ». La première étape de maturation de ces pri-miARNs est leur clivage au niveau des tiges des « épingles à cheveux », libérant ainsi ces dernières et formant ainsi les pré-miARNs. Cette réaction est catalysée l'enzyme Droscha (Lee *et al.*, 2003), une ribonucléase de type III (RNase III), nécessitant un cofacteur, sous la forme de la protéine DGCR8 (DiGeorges syndrome Critical Region 8) chez l'Homme (Han *et al.*, 2004). Réunis ces deux facteurs forment un complexe connu sous le nom de Microprocesseur atteignant les 650 kDa chez l'Homme (Gregory *et al.*, 2004). Des cellules souches embryonnaires de souris déficientes en DGCR8 sont incapables de produire des miARNs et présentent de sévères défauts de prolifération

et de différenciation, confirmant ainsi le rôle essentiel de DGCR8 dans la biogenèse des miARNs et démontrant également l'importance des miARNs sur les fonctions des cellules ES (Wang *et al.*, 2007).

La reconnaissance se fait par DGCR8 qui va interagir avec les séquences simple-brin flanquant la structure en « épingle à cheveux », permettant la fixation de Drosha qui va cliver le substrat à environ 11pb de la jonction séquence simple brin et tige (Han *et al.*, 2006). Le clivage par Drosha d'un pri-miARN en position intronique n'affecte pas l'épissage du transcrit (Kim et Kim, 2007), par contre, lors d'une localisation dans une région exonique, le transcrit peut être déstabilisé réduisant de fait sa traduction en protéine (Han *et al.*, 2009).

1.3 Exportin 5

L'étape suivante consiste en un transfert du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme (Kim, 2004). Le transport est assuré par l'Exportin 5 (EXP5), membre de la famille des récepteurs de transport nucléaire (Lund *et al.*, 2004), originellement connue comme un transporteur mineur d'ARNt (Bohnsack *et al.*, 2002). EXP5 reconnaît une séquence d'environ 14 pb au niveau de la tige double brin, puis, comme les autres transporteurs nucléaires, il lie le pré-miARN au facteur Ran (*RAs-related Nuclear protein*) associé au GTP dans le noyau. Enfin l'hydrolyse du GTP en GDP dans le cytosol permet la libération du pré-miARN (Zeng et Cullen, 2004).

1.4 Dicer

Une fois dans le cytosol, le pré-miARN est pris en charge par Dicer, une seconde RNase III, qui va le cliver au niveau de la boucle terminale et ainsi libérer une structure double brin d'environ 22 nucléotides, le miARN duplex (Ketting *et al.*, 2001). Ainsi, Drosha prédétermine la séquence du miARN mature en générant l'une de ses extrémités tandis que la seconde sera créée par Dicer. Il s'agit d'une protéine très conservée chez les organismes eucaryotes, avec chez certains d'entre eux, plusieurs homologues connus (Lee *et al.*, 2004). Chez l'Homme, Dicer interagit avec TRBP (*TAR RNA-binding Protein*) et PACT (*Protein ACTivator of the interferon induced protein kinase*) (Chendrimada *et*

al., 2005 ; Lee *et al.*, 2006). Bien que ces derniers ne soient pas directement impliqués dans le clivage, ils contribuent à la formation du complexe RISC (*RNA-Inducible Silencing Complex*) (Chendrimada *et al.*, 2005).

1.5 Les Argonautes

Suite au clivage du pré-miARN, le miARN duplex est pris en charge par des protéines de la famille des Argonautes (Ago) pour former le complexe effecteur RISC. Seul un des brins du miARN est préservé comme miARN mature, ou brin de ciblage, le second, ou brin passager, est le plus souvent dégradé. La stabilité thermodynamique des deux extrémités du duplex détermine le choix du brin (Schwarz *et al.*, 2003). Par exemple, un brin avec une extrémité 5' instable, par exemple une paire GU plutôt que GC, tend à être conservé (Schwarz *et al.*, 2003). Chez l'Homme, Dicer, TRBP (et/ou PACT) et les protéines Ago contribuent à l'assemblage du complexe RISC en formant le complexe RLC (*RISC Loading Complex*) (Chendrimada *et al.*, 2005 ; MacRae *et al.*, 2008). L'activité endonucléasique des protéines Ago est responsable de la lyse du brin passager, d'une partie des miARNs duplex, mais l'activité de certaines Ago (AGO1, AGO3 et AGO4) est parfois déficiente, empêchant ainsi la dégradation du brin passager. Cette sélection n'étant donc pas un processus extrêmement rigoureux, certains pré-miARNs produisant des deux brins à des fréquences comparables.

Du fait de la diversité des protéines Ago dans une même cellule, les miARNs ont de multiples choix lors de l'assemblage de RISC. Chez la drosophile, le facteur majeur déterminant ce tri est lié à la structure même du précurseur (Forstemann *et al.*, 2007). Ainsi, les miARNs duplex présentant une complémentarité imparfaite seront préférentiellement pris en charge par AGO1, tandis que la complémentarité parfaite des miARNs duplex (*small interfering RNA*) conduit à une incorporation par AGO2 (Forstemann *et al.*, 2007). Chez l'Homme, les quatre protéines Agos (AGO 1-4) intègrent les miARNs avec seulement quelques différences marginales (Azuma-Mukai *et al.*, 2008), suggérant que celles-ci ne possèdent pas de fonctions significativement différentes. Les extrémités des miARNs sont

le plus souvent hétérogènes avec des délétions ou des additions d'un ou deux nucléotides (Azuma-Mukai *et al.*, 2008 ; Seitz *et al.*, 2008), à la fois en position 3' et 5'.

2 : Mécanismes d'action

Comme décrit précédemment, le premier miARN décrit a été *lin-4*, ainsi nommé pour l'induction de l'expression de *lin-4* chez *Caenorabdhitis elegans*. Cinq années plus tard, l'équipe du Dr. Mello a décrit le phénomène d'interférence ARN, ou ARNi (Fire *et al.*, 1998). Ils ont montré que l'injection de petits ARN double brin est suffisante pour inhiber l'expression d'un ARNm spécifique. Les auteurs ont supposé que le processus d'inhibition est relié à un mécanisme catalytique plutôt qu'à une interaction entre le petit ARN et l'ARNm (Fire *et al.*, 1998). Le mécanisme réel d'action des miARNs a été décrit plus tard et il a été montré qu'il se base principalement sur une inhibition de la traduction. Néanmoins, les mécanismes moléculaires de cette inhibition sont toujours soumis à débat avec d'un côté, des chercheurs prônant une répression au niveau de l'initiation de la traduction, et d'un autre côté, des chercheurs suggérant un mécanisme de ciblage post-initiation (Eulalio *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression génique par RISC soient diverses, deux points centraux sont unanimement reconnus. Premièrement, chaque RISC contient au moins un membre de la famille Ago qui va lier un petit ARN régulateur. Deuxièmement, pour chaque RISC, ce petit ARN fonctionne comme un guide conduisant RISC à sa cible via un appariement des bases avec celles de l'ARN transcrit ciblé (Pratt et MacRae, 2009).

2.1 Formation du complexe RISC

Le premier nucléotide en 5' du miARN permet à ce dernier d'entrer dans les processus d'ARN interférence (ARNi) (Nykänen *et al.*, 2001). Cette base se présente dans une zone de repliement de la protéine Ago afin de permettre des liaisons base-spécifiques avec le miARN, ceci peut expliquer les préférences de certaines Ago d'eucaryotes pour des extrémités 5' particulières (Batista *et al.*, 2008). Ceci explique également pourquoi la première base du

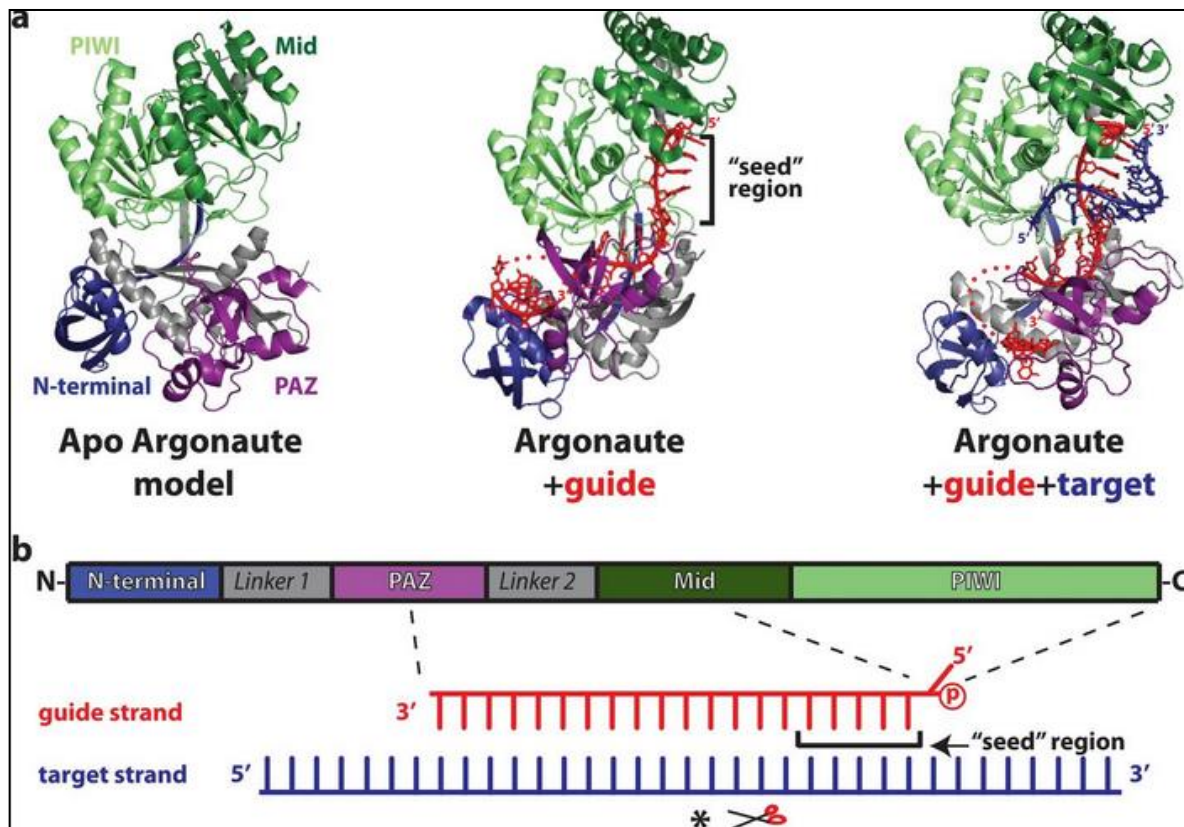


Figure I23: Structure de la protéine procaryotique Argonaute avec le guide et la cible.

a : La structure cristalline de *Termus thermophilus* Argonaute peut lier une séquence d'ADN de 10 nucléotides (gauche), une séquence « guide » de 21 nucléotides (centre) ou ce guide avec un ARN cible de 20 nucléotides (droite). L'extrémité 5' du guide contacte les domaines Mid (*middle*, en vert foncé) et PIWI (en vert clair), tandis que l'extrémité 3' se lie aux domaines N-Terminal (en bleu) et PAZ (en violet).

b : représentation schématique des domaines de la protéine Argonaute et des régions d'interaction entre cette protéine et le brin guide (ligne pointillée).

miARN ne contribue pas significativement à la reconnaissance de la cible (Lewis *et al.*, 2005). Le reste de la séquence contacte la protéine presque uniquement par son squelette phosphodiester, indiquant la capacité des Ago à lier de nombreux miARN, indépendamment de la séquence nucléotidique. En 3', les deux bases terminales s'attachent au niveau d'un site hydrophobe, le domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille). Il est intéressant de préciser qu'en cristallographie en rayons X, les bases 11 à 18 sont désordonnées, ce qui suggère une importante mobilité de la part de ce miARN guide (figure I23) (Wang *et al.*, 2008). Cette plasticité intrinsèque permet aux protéines Ago de s'adapter à des brins guides de tailles variées.

Comme illustré sur la figure I23, présentant la structure tertiaire d'une protéine Ago de bactérie *Thermus thermophilus*, les bases 2 à 8 du brin guide s'apparient à l'ARNm cible, formant ainsi une double-hélice complémentaire. Le reste du duplex est désordonné, suggérant soit que l'intégralité du duplex ne se conserve pas dans le cristal, soit que la moitié du duplex reste mobile lorsque celui-ci se lie à la protéine. Ces deux possibilités sont sa cible 10 fois plus rapidement que le miARN libre en solution (Ameres *et al.*, 2007). L'efficacité cohérente avec les découvertes faites chez l'Homme, à savoir une extrémité 3' se liant moins efficacement que l'extrémité 5' (Ameres *et al.*, 2007). Les bases 2 à 6 du miARN guide sont exposées et tournées vers l'extérieur du complexe formant ainsi la région « racine » ou « seed region ». Le complexe RISC peut utiliser les nucléotides de cette région comme amorce pour les ARNm cibles, expliquant l'efficacité du complexe pour localiser et lier ces ARNm. Des études cinétiques ont montré que le complexe humain RISC liait et dégradait. Son activité est également grandement accrue par la capacité du complexe RISC à lier de manière plus lâche les ARN simple brin et ne faire qu'un balayage unilatéral pour faire correspondre des sites cibles (Ameres *et al.*, 2007).

Cette architecture des protéines Ago associées aux miARNs permet au complexe RISC de localiser efficacement les ARNs cibles au travers du vaste pool que constitue le transcriptome d'une cellule. En général, les conséquences de la reconnaissance par RISC sont la répression de la traduction d'un ARNm cible.

2.2 Hydrolyse ARNm

La plus simple et la plus détaillée des conséquences de cette reconnaissance par RISC est sans doute l'hydrolyse de l'ARNm, ce qui entraîne une rupture du cadre de lecture lors de la traduction et sa dégradation ciblée par des exonucléases (Tolia et Joshua-Tor, 2007). Les deux exigences pour ce mode de répression sont : une protéine Ago avec un site catalytique actif et une complémentarité parfaite entre le miARN guide et la séquence des ARNm ciblés, veillant ainsi à ce que seules les cibles valides soient clivées (Rivas *et al.*, 2005). Des quatre Ago humaines, seule AGO2 possède une activité catalytique (Liu *et al.*, 2004). Cette lyse est assurée par l'activité RNase de son domaine PIWI (*P-element induced wimpy testis*). Elle dépend des cations divalents car elle fait intervenir des mécanismes impliquant des métaux comme la plupart des nucléases (Rivas *et al.*, 2005). L'essentiel de l'hydrolyse se passe au niveau d'une triade catalytique d'acides aminés dite triade « DD (D/H) », avec deux acides aspartiques et soit un troisième soit une histidine. Cette triade coordonne les ions métalliques et positionne une molécule d'eau pour catalyser une cassure nucléophile du squelette phosphodiester de l'ARNm cible. Suite à cette hydrolyse, l'ARNm est scindé en deux, avec une partie terminée par un phosphate-5' et une autre contenant l'hydroxyle-3'. Le clivage se produit toujours entre les nucléotides appariés aux bases 10 et 11 du miARN guide (Yuan *et al.*, 2005) et *in vitro*, cette réaction ne nécessite aucun autre facteur que la protéine Ago et le miARN.

2.3 Répression de la traduction

Le plus répandu des modes d'interférence ARN chez les eucaryotes est la répression de la traduction médiée par les miARNs. A la différence de la réaction d'hydrolyse, cette répression ne requiert pas de complémentarité parfaite entre la séquence cible et le brin guide. En général, seules

2 à 7 bases du miARN sont nécessaires pour lier la cible et débiter la réaction (Lewis *et al.*, 2005). Selon les estimations, chaque miARN peut cibler entre cent et deux cents ARNm. Sachant que plus de mille huit cent miARN (miRbase ; Kozomara et Griffiths-Jones, 2011) sont codés par le génome humain, il s'agirait du tiers du transcriptome humain qui serait sous le contrôle de cette forme de régulation par miARN (Lewis *et al.*, 2005). De nombreuses études rapportent plusieurs mécanismes par lesquels RISC peut inhiber la traduction. Le premier implique une inhibition de l'initiation de la traduction. Chez la drosophile, AGO2 peut bloquer les interactions protéine-protéine entre les facteurs d'initiation 4E et 4G, qui sont indispensables à la formation d'un complexe de pré-initiation actif sur l'ARNm cible (Iwasaki *et al.*, 2009). D'un autre côté, toujours chez la drosophile, AGO1 inhibe la traduction en induisant une déadénylation suivie d'une dégradation de l'ARNm (Behm-Ansmant *et al.*, 2006). Le complexe RISC/AGO1 recrute la protéine GW182 (Glycine-tryptophane de 182kDa) capable de recruter les complexes CCR4-NOT, induisant la déadénylation de la queue poly(A), et DCP1-DCP2, permettant le retrait de la coiffe en 3'. Chez les mammifères, les complexes RISC utilisent des mécanismes similaires de répression de la traduction (Filipowicz *et al.*, 2008, Tétreault et De Guire, 2013).

B : miARN et Mitochondries

La mitochondrie joue un rôle critique dans divers processus cellulaires comme la mort cellulaire, les voies métaboliques, l'homéostasie du Ca²⁺ ou encore le vieillissement (Pan *et al.*, 2011). L'une des voies de régulation des niveaux d'ARNm et de protéines, en conditions physiologiques aussi bien qu'en conditions pathologiques, peut être imputée aux miARN et aux processus d'ARNi. Les niveaux de miARN sont régulés que ce soit au niveau de leur biogénèse que de leur maturation (Iorio *et al.*, 2012). La localisation des pré-miARN, des miARN matures et des protéines impliquées dans leur biogénèse n'est pas confinée au cytosol. Ils ont été trouvés enrichis dans plusieurs compartiments

subcellulaires : le noyau (Buchan et Parker, 2007), les P-bodies (Huang *et al.*, 2011), l'appareil de Golgi ou encore le réticulum endoplasmique. Récemment, des études montrent des miARNs enrichis et/ou associés aux mitochondries (Bandiera *et al.*, 2011 ; Barrey *et al.*, 2011 ; Bian *et al.*, 2010 ; Kren *et al.*, 2009 ; Mercer *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012 ; Bandiera *et al.*, 2013).

1 : La mitochondrie : réservoir de mito-miRs ?

L'émergence du rôle des ARNnc et de la mitochondrie dans plusieurs pathologies ont conduit de nombreuses études à se concentrer sur ces petits ARN et leur association possible avec la mitochondrie. L'analyse du transcriptome mitochondrial issu de différentes lignées cellulaires humaines ont révélé la présence d'ARNnc (piARN, snARN, miARN,...) associés aux mitochondries (Mercer *et al.*, 2011). Le séquençage de ces ARN associés dans des cellules HEK293 et HeLa révèle également l'implication d'une population variée de miARNs (Sripada *et al.*, 2012).

1.1 Mécanismes de transport

Les mécanismes de transport des ARNs depuis le cytosol vers la mitochondrie ont déjà été étudiés chez de nombreux organismes tels les protozoaires, les plantes, les champignons, les levures et chez l'animal (Sieber *et al.*, 2011). Les mitochondries de mammifères sont connues pour importer/exporter des ARNt *in vitro* et *in vivo* (Rubio et Hopper, 2011), ce qui explique la présence dans le cytosol des ARNt mitochondriaux de la Méthionine, de l'Isoleucine, de la Lysine et de la Glutamine (Maniataki et Mourelatos, 2005). Aussi de nombreuses preuves d'un import d'ARN par la mitochondrie ont pu être mises en évidence : l'ARNt de la Glutamine est transporté depuis le cytosol grâce à l'ATP sans action de facteurs quels qu'ils soient (facteur cytosolique, système TIM/TOM, canal VDAC,...) (Rubio *et al.*, 2008).

Le mécanisme d'importation des miARNs n'est pas encore clairement défini. Récemment, il a été montré que la polynucléotide phosphorylase (PNPase), une protéine de l'espace intermembranaire, joue un rôle dans le transport des petits ARNs. L'enzyme possède une activité 3'-5' exoribonucléase

qui dégrade les ARNs tentant de pénétrer dans la mitochondrie. Cependant, les ARNs avec une structure tige-boucle et les quatre nucléotides libres sur son extrémité 3' sont inaccessibles pour le domaine catalytique de la PNPase et sont ainsi protégés de la dégradation (Wang *et al.*, 2010). Cette enzyme est conservée chez les bactéries, les plantes, la drosophile, les souris et l'Homme, ce qui laisse penser qu'elle régule de manière spécifique le transport des ARNnc dans l'organelle. Chez les plantes, la PNPase est également présente dans les chloroplastes, et son extinction conduit à une différence de 98% dans la composition en ARNnc dans cet organelle comparé au phénotype sauvage (Hotto *et al.*, 2011).

La protéine Ago2, impliquée dans la formation du complexe RISC et retrouvée co-localisée avec les protéines mitochondriales (Barrey *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012), est impliquée dans le transport de l'ARNt de la méthionine depuis la mitochondrie vers le cytosol (Maniataki et Mourelatos, 2005). Ceci suggère que les éléments composant le complexe RISC peuvent être impliqués dans le transport des miARNs au travers de la membrane mitochondriale. Il est par contre important d'étudier la co-localisation avec les autres protéines impliquées dans la biogénèse des miARNs, ce qui constituerait une avancée dans la compréhension de ce mécanisme de transport. Il serait également intéressant de rechercher un possible mécanisme indépendant de translocation des miARNs comme on peut le trouver chez les *Leishmania sp.*, sous la forme d'un RIC (*RNA Import Complex*) (Mukherjee *et al.*, 2007).

1.2 Profil mitochondrial tissu spécifique

Les profils d'expression de protéines dans divers types cellulaires ou tissulaires sont particulièrement différents (Calvo et Mootha, 2010), et dépendent des besoins énergétiques, de la taille du tissu, de son origine et de sa complexité. De récentes observations suggèrent que le profil des miARNs associés à la mitochondrie est également unique et tissu spécifique et qu'il est aussi dépendant des demandes en énergie de la cellule et de son origine tissulaire. Des études menées par

l'équipe de Sripada ont montré un profil unique de petits ARNs dans les mitochondries de cellules des lignées HEK293 et HeLa après isolement des mitochondries en gradient de césium et comparaison entre la fraction cytosolique et mitochondriale. On trouve respectivement, 21 et 27 % des miARNs connus sont associés aux mitochondries de ces cellules (Sripada *et al.*, 2012). L'association de quelques miARNs (famille let-7, hsa-miR-107, hsa-miR-103, hsa-miR-320 et hsa-miR-181) avec la mitochondrie semble universelle (Bandiera *et al.*, 2011 ; Barrey *et al.*, 2010 ; Sripada *et al.*, 2012 ; Bandiera *et al.*, 2013) tandis que le profil des autres miARNs présente une tissu-spécificité. Par exemple, 134 miARNs (dont hsa-miR-128, hsa-miR-1307 ou encore hsa-miR-140-3p) sont significativement associés à la mitochondrie des cellules HEK293 tandis que seuls 24 miARNs (dont hsa-miR-23a, hsa-miR-181b ou encore hsa-miR-30) le sont dans les mitochondries des cellules HeLa (Sripada *et al.*, 2012). Ainsi, la compréhension de l'enrichissement tissu-spécifique ou universel en miARNs et l'activité de ceux-ci dans des mitochondries de cellules d'origines différentes apportera de nouveaux éléments permettant de définir une signature mitochondriale des miARNs (mitomiRs) et d'établir leurs interactions avec les différents organites de la cellule. Il a été montré récemment que la biogenèse de miARNs peut se faire à partir du clivage d'ARNt ou de snoARNs (*small nucleolar RNA*) conduisant à des ARNs de petites tailles semblables à des miARNs (Yang et Lai, 2011). Par exemple, le snoARN ACA45 est clivé par Dicer, puis associé à AGO2 dans le complexe RISC pour cibler CDK11, une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la tumorigenèse et la réponse aux signaux apoptotiques (Ender *et al.*, 2008 ; Yang et Lai, 2011). Il doit donc exister un dialogue croisé entre les ARNt et les miARNs.

Les miARNs jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes en se liant au site complémentaire présent sur l'ARNm cible, induisant une inhibition de la traduction voire la dégradation de l'ARNm selon le niveau de complémentarité (Sun *et al.*, 2011). La dérégulation de la biogenèse de ces miARNs et de leur maturation peut donc avoir d'importantes répercussions sur les

Source of mitochondria ¹	miRNAs ²
mouse liver (Bian et al., 2010)	mmu-miR-202-5p, mmu-miR-122, mmu-miR-223, mmu-miR-134, mmu-miR-709, mmu-miR-720, mmu-miR-680, mmu-miR-494, mmu-miR-155
rat liver (Kren et al., 2009)	rno-miR-130a, rno-miR-130b, rno-miR-140*, rno-miR-320, rno-miR-494, rno-miR-671
myotubes (Barrey et al., 2011)	hsa-miR-720, hsa-miR-133b, hsa-miR-1974, hsa-miR-24, hsa-miR-133a, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-1979, hsa-miR-103, hsa-miR-125b, hsa-miR-103, hsa-miR-221, hsa-miR-23a, hsa-let-7b, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-106a, hsa-miR-23b, hsa-miR-92a, hsa-miR-193b, hsa-miR-365, hsa-miR-93, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-20a, hsa-miR-149, hsa-miR-181a, hsa-miR-503, hsa-miR-210, hsa-miR-107, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-34a, hsa-let-7g, hsa-miRPlus-D1033, hsa-miR-19b, hsa-miR-197, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-675*, hsa-miR-134, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-598
HeLa (Sripada et al., 2012)	hsa-mir-1973, hsa-mir-1275, hsa-mir-494let-7b, let7g, hsa-miR-107, hsa-miR-181a, hsa-miR-221, hsa-miR-320a
143-B (Mercer et al., 2011)	hsa-mir-146a, hsa-mir-103, hsa-mir-16
HEK293 (Sripada et al., 2012)	let-7b, let7g, hsa-miR-107, hsa-miR-181a, hsa-miR-221, hsa-miR-320a

Tableau 1 : miARNs associés aux mitochondries.

Les miARNs validés comme enrichis ou associés aux mitochondries pour différentes lignées cellulaires et tissulaires sont résumés dans le tableau. La validation a été réalisée par soit de la qPCR soit du Northern Blot (D'après Sripada *et al.*, 2012).

¹ La lignée cellulaire ou le tissu d'où les mitochondries ont été isolées et la référence de l'article associé

² La liste de miARNs validés comme enrichis ou associés aux mitochondries. The validated miRNAs enriched/associated with mitochondria from different cell lines and tissues till date have been summarized.

différents mécanismes cellulaires. La mitochondrie, contenant une part importante de protéines codées par le génome nucléaire, est donc le siège d'une régulation post-transcriptionnelle par les miARNs. Récemment, des miARNs ont été retrouvés présents dans des mitochondries isolées (tableau 1) de foie de rats (15 miARNs), de foie de souris (20 miARNs), de myotubes (20 miARNs), et de muscles humains (46 miARNs matures et 2 pré-miARNs) mais aussi de cellules HeLa (6 miARNs), 143B (3 miARNs), et HEK293 (6 miARNs) (Bandiera *et al.*, 2011 ; Bandiera *et al.*, 2013 ; Barrey *et al.*, 2011 ; Bian *et al.*, 2010 ; Kren *et al.*, 2009 ; Mercer *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012). De plus, des miARNs ont été retrouvés associés à des ARNm au niveau de la membrane mitochondriale externe et absents du mitoplaste (membrane interne + matrice) (Mercer *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012). Cela implique que les miARNs sont plutôt associés à la membrane mitochondriale externe qu'enrichis dans l'espace intermembranaire. Cependant, la dynamique et l'enrichissement en miARNs dans différents compartiments sub-mitochondriaux restent à éclaircir. La membrane mitochondriale externe doit servir de plateforme pour l'assemblage de complexe de signalisation, jouant un rôle important dans la régulation de la répression de la traduction. Cette hypothèse est renforcée par la co-localisation d'AGO2 et d'AGO3, composant clés du complexe miRISC (complexe miARN/RISC), avec la mitochondrie (Barrey *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012). Ceci soulève la question des interactions possibles des autres complexes RISC avec la mitochondrie, servant de plateforme de répression de la traduction comme le complexe protéique CLPABP-RNA. La protéine CLPABP (*CardioLipin and Phosphatidic Acid Binding Protein*) est un granule d'ARN comprenant des protéines liant et stabilisant l'ARN, localisée dans le réseau de tubulines à proximité des mitochondries. Ce complexe CLPABP-RNA fixe l'ARNm du cytochrome c, régule son transport et sa traduction en régulant son nombre de copies grâce à l'activité RNase de la protéine HuR (Sano *et al.*, 2008). De même, des mitochondries ont été retrouvées associées de façon dynamique aux P-bodies (Ernault-Lange *et al.*, 2012) et aux granules de stress (Cande *et al.*, 2004). Ces corps cytoplasmiques sont au centre du métabolisme des

miARNs, en incorporant des précurseurs et divers composants de leur biogenèse. Ces quelques exemples suggèrent bien que la membrane externe mitochondriale peut jouer un rôle de plateforme dynamique de régulation des niveaux d'ARNm et de protéines au sein de la cellule.

Les miARNs sont donc aussi bien associés à la membrane que localisés dans la matrice mitochondriale. La présence des miARNs et du complexe RISC au niveau de cet organite soulève de nombreuses questions. Il est possible que les miARNs associés à la mitochondrie, ou mitomiRs (Bandiera *et al.*, 2011 ; Bandiera *et al.*, 2013) régulent les ARNm codés par le noyau et à destinée mitochondriale voire les ARNm mitochondriaux. La mitochondrie peut également être une navette pour le transport des miARNs et des protéines accessoires pour réguler les niveaux de traduction au niveau de sites subcellulaires distants.

2 : Cibles des mitomiRs

La mitochondrie possédant son propre génome, il est intéressant d'étudier l'alignement des miARNs par rapport à ce dernier. La présence de miARNs dans la mitochondrie suggère une régulation des transcrits mitochondriaux. Ces miARNs peuvent être partiellement ou totalement alignés. Ainsi l'équipe de Barrey a mis en évidence 33 pré-miARNs et 25 miARNs matures alignés avec le génome mitochondrial (Barrey *et al.*, 2011). L'équipe de Sripada a retrouvé deux de ces miARNs dans les lignées HEK293 et HeLa et 22 nouveaux miARNs alignés avec le génome mitochondrial pour HEK293 (Sripada *et al.*, 2012). Il reste cependant à valider toutes ces cibles.

Des analyses bio-informatiques suggèrent que les mitomiRs ciblent aussi bien les transcrits mitochondriaux que nucléaires (Bian *et al.*, 2010 ; Sripada *et al.*, 2012). Seul une minorité des miARNs est transportée dans la mitochondrie pour réguler les transcrits mitochondriaux tandis que la grande majorité va réguler les transcrits nucléaires. Par exemple, sur les 15 mitomiRs identifiés dans les

cellules du foie de rat, un seul (miR-130) cible un ARNm mitochondrial, à savoir *cox3* (Kren *et al.*, 2009), confirmant ainsi que le transcriptome mitochondrial ne constitue pas une cible préférentielle des mitomiRs (Barrey *et al.*, 2011). Les mitomiRs fortement enrichis dans les cellules musculaires comme hsa-mir-31, hsa-mir-302a, hsa-mir-21 et hsa-mir-181b ont été identifiés comme surexprimés dans des carcinomes colorectaux et thyroïdiens ainsi que dans des leucémies myéloïdes (Bandres *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2010 ; Iliopoulos *et al.*, 2010 ; Tetzlaff *et al.*, 2007). Dans toutes les études récentes, les miARNs de la famille de suppresseurs de tumeurs let-7 sont enrichis dans les mitochondries (Bandiera *et al.*, 2011 ; Barrey *et al.*, 2011 ; Sripada *et al.*, 2012). Ces miARNs sont retrouvés sous-exprimés dans la plupart des cancers et régulent à la fois l'invasion tumorale et l'apoptose en ciblant plusieurs oncogènes, dont *c-Myc*, *ras* ou *jak*. (Wang *et al.*, 2012). P53 est également une cible potentielle de hsa-miR-107, hsa-miR-145, hsa-miR-503 et hsa-miR-21, tous détectés dans la mitochondrie (Barrey *et al.*, 2011). P53 peut réguler plusieurs éléments de la biogenèse des miARNs, comme Droscha, Dicer, DGCR8, TARBP2 ou bien encore l'Exportine5 (Boominathan, 2010). Les cibles possibles des miARNs associés à la mitochondrie dans les modèles cellulaires HEK293 et HeLa sont impliquées dans le métabolisme des ARNs, la transcription, le métabolisme des protéines, la mort cellulaire, le cycle cellulaire et la réponse au stress (Sripada *et al.*, 2012). Toutes ces observations laissent penser que les miARNs associés à la mitochondrie peuvent contribuer activement à au développement de certaines pathologies.

3 : Impact fonctionnel des miARNs sur la Mitochondrie

Le rôle des miARNs dans la régulation des fonctions mitochondriales commence à être élucidé. Ces miARNs peuvent réguler, au niveau post-transcriptionnel, l'expression des protéines codées par le noyau et destinées à la mitochondrie et ainsi, leur dérégulation dans certaines pathologies peut affecter l'homéostasie mitochondriale, la fonction respiratoire, la synthèse d'ATP, l'apoptose, le stress oxydant et le métabolisme des acides gras (Aroor *et al.*, 2012). Les profils d'expression des

miARNs aussi bien dans les tissus que dans leurs mitochondries sont altérés en conditions pathologiques par rapport à des profils normaux. Par exemple, les profils d'expression des miARNs de cellules hépatiques de souris et de leurs mitochondries sont modifiés après induction d'un diabète de type 1 par action de la Streptozotocine : les niveaux de mmu-miR-494, mmu-miR-202-5p, mmu-miR-134 et mmu-miR-155 sont significativement augmentés dans des mitochondries de souris diabétiques, alors que les niveaux de mmu-miR-705 et mmu-miR-122 demeurent inchangés (Bian *et al.*, 2010). Plus récemment, une étude a montré un transport depuis le cytosol vers la mitochondrie du miARN hsa-miR-181c lors de l'infarctus du myocarde afin de réguler les niveaux du complexe IV et de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Das *et al.*, 2012). De même, hsa-miR-133a régule l'activité musculaire en ciblant l'expression du gène *nd1*, composant du complexe I de la chaîne respiratoire, lors de la différenciation des myoblastes (Barrey *et al.*, 2011).

4 : miARNs, métabolisme et biogénèse mitochondriale

La fonction fondamentale de la mitochondrie réside dans la production d'ATP via la phosphorylation oxydative afin de fournir l'énergie nécessaire aux activités de la cellule. Aussi, des miARNs affectant l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme oxydatif, la mise en place de la chaîne respiratoire ou la biogénèse mitochondriale permettent de réguler cette fonction.

L'altération du niveau de la protéine COXIV peut ainsi affecter la fonction mitochondriale. Un miARN spécifique du cerveau, miR-338, a été identifié comme un régulateur négatif de l'expression de cette protéine et sa surexpression conduit à une diminution des niveaux d'ARNm de COXIV et une réduction de la consommation en oxygène, du métabolisme mitochondrial et de la production d'ATP (Aschrafi *et al.*, 2008). La Glutaminase, une protéine importante du métabolisme oxydatif par la conversion de la glutamine en glutamate catabolisé par le cycle de Krebs ou utilisé comme substrat pour la synthèse de glutathion, est une cible des miARNs de la famille miR-23 (Gao *et al.*, 2009).

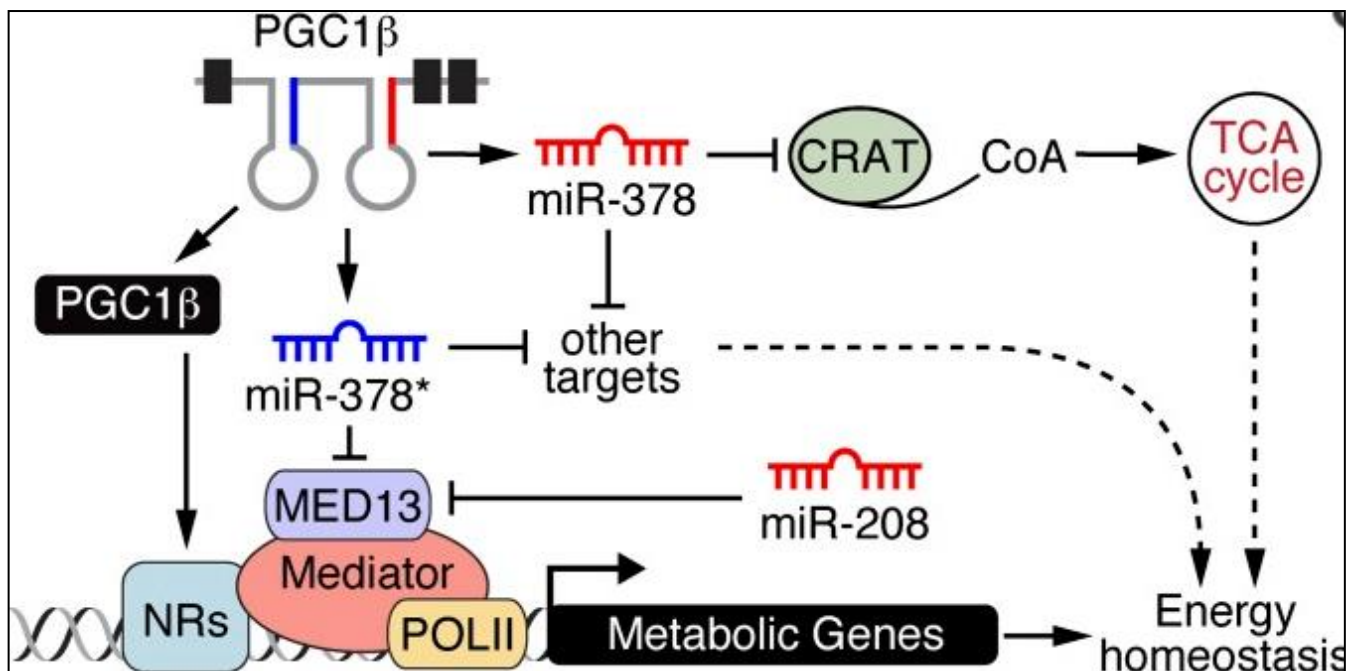


Figure I24: Diagramme schématique du rôle de miR-378 et miR-378* sur les fonctions mitochondriales et l'homéostasie énergétique.

PGC-1 β , coactivateur transcriptionnel des récepteurs hormonaux nucléaires (NRs), module le métabolisme grâce à un complexe médiateur. MED13, une sous-unité de ce complexe médiateur, est une cible de miR-378*, et Crat est une cible de miR-378. Crat est une enzyme mitochondriale impliquée dans le métabolisme oxydatif des acides gras via le cycle de Krebs. Ces deux miARNs font donc partie intégrante du circuit de régulation de ces fonctions en conditions de stress métabolique pour permettre l'adaptation des capacités oxydatives (D'après Carrer *et al.*, 2012).

La biogénèse mitochondriale peut être régulée par des miARNs au niveau de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans cette voie. Les coactivateurs de la superfamille PGC1, directement impliqué dans la biogénèse mitochondriale et la réponse à la demande accrue en ATP, font l'objet de plusieurs études. Chez la souris, miR-378 et miR-378* sont co-exprimés avec PGC1- β , ils vont permettre de réguler négativement l'expression de facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme oxydatif comme ERR- γ , NRF-1 et NRF-2 (Carrer *et al.*, 2012 ; Jeon *et al.*, 2013). Cette boucle de régulation négative permet de moduler le métabolisme énergétique PGC-1 β -dépendant afin d'assurer une homéostasie de la production énergétique (figure I24) (Carrer *et al.*, 2012). Dans le muscle squelettique murin, PGC-1 α est retrouvé négativement régulé par miR-696. Ce miARN est surexprimé lorsque le muscle est au repos, il doit donc permettre de réduire les niveaux importants de PGC-1 α engendrés par l'effort afin revenir à un niveau normal de production énergétique. Une surexpression de ce miARN conduit à une réduction de la β -oxydation des acides gras et du contenu mitochondrial (Aoi *et al.*, 2010). Lors de l'effort musculaire ou de la différenciation des myoblastes en myocytes, miR-494 est sous-exprimé. L'identification de ses cibles potentielles a mis en évidence une boucle de rétrocontrôle impliquant PGC-1 α , NRF-1 et TFAM (Yamamoto *et al.*, 2012). TFAM est régulé négativement par ce miARN, mais positivement par NRF-1. MiR-494 participe donc, dans une certaine mesure, à l'homéostasie énergétique (Yamamoto *et al.*, 2012).

Les mitochondries forment un réseau dynamique enchaînant biogénèse, fusion et fission afin de répondre aux demandes énergétiques de la cellule (Tatsuta et Langer, 2008). La biogénèse mitochondriale implique une répllication de l'ADNmt et une augmentation de la masse. Des miARNs sont impliqués dans cette dynamique, les miARNs de la superfamille miR-30 (miR-30a, -30b, -30c, -30d, -30e) sont abondamment exprimés dans le cœur et ciblent directement l'expression de p53 (Li *et al.*, 2010). miR-30a a été récemment identifié comme un régulateur de l'expression du gène *becn1* (Zou *et al.*, 2012), qui code pour la protéine Beclin 1 capable d'induire la mitophagie. Beclin 1 peut

ainsi contrôler cette mitophagie après dissociation du complexe Bcl-2/Beclin-1 induite par le complexe BNIP3/NIX, observable en conditions hypoxiques (Mazure et Pouyssegur, 2010). Ces deux protéines mitochondriales, dont l'expression est induite par l'hypoxie, interagissent Bcl-2 au niveau de la membrane mitochondriale externe, la libération de Beclin-1 conduit à la surexpression des protéines de fission (DRP-1 et FIS-1) et une sous-expression des protéines de fusion (Mfn1, Mfn2 et Opa1) (Salminen *et al.*, 2013). La fission mitochondriale requiert l'activité de DRP1 (*dynamamin-related protein-1*), une GTPase causant la scission de la membrane externe de la mitochondrie directement régulée par p53 (Frank *et al.*, 2001). Ces miARNs régulent donc la fission mitochondriale et l'apoptose au travers d'une régulation de l'axe p53/DRP1 (Li *et al.*, 2010). P53 régule également l'expression de miR-499, un miARN abondant dans les cardiomyocytes (Kim *et al.*, 2006). Ce miARN prévient l'apoptose en ciblant la calcineurine, une protéine qui va déphosphoryler et activer DRP1, conduisant à une fission de la mitochondrie et à l'apoptose (Wang *et al.*, 2011). Le maintien de l'équilibre mitochondrial est très complexe, et d'autres facteurs majeurs sont impliqués dans la régulation de cette dynamique comme la Mitofusine et FIS-1 (*fission 1*) et leur régulation par des miARNs restent à élucider.

C : miARN et Cancers

De nombreuses études montrent que des dérégulations de l'expression de miARNs sont corrélées à l'initiation et la progression de tumeurs humaines. Un nombre croissant de miARNs est identifié et relié à la promotion ou à la suppression de la tumorigenèse dans de nombreux tissus. Les miARNs peuvent donc agir comme oncogènes ou bien comme suppresseurs de tumeurs en stimulant ou inhibant l'expression de gènes impliqués dans le cancer (Stahlhut Espinosa et Slack, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007). Pour cette raison, une expression anormale de miARNs peut être assimilée à une caractéristique commune des cancers. Les miARNs jouent donc un rôle dans les différentes caractéristiques du développement cancéreux, mais ils peuvent également être utilisés comme

biomarqueurs, outils pronostiques et diagnostiques, ou bien encore comme des cibles thérapeutiques.

1 : miRNA et Fonctions

La première étude référençant des anomalies d'expression de miARNs dans des échantillons tumoraux se concentrait sur la leucémie lymphoïde chronique de cellules B (LLC-B), avec une sous-expression de miR-15 et de miR-16 chez des patients atteints de cette pathologie (Calin *et al.*, 2002). Des miARNs surexprimés peuvent fonctionner comme oncogènes en diminuant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou de gènes contrôlant la différenciation cellulaire ou l'apoptose, et *a contrario*, on peut observer une sous-expression de miARNs agissant comme suppresseurs de tumeurs et capable de réguler négativement l'expression d'oncogènes et/ou de gènes contrôlant la différenciation cellulaire ou l'apoptose (He *et al.*, 2005 ; He *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2007). La surexpression de miARNs dans des cancers humains peut résulter d'une amplification, d'une dérégulation de la transcription ou d'une déméthylation des îlots CpG de la région promotrice du pri-miARN. Au contraire, la sous-expression peut être liée à des délétions, à une inhibition épigénétique ou la perte d'expression de facteurs de transcription (Croce, 2008). *In vivo*, la déplétion globale des miARNs par *Knock-down* de Dicer et donc de leur biogenèse stimule la tumorigenèse (Kumar *et al.*, 2007). Les différentes fonctions affectées par les miRNAs sont donc multiples.

1.1 Apoptose

Les cellules cancéreuses peuvent échapper à l'équilibre entre facteurs pro- et anti-apoptotiques qui assurent la survie cellulaire en cas de stress environnemental (Bao *et al.*, 2004). La résistance aux signaux apoptotiques constitue une caractéristique importante de la progression tumorale (George et Mittal, 2010 ; Hanahan et Weinberg, 2000). Des miARNs pro-apoptotiques comme miR-15 et miR-16, ciblant le facteur anti-apoptotique Bcl-2, peuvent inhiber le développement tumoral, Bcl-2 est sous-exprimé entraînant l'ouverture de pores mitochondriaux, libération de cytochrome c et

activation de la voie des caspases, enzymes effectrices de l'apoptose (Cimmino *et al.*, 2005). Il n'est donc pas étonnant de retrouver des niveaux importants de Bcl-2 dans des lymphocytes B normaux où miR-15 et miR-16 sont fortement exprimés (Calin *et al.*, 2007). Par contre, une délétion en 13q14.3 contenant ces deux clusters de miARNs est observée dans le cas d'une LLC-B (Calin *et al.*, 2007). De même, les membres de la famille miR-34 (miR-34a-c) sont sous-exprimés dans de nombreux types de cancers humains. Cette famille est associée à la régulation du facteur pro-apoptotique p53. Une sous-expression de ce miARN réduit la mort cellulaire p53-dépendant tandis qu'une surexpression conduit à l'apoptose en inhibant l'expression de gènes tels Bcl-2 ou Cdk-4 (He *et al.*, 2007 ; Bommer *et al.*, 2007). miR-21, dont l'expression est fréquemment retrouvée dérégulée dans des cancers humains (Volinia *et al.*, 2006), constitue également un régulateur de l'apoptose (Cheng *et al.*, 2005). Sa sous-expression inhibe la progression de tumeurs mammaires *in vivo* et la croissance cellulaire *in vitro*, en association avec une augmentation de l'apoptose et une sous-expression de Bcl-2 (Si *et al.*, 2007). *A contrario*, sa surexpression réduit la mort cellulaire et promeut l'angiogenèse et l'invasion d'hépatocarcinomes (Gramantieri *et al.*, 2008).

1.2 Prolifération

Chez les mammifères, l'homéostasie requiert un contrôle étroit de la prolifération, permis grâce à l'action concertée de signaux mitogéniques et antiprolifératifs (Elliott et Blobel, 2005). Plusieurs miARNs ont été rapportés comme interférant avec la régulation du cycle cellulaire par interactions avec d'importants régulateurs comme PTEN, Myc ou Ras (Bueno *et al.*, 2008). Parmi ces miARNs, on peut citer miR-21, surexprimé dans les cancers du sein, où l'injection d'anti-miR-21 conduit, *in vitro*, à une suppression de la croissance cellulaire (Si *et al.*, 2007). Dans les hépatocarcinomes, il inhibe l'expression de PTEN et induit donc la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (Meng *et al.*, 2007). Le rôle des miARNs dans la prolifération cellulaire n'est pas limité à des actions pro-prolifératives. Certains possèdent en effet une activité antiproliférative, comme la famille let-7 qui

inhibe l'expression de multiples oncogènes comme Ras ou c-Myc (Johnson *et al.*, 2007 ; Sampson *et al.*, 2007).

1.3 Réponse immunitaire

Les cellules cancéreuses subissent de nombreux changements et acquièrent la capacité de diminuer la réponse immunitaire anti-tumorale et d'échapper à la surveillance du système immunitaire (Whiteside, 2008). Certains miARNs s'expriment de manière spécifique dans le système immunitaire, ce qui peut laisser penser qu'ils jouent un rôle dans cette fonction. Une partie d'entre eux contribuent à la modulation de la réponse immune innée et adaptative, comme miR-181a, miR-132 et miR-155 (Li *et al.*, 2007 ; Lindsay, 2008 ; Rodriguez *et al.*, 2007), et une autre partie joue un rôle dans la réponse immunitaire anticancéreuse, comme miR-155 et miR-17-92 (Thaï *et al.*, 2007) : miR-155 contrôle les mécanismes de différenciation des cellules immunitaires humaines, spécialement celle des lymphocytes T helper afin de produire de façon optimale des anticorps (Thaï *et al.*, 2007). Il cible en effet de nombreux gènes codant pour des cytokines (IL-4), des chemokines (CCL5) et des facteurs de transcription (c-Maf) impliqués dans la fonction immunitaire normale (Rodriguez *et al.*, 2007). Il est retrouvé fortement exprimé dans des lymphomes à cellules B humains (Eis *et al.*, 2005). De son côté, mi-17-92 est souvent surexprimé dans des lymphomes et autres cancers et son absence entraîne une augmentation des niveaux de Bim (*Bcl2-interacting mediator gamma*) et une inhibition du développement des cellules B (Ventura *et al.*, 2008). Des souris transgéniques, avec une expression élevée de miR-17-92 dans leurs lymphocytes, développent une auto-immunité et des maladies lymphoprolifératives conduisant à une mort prématurée (Xiao *et al.*, 2008).

1.4 Immortalité

Les cellules humaines normales ont une capacité de réplication limitée à 50-70 divisions. Passé cette limite, les cellules deviennent sénescentes et incapables de continuer à se diviser. La sénescence cellulaire est une méthode de prévention du développement tumoral car il conduit à la suppression de la prolifération des cellules endommagées ou stressées qui présentent un risque de transformation maligne (Campisi, 2005). Ainsi, la majorité des cellules cancéreuses acquièrent une capacité répliquative illimitée. Cette immortalisation est un prérequis essentiel à la formation d'une cellule cancéreuse, elle est permise soit par une suractivité de la télomérase, permettant le maintien des télomères, soit à un allongement de ces télomères (Hanahan et Weinberg, 2000). Des miARNs ont été identifiés comme régulateurs de cette capacité de réplication sans fin. Ainsi miR-290 peut directement cibler la protéine Rbl2 (*Retinoblastoma-like 2*) régulant l'expression de *Dnmt* (DNA Méthyle-transférase) dépendant de Rbl2, ce qui affecte indirectement l'intégrité des télomères et le maintien de leur longueur (Benetti *et al.*, 2008). Dans des cellules en sénescence, miR-24 est sous-exprimé ce qui induit une surexpression d'une de ses cibles, le suppresseur de tumeurs p16(INK4a). Par contre, dans des cellules de carcinomes cervicaux, le maintien de l'expression de miR-24 permet le maintien de la prolifération (Lal *et al.*, 2008).

1.5 Instabilité génomique

Les défaillances des mécanismes de réparations de l'ADN et de contrôle du cycle cellulaire résultent en une instabilité génomique et une prédisposition au développement d'un cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). Chez l'Homme, il a été rapporté que miR-17 et miR-20a, deux miARNs régulés par c-Myc, gouvernent la transition G0 à G1 du cycle cellulaire dans des cellules normales (Pickering *et al.*, 2009). L'inhibition de ces miARNs entraîne une accumulation de cassures sur l'ADN double brin, une accumulation du facteur de transcription E2F1 conduisant à l'activation du point de contrôle du cycle cellulaire en phase G1 (Pickering *et al.*, 2009). En effet, près de la moitié des

clusters de miARNs sont localisés sur des sites chromosomiques fragiles ou des régions d'instabilité génomique, et ces zones sont associées à une grande variété de cancers humains (Calin *et al.*, 2002 ; Calin *et al.*, 2004 ; Sevignani *et al.*, 2007). Dans de nombreux cas, les niveaux de miARNs sont corrélés avec des changements du nombre de leur loci (Zhang *et al.*, 2006). Des réarrangements chromosomiques du locus de *hmg2* (*High-mobility group AT-hook 2*) de plusieurs tumeurs humaines coupent le cadre de lecture de la région 3'UTR de gènes ciblés par la famille de miARN let-7 (Lee et Dutta, 2007). Enfin, des cellules cancéreuses avec des mutations créant une régulation négative par miARN de gènes suppresseurs de tumeurs ont un avantage sélectif par rapport aux cellules normales (Mayr *et al.*, 2007).

1.6 Angiogenèse

La néovascularisation tumorale est un élément clé de la survie des cellules néoplasiques. Cette angiogenèse résulte d'un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (Jain, 2005). Les enzymes Drosha et Dicer impliquées dans la biogenèse des miARNs, ne participent pas uniquement à leurs maturations mais impactent également l'angiogenèse par dérégulation de l'expression de gènes associés *in vitro* et *in vivo* (Chen et Gorski, 2008). MiR-221 et miR-222 inhibent la migration des cellules endothéliales, ainsi que leur prolifération et l'angiogenèse *in vitro*, en ciblant le facteur c-Kit, un récepteur tyrosine-kinase activateur de plusieurs voies métaboliques comme les MAPK et la voie AKT/mTOR. Ainsi une mutation au niveau de ces miARNs peut conduire à une activation du proto-oncogène c-Kit et donc une induction de l'angiogenèse (Kuehbacher *et al.*, 2008). Les VEGF A, B et C (*Vascular endothelial growth factor*) sont une cible des miR-15b et miR-16, et une surexpression de ces-derniers entraînent une inhibition de l'angiogenèse contrôlée par VEGF (Hua *et al.*, 2006). L'expression du facteur VEGF-C peut-être induite par miR-378, surexprimée dans plusieurs tumeurs solides, et qui entre en compétition avec miR-125a partageant la même séquence cible (Hua *et al.*, 2006). En inhibant l'expression de deux suppresseurs de tumeurs (*sufu* et *fus-1*), miR-378 peut être

qualifié d'oncogène en induisant la survie et la croissance des cellules tumorales et le développement des vaisseaux sanguins (Lee *et al.*, 2007). Enfin, les facteurs de croissance angiogéniques de cellules de gliomes augmentent les niveaux d'expression de miR-296 (Wurdinger *et al.*, 2008). Cette étude montre également une surexpression de miR-296 dans des cultures primaires de cellules endothéliales de vaisseaux sanguins tumoraux issus de tumeurs de cerveau humain par rapport à des cellules endothéliales normales de cerveau humain (Wurdinger *et al.*, 2008).

1.7 Invasion et Métastases

L'invasion tumorale et les métastases consistent en de nombreux mécanismes, tels le déglissement cellulaire, la mobilité dans un microenvironnement, la dégradation de la matrice extracellulaire du tissu hôte et le mouvement cellulaire (Chambers *et al.*, 2002). Les miARNs coordonnent les programmes complexes d'expression des gènes impliqués dans ces processus et jouent donc un rôle important dans l'invasion et les métastases (Bracken *et al.*, 2009). Plusieurs miARNs ont donc été identifiés comme médiateurs, tel miR-10b retrouvé surexprimé dans des métastases du cancer du sein où il régule positivement la migration cellulaire et l'invasion (Ma *et al.*, 2007b). Une surexpression de ce miARN dans des tumeurs mammaires non métastatiques initie la formation de métastases, en inhibant la synthèse de HOXD10 inhibitrice de la protéine pro-métastatique RhoC (Ma *et al.*, 2007b). miR-21 peut également induire les métastases en inhibant la synthèse des facteurs PTEN, PDCD4 (*Programmed cell death protein 4*), TPM1 (*tropomyosin 1*) et Maspine (*mammary serine protease inhibitor*), tous régulateurs négatifs à la fois de la croissance, de la migration et de l'invasion (Asangani *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2008). D'autres miARNs ont été assimilés à des suppresseurs de métastases dans le cancer du sein humain, à savoir miR-335, miR-206 et miR-126, leur expression étant inversement proportionnelle à la distance entre la tumeur primitive et la métastase (Tavazoie *et al.*, 2008).

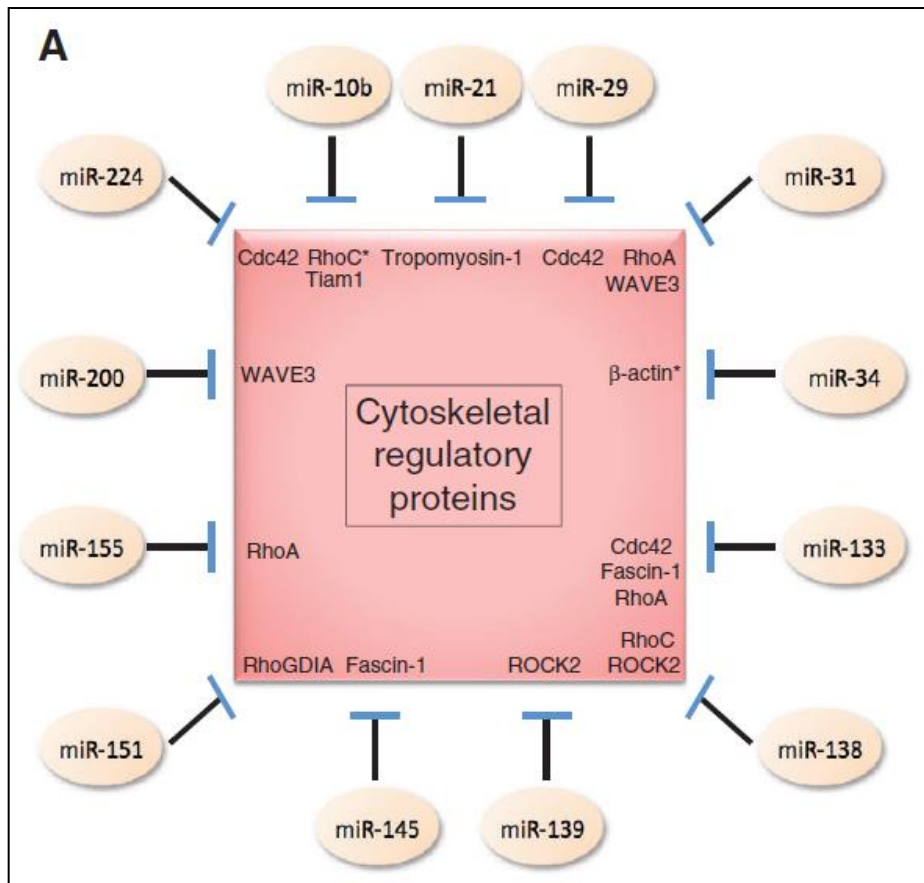


Figure I25 : Schéma résumant les miARNs décrits comme modulateur de l'expression de protéines régulatrices du cytosquelette (D'après Valastyan et Weinberg, 2011).

1.8 Dynamique du Cytosquelette et Métabolisme mitochondrial

Le cytosquelette d'actine est une entité très dynamique, et la moindre perturbation des taux de polymérisation ou de dépolymérisation peut causer des changements importants dans le comportement de la cellule. En conséquence, cette dynamique est étroitement contrôlée en conditions normales. L'un des éléments contrôlés réside dans l'expression des protéines de la superfamille de GTPases Rho. Certains miARN (résumés dans la figure 125) sont capables de réguler certains des membres de cette famille (Valastyan et Weinberg, 2011). Ce contrôle ne s'applique pas uniquement sur la modulation de l'expression de ces protéines mais également sur la liaison du GTP nécessaire à l'activation de ces GTPases. Parmi ces miARNs, on peut citer miR-34a qui régule indirectement l'expression de la β -actin (Valastyan et Weinberg, 2011) et de Rho-a (Kim *et al.*, 2011). Ce miARN peut donc déclencher le désassemblage des fibres d'actine et les remplacer par des microfilaments (Kim *et al.*, 2011).

Les miARNs sont des médiateurs clé de l'induction de la voie glycolytique associée à la carcinogénèse que ce soit directement ou au niveau des oncogènes impliqués. Ainsi la régulation se fait à plusieurs niveaux. Tout d'abord au niveau des acteurs de la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses (Gao *et al.*, 2012). Parmi ces acteurs, le proto-oncogène c-Myc induit l'expression du cluster de miARNs miR-17-92 impliqué dans la prolifération (O'Donnel *et al.*, 2005) et inhibe celle de miR-23a un inhibiteur de la Glutaminase (Gao *et al.*, 2009), permettant à la cellule cancéreuse de proliférer en conditions hypoxiques à partir du métabolisme de la Glutamine. L'expression de HIF-1 α , le second grand régulateur de l'homéostasie oxydative, peut être augmentée par l'action de miR-21 afin de stimuler l'angiogénèse (Gramantieri *et al.*, 2008), ou inhibée par l'action indirecte de miR-378*, qui régule également négativement l'expression des effecteurs du métabolisme oxydatif (Carrer *et al.*, 2012 ; Jeon *et al.*, 2013). Enfin, le suppresseur de tumeurs p53 est une cible privilégiée de nombreux miARNs (Li *et al.*, 2010 ; He *et al.*, 2007) et son inactivation

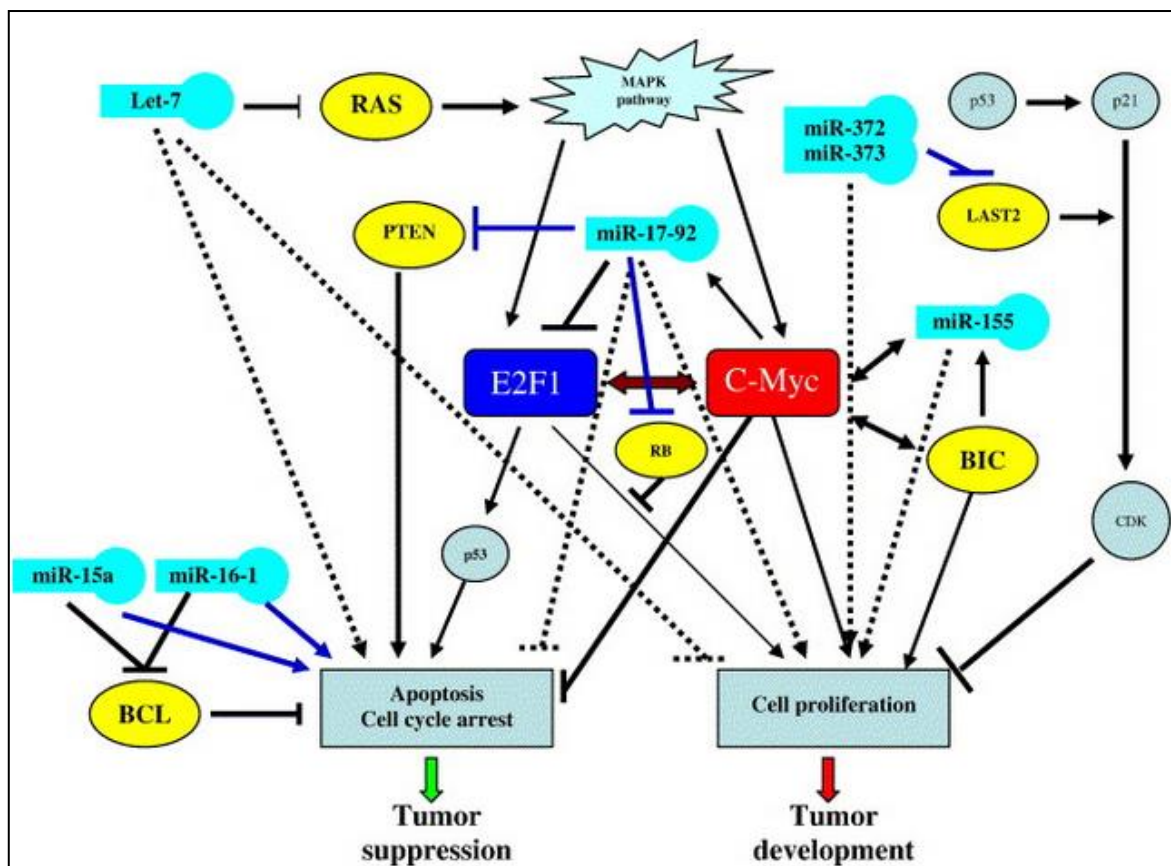


Figure I26 : Model schématique montrant les mécanismes moléculaires de miARNs impliqués dans la tumorigénèse.

Les miARNs peuvent être impliqués de plusieurs manières dans les cancers, particulièrement, en régulant directement la croissance cellulaire et indirectement l'apoptose via le ciblage de facteurs de transcription ou de voies signalétiques. Dans cet exemple, let-7, miR-15a et miR-16-1 fonctionne comme suppresseur de tumeurs alors que miR-17-92, miR-155, miR-372 et miR-373 sont considérés comme oncogènes. Les lignes en pointillés représentent les interactions indirectes tandis que les lignes noires sont des interactions directes confirmées par expérimentations et les lignes bleues des interactions à confirmer (D'après Zhang *et al.*, 2007).

BCL2 : B cell lymphoma 2, an antiapoptotic gene ; BIC : an evolutionarily conserved non-coding RNA ; CDK : cyclin dependent kinase ; c-Myc : an oncogenes ; E2F1 : a cell cycle transcription factor ; LAST2 : Large Tumor Suppressor homolog 2, a serine-threonine kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; p53 : a critical tumor suppressor that is involved in most, if not all, tumorigenesis ; PTEN : phosphatase and tensin homology, a tumor suppressor gene ; RAS : a common proto-oncogene.

résulte en une perte de sa fonction de contrôleur de la régulation métabolique et une glycolyse augmentée (Johnson et Perkins, 2012). Les miARNs peuvent également agir au niveau des différentes étapes du métabolisme glucidique, comme sur les transporteurs du Glucose (GLUT1-4) régulés indirectement par les miARNs affectant l'expression de p53 (Kondoh *et al.*, 2005) ou directement par certains miARNs (Singh *et al.*, 2011), ou bien sur l'activité des enzymes glycolytiques et sur la production de lactates (Singh *et al.*, 2011).

2 : Modes d'Action

Les miARNs affectant aussi bien la croissance cellulaire que la fonction apoptotique, ils peuvent être assimilés à une nouvelle classe d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs (figure I26).

2.1 miARNs : suppresseurs de tumeurs

Comme certains gènes, un miARN peut agir comme suppresseur de tumeurs dès lors que sa perte de fonction peut initier ou contribuer à la transformation maligne d'une cellule normale. Les miARNs suppresseurs de tumeurs préviennent généralement le développement tumoral en régulant négativement l'expression d'oncogène et/ou de gènes contrôlant la différenciation cellulaire et l'apoptose, comme par exemple let-7. Une expression inappropriée de ce-dernier résulte en une perte de différenciation, ce qui constitue l'un des marqueurs de l'oncogenèse (Johnson *et al.*, 2005). Chez l'Homme, let-7 est localisé dans une région fréquemment délétée dans les cancers (Calin *et al.*, 2004). Une surexpression de ce miARN dans des cellules de la lignée A549, issue d'un adénocarcinome pulmonaire, conduit à une inhibition de la croissance cellulaire (Takamizawa *et al.*, 2004). Les tissus cancéreux présentant une diminution de l'expression de let-7, présentent également des niveaux plus élevés de la protéine RAS par rapport à des tissus normaux. Ceci permet de vérifier l'hypothèse présentant l'oncogène *ras* comme cible potentielle de let-7 (Johnson *et al.*, 2005). Un autre cluster de miARNs suppresseurs est représenté par la famille miR15a/16-1, localisé dans la région 13q14.3. Cette région est le siège d'une délétion fréquente dans les leucémies LLC-B

(Döhner *et al.*, 2000 ; Calin *et al.*, 2002). Ainsi les niveaux des miARNs de ce cluster sont significativement plus bas dans des LLC-B en comparaison à des lymphocytes CD5+ issus d'un donneur sain (Calin *et al.*, 2002). En plus de la délétion, une mutation, associée à une perte de l'allèle normal, est responsable de la sous-expression du cluster pour certains patients atteint de LLC-B (Calin *et al.*, 2005). La preuve d'une activité suppressive est apportée par l'augmentation importante de l'expression de la protéine antiapoptotique BCL-2 dans ce type de leucémie et identifiée comme cible de l'ARNi par le cluster miR-15a/16-1 (Cimmino *et al.*, 2005). La famille miR-29 comprend trois isoformes arrangées en deux clusters, miR-29b-1/miR-29a en position 7q32 et miR-29b-2/miR-29c en position 1q23. La région 7q32 est une région fréquente de délétion des myélodysplasies et des leucémies myéloïdes aigües (LMA) (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1995). Les membres de la famille miR-29 sont également sous-exprimés dans des LLC-B, des cancers pulmonaires, des cancers mammaires invasifs et des cholangiocarcinomes (Garzon *et al.*, 2008 ; Iorio *et al.*, 2005 ; Mott *et al.*, 2007 ; Yanaihara *et al.*, 2006). L'induction d'une surpression de miR-29b, dans des lignées issues de cholangiocarcinomes et de cancers pulmonaires, entraînent une augmentation de l'apoptose et une réduction de la tumorigénicité, en inhibant l'expression de l'oncogène *tcl-1* et de la protéine antiapoptotique MCL-1 (Fabbri *et al.*, 2007 ; Mott *et al.*, 2007).

2.2 miARNs : oncogènes

Les miARNs dont l'expression est augmentée dans des tumeurs peuvent être considérés comme des oncogènes. Ces miARNs, ou « oncomirs », induisent le développement tumoral en inhibant négativement l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou de gènes contrôlant la différenciation et l'apoptose. L'oncomir miR-155 a été l'un des premiers décrits (Metzler *et al.*, 2004), intégré dans le complexe non-codant BIC (*B-cell Integration Cluster*) localisé en position 21q35 (Tam *et al.*, 2002). Il est surexprimé dans des lymphomes de Burkitt (Metzler *et al.*, 2004), dans la maladie de Hodgkin (Kluiver *et al.*, 2005), des lymphomes non-hodgkiniens (Kluiver *et al.*, 2005), des LLC-B

(Calin *et al.*, 2005), des AML (Garzon *et al.*, 2008), des cancers pulmonaires (Yanaihara *et al.*, 2006) et des cancers du sein (Iorio *et al.*, 2005). Le complexe BIC est retrouvé co-exprimé avec l'oncogène *c-myc* dans des fibroblastes de poulet où il induit une augmentation de la prolifération cellulaire (Tam *et al.*, 2002). Dans des souris transgéniques sur-exprimant miR-155, on observe une prolifération des cellules B suivie d'une malignité complète de ces cellules (Costinean *et al.*, 2006). De par sa surexpression dans de nombreux cancers, au nombre desquels on trouve les LMA (Garzon *et al.*, 2008), les LLC-B (Calin *et al.*, 2005), les glioblastomes (Ciafre *et al.*, 2005) ainsi que les cancers du pancréas, de la prostate, de l'estomac, du colon, des poumons, du sein et du foie (Meng *et al.*, 2007), miR-21 peut être classé parmi les oncomirs. En effet, sa surexpression dans des cellules de glioblastomes bloque l'apoptose (Chan *et al.*, 2005) alors que sa répression dans des cultures de ces cellules ou de cancers du sein conduit à l'activation de la voie des caspases et donc à l'apoptose en ciblant directement PTEN (Meng *et al.*, 2007), PDCD4 (Frankel *et al.*, 2008) et TPM1 (Zhu *et al.*, 2007). Le cluster miR-17-92, comprenant six miARNs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92-1) et localisé en position 13q31.3, est fréquemment amplifié dans des lymphomes folliculaires (Ota *et al.*, 2004). Ses membres sont également surexprimés dans d'autres cancers, incluant le sein, le colon, les poumons, le pancréas, la prostate et l'estomac (Mendell, 2008) et leur expression est transactivée par *c-Myc* (O'Donnell *et al.*, 2005). Ces miARNs régulent le cycle cellulaire et la prolifération via le facteur de transcription E2F assurant la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à S (O'Donnell *et al.*, 2005). En plus de ces effets anti-apoptotiques, les membres du cluster miR-17-92 régulent négativement deux autres cibles, PTEN et p21 (Petrocca *et al.*, 2008).

Il est important de noter que certains miARN peuvent agir comme oncogène ou comme suppresseur de tumeurs selon le tissu et son transcriptome, ce qui inclue l'expression tissu-spécifique des cibles de ce miARNs.

3 : miARNs : Biomarqueurs et cibles thérapeutiques

Les profils d'expression des miARNs diffèrent entre les tissus, donc l'utilisation de puces miARN doit permettre d'établir des profils d'expression très précis et permettre une classification des tumeurs. Cette classification est permise par l'une des propriétés des miARNs, à savoir qu'un miARN a plusieurs cibles, et donc seuls quelques miARNs sont nécessaires pour prédire précisément l'origine tissulaire d'une tumeur (Lu *et al.*, 2005a). La découverte de signature distincte de miARN permettra donc d'améliorer la classification moléculaire d'un cancer, ainsi qu'une base solide pour le diagnostic et le pronostic.

Il est possible d'appréhender les miARNs pour une approche thérapeutique. En effet, le fait qu'un miARN puisse être impliqué dans plusieurs voies métaboliques altérées au cours de l'oncogenèse, suggère que la modulation de ce simple miARN peut éventuellement permettre de rétablir, ou du moins contribuer à le faire, ces divers métabolismes simultanément. De plus, les études ont montré que généralement un petit groupe de miARN se retrouve dérégulé dans une grande variété de tumeurs. Ainsi, développer des thérapies d'inhibition ou de rétablissement de l'expression de ces miARNs pourra affecter un large groupe de tumeurs.

3.1 Polymorphismes

La liaison du miARN sur l'ARNm cible est une étape critique de la régulation des niveaux d'ARNm et d'expression de protéines. Cependant, cette fixation peut être affectée par des polymorphismes d'un nucléotide, ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism), qui peut se trouver au niveau du site d'interaction et ainsi supprimer des sites de fixation existants, ou en créer des illégitimes (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, l'augmentation ou la diminution de fixation du miARN sur ses cibles secondaire à un SNP conduit à une dérégulation de l'expression de la protéine associée. De ce fait, la dérégulation par SNP de l'expression d'un suppresseur de tumeurs ou d'un oncogène contribuera à la tumorigenèse (Zhang *et al.*, 2007).

Plusieurs protéines ou complexes protéiques sont impliqués dans la biogenèse des miARNs, aussi bien au niveau de leur transcription que de leur maturation, leur exportation et leur ciblage. Ces protéines incluent l'ARN Pol II, Drosha, l'exportin-5/Ran-GTP, les protéines des pores nucléaires, Dicer et les protéines de la famille Argonaute du complexe RISC. Le polymorphisme n'est donc pas uniquement présent dans les précurseurs de miARNs mais peut également être lié aux protéines impliquées dans leur biogenèse. Ce polymorphisme affectant la régulation par des miARNs, ou polymorphisme-miR, peut être classé en trois catégories : - lié à la séquence cible du miARN ; - lié à la séquence du miARN mature ; - lié à la biogenèse du miARN.

3.1.1 Au niveau de la séquence cible du miARN

Le miR-polymorphisme localisé au niveau de la séquence 3'-UTR du gène ciblé est le plus important dans le génome humain. Il impacte uniquement la fixation du miARN à l'ARNm et donc indirectement l'expression normale de la protéine. Cette région 3'UTR consiste en une région cible complémentaire de la séquence « seed » du miARN, et une région tolérant un certain niveau de non-complémentarité avec le reste de la séquence du miARN, nommé séquence de liaison à la 3'-MTR (3'-*Mismatch Tolerant Region*) (George et Mittal, 2010). Aussi la séquence de liaison joue un rôle important dans la reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN, et un polymorphisme l'affectant aura une plus grande probabilité d'altérer l'action du miARN comparé à un polymorphisme affectant la séquence 3'-MTR. Contrairement aux interactions ADN-protéines, les interactions ARNm-protéines sont basées sur la présence de motif de structure secondaire sur l'ARNm. Des mutations peuvent donc créer ou supprimer des structures secondaires à proximité du site de fixation du miARN et influencer la répression de la traduction en affectant l'accessibilité du miARN à son site cible (Kertesz *et al.*, 2007). Dans le cadre d'une liaison multiple de plusieurs miARNs en coordination sur une même séquence 3'UTR, l'interaction de certains d'entre eux peut induire une reconfiguration de la structure secondaire de l'ARNm dans les régions avoisinantes et ainsi permettre la fixation des autres miARNs,

Une altération de ces sites peut potentiellement influencer l'accessibilité du complexe miARN/RISC (Hon et Zhang, 2007).

3.1.2 Au niveau de la séquence du miARN mature

Un miARN est composé de 2 régions, en 5' au niveau des nucléotides 2-7, la séquence « seed » permettant la reconnaissance spécifique de la cible et le reste de la séquence dont la complémentarité parfaite n'est pas nécessaire, appelée région 3'-MTR. Il a été montré chez *arabidopsis* qu'une mutation dans la séquence même de miR-319a conduit à une perte totale de fonction de ce miARN, mais que celle-ci est compensée par les autres membres de la famille miR-319 (Warthmann *et al.*, 2008). Ce miR-polymorphisme de séquences matures peut affecter soit la séquence « seed » en 5' soit la 3'-MTR.

Dans le premier cas, les séquences « seed » étant relativement courtes et bien conservées, peu de polymorphismes sont retrouvés à ce niveau en comparaison aux polymorphismes observables sur les séquences cibles des ARNm. Selon Saunders *et al.*, cette probabilité est inférieure à 1% (Saunders *et al.*, 2007). Ainsi, un SNP peut soit abolir ou affaiblir les interactions avec un ARNm cible, ou bien créer un site de reconnaissance avec un ARNm non ciblé en conditions normales (Evans *et al.*, 2007). Maintenant, un miARN pouvant affecter l'expression de centaines de gènes, il est nécessaire de multiplier les validations expérimentales.

Dans le second cas, les séquences 3'-MTR sont capables de tolérer un certain niveau de non-appariement avec la séquence cible, elle peut donc également tolérer un certains nombres de SNPs. Par contre, une accumulation de SNPs, d'insertions, de délétions ou de translocations d'importantes séquences dans ces régions peut affecter la régulation de la traduction par les miARNs.

3.1.3 Altérant la biogenèse des miARNs

Il a été proposé que le polymorphisme puisse affecter l'expression de protéines impliquées dans la biogenèse des miARNs et dans leur action, comme Drosha ou Dicer entre autres, et donc perturber la régulation par les miARNs au sein de la cellule. Ces protéines affectant l'ensemble de la biogenèse des miARN, un KO de toutes ou parties de celles-ci est létal chez la souris. Un polymorphisme qui affecte l'expression de ces protéines doit également affecter la synthèse ou la maturation des miARNs. Dans des cellules de lymphomes humains BCBL-1 (*Body-Cave-Based Lymphoma*) infectées par un herpes-virus KSHV (*Kaposi's Sarcoma Herpes Virus*), un polymorphisme dans la structure tige-boucle d'un précurseur de miARN viral (miRK5) réduit l'action de Drosha et donc l'expression de miARN mature (Gottwein *et al.*, 2006). Finalement, le fait que les variations d'expression des miARNs puissent avoir de profondes conséquences au niveau de la cellule, des polymorphismes affectant les protéines responsables des différentes étapes de la biogenèse des miARNs dérégleront la transcription des miARNs, leur maturation, leur exportation et le ciblage des ARNm, ce qui pourra avoir des effets délétères sur la cellule. Les travaux de de la Chapelle ont montré, par exemple, qu'un SNP au niveau du transcrit primaire du miARN-146a, affecte la biogenèse et l'expression du miARN mature (Jazdzewski *et al.*, 2008 ; Jazdzewski *et al.*, 2009). Ce polymorphisme d'un unique miARN va prédisposer à une forme agressive de cancer papillaire thyroïdien, et, en association avec la surexpression d'autres miARNs tels miR-221 et miR-222 impliqués dans la régulation de voies de signalisation (principalement PTEN, AKT et PI3K) induire la carcinogenèse thyroïdienne (de la Chapelle et Jazdzewski, 2011).

3.2 Biomarqueurs

Beaucoup de miARNs sont exprimés de façon spécifique et différentielle dans des tissus cancéreux comparés aux tissus normaux adjacents. Par exemple, let-7 est sous-exprimé dans les cancers du poumon mais pas dans d'autres cancers comme le cancer du sein ou du colon (Johnson *et*

al., 2005). Les analyses par puces miARNs indiquent que les profils d'expression de miARNs constituent un très bon indicateur de distinction entre tissus sains et tissus cancéreux, et permettent une classification précise, et ce, même pour des tumeurs faiblement différenciées (Lu *et al.*, 2005a).

3.3 Outil pronostique et diagnostique

De par leurs petites tailles, les miARNs sont relativement résistants aux RNases, ce qui en fait de bons candidats à la détection dans les fluides biologiques et/ou les tissus solides (Lawrie, 2008). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études transcriptomiques ont été réalisées dans le but d'établir des signatures ARNm spécifiques de pathologies à des fins pronostiques. Cependant, la nécessité de matériel tumoral frais, les soucis de reproductibilité entre plateformes, les analyses bio-informatiques fastidieuses et les coûts relativement importants, rendent ces techniques difficiles d'utilisation en pratique clinique. Aussi, pour identifier l'origine tissulaire de tumeurs peu différenciées, l'utilisation des profils d'expression de miARNs, de par leur plus grande précision, sont beaucoup plus utilisés. De plus, il est suggéré que l'implication directe des miARNs dans la régulation du protéome rend leur profil d'expression plus informatif (Chen, 2005). Les miARNs en conjonction avec des facteurs de transcription forment en effet une combinaison complexe de régulation de l'expression des gènes.

Les avancées actuelles sur l'étude des miARNs indiquent clairement une signature de miARNs dérégulés dans plusieurs cancers, comme les carcinomes papillaires thyroïdiens (He *et al.*, 2005 ; Chou *et al.*, 2007 ; Nikiforova *et al.*, 2008), les LLC-B (Calin et Croce, 2006) ou les cancers du sein (Iorio *et al.*, 2005). Les récentes études du programme GWA (*Genome-Wide Association*) suggèrent que des variations présentes au niveau de sites régulateurs sont plus souvent associées à des pathologies que des variations au niveau d'une région codante (Sethupathy et Collins, 2008), et supportent également que les variations des séquences ADN associées avec de multiples pathologies humaines peuvent interférer avec les fonctions de miARNs (Glinsky, 2008). Enfin, les profils de

miARNs peuvent être utilisés comme marqueurs d'aberrations moléculaires connues afin d'appréhender la réponse d'une tumeur à une thérapie. Par exemple, la dérégulation de miARNs impliqués dans l'apoptose peut créer un mécanisme de résistance à une chimiothérapie basée sur l'induction de l'apoptose au sein de la tumeur. Les miARNs constituent donc un outil intéressant qui permettra à terme d'établir des signatures de cancers mais également d'identifier des sous-groupes de patients afin d'adapter leur traitement.

3.4 Outil thérapeutique

Les connaissances acquises sur les fonctions des miARNs et sur la dérégulation de leur expression dans les cancers ont ouvert de nouvelles opportunités de thérapies. De récentes études précliniques démontrent la faisabilité de l'inhibition d'un miARN surexprimé ou de la restauration de l'expression de miARNs absents. Les thérapies utilisant les miARNs de façon unique ou en combinaison avec les traitements actuels confère d'important avantages techniques par rapport aux autres approches. Pour l'instant l'utilisation de petites molécules pour cibler une protéine/enzyme peut résulter en l'apparition d'un mécanisme de compensation utilisant la même voie métabolique, comme observé récemment avec le nouvel inhibiteur de BRAF utilisé dans les mélanomes (Poulikalos *et al.*, 2010). Les miARNs sont des molécules plus petites et moins antigéniques que des peptides. Ils peuvent donc *a priori* être administrés plus simplement et sans recours à des vecteurs de délivrance viraux (Kasinski et Slack, 2011) et seront protégés dans la cellule par des mécanismes comme les exosomes (Valadi *et al.*, 2007) ou des microvésicules (Xi *et al.*, 2007) qui peuvent être imités en pharmacologie pour délivrer des miARNs spécifiques. Il est également possible de les extraire à partir de biopsies et de les quantifier par des méthodes standardisées comme la RT-qPCR à différents stades cliniques et ainsi suivre la réponse au traitement du patient.

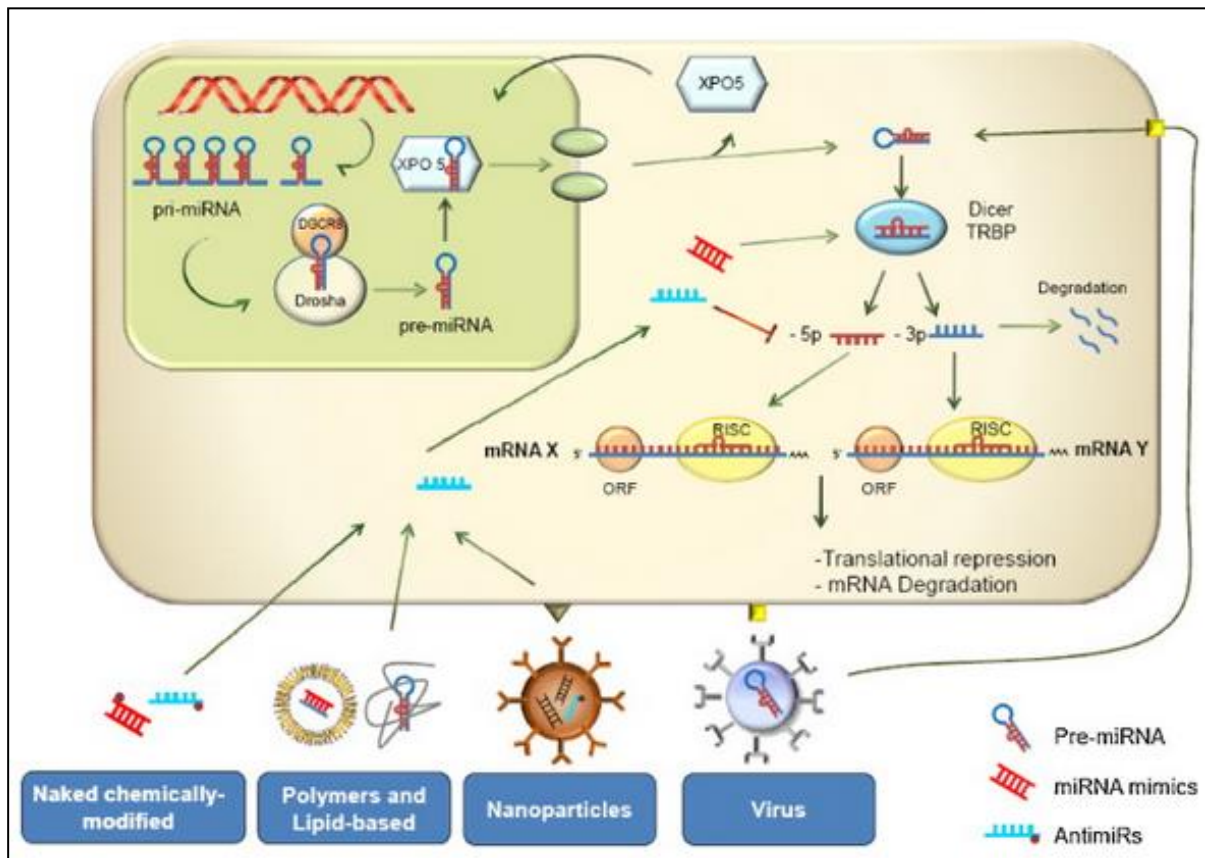


Figure I27 : Biogenèse des miARNs et options de délivrance.

Les transcrits de miARNs (pri-miARN) individuels ou en cluster sont clivés par Drosha-DGCR8 dans le noyau. Le pré-miARN résultant est transporté vers le cytoplasme grâce à EXP5 où il est pris en charge et clivé par le complexe Dicer/TRBP. Enfin, un seul brin de l'ARN duplex issu du clivage est intégré dans le complexe RISC, acteur majeur de l'ARN interférence.

Les miARNs synthétiques peuvent être délivrés de plusieurs manières, « nus » avec différentes modifications chimiques, conjugués à des polymères naturels ou synthétiques, encapsulés dans des nanoparticules organiques (e.g des liposomes) ou en utilisant des nanoparticules inorganiques. Les précurseurs de molécules d'ARN peuvent également être délivrés grâce à des particules virales (d'après Soriano *et al.*, 2013).

Plusieurs techniques ont ainsi vu le jour selon la stratégie souhaitée, à savoir l'inhibition d'un miARN surexprimé ou la restauration des fonctions d'un miARN sous-exprimé (figure I27 et I28) (Soriano *et al.*, 2013 ; Mizoguchi *et al.*, 2013).

3.4.1 Inhibition (Antagomirs)

Les miARNs peuvent être individuellement inhibés par l'utilisation d'oligonucléotides antisens, aussi appelés oligonucléotides anti-miARN (AMOs), Antagomirs ou antimirs. Ces nucléotides sont des molécules synthétiques fonctionnant comme inhibiteur compétitif du miARN ciblé, s'hybridant à la forme mature afin d'empêcher l'hybridation du miARN sur sa cible. Plusieurs modifications du squelette de l'antimir peuvent être apportées afin d'augmenter sa stabilité, sa spécificité et l'affinité de sa liaison. La plus simple d'entre elles consiste en l'ajout d'un groupement 2'-O-méthyle (2'-OMe) pour des études *in vivo*, afin d'augmenter la résistance aux nucléases de l'antimir et donc améliorer la stabilité de son interaction avec l'ARN (Weiler *et al.*, 2006). Comme exemple d'applications, Fontana *et al.* ont étudié l'impact d'un traitement par anti-miR-17-5p dans des cellules de neuroblastomes et ont pu ainsi observer une surexpression de BIM et p21 conduisant à une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Fontana *et al.*, 2008). Un pallier a été franchi avec la mise au point des antimirs de type LNA (*locked Nucleic Acid*) qui permet la formation d'un duplex thermodynamiquement très stable avec l'ARN cible. Ces oligonucléotides LNA ont permis expérimentalement la réduction de métastases (Ma *et al.*, 2010) et de la croissance de tumeurs primaires (Zhang *et al.*, 2012b). Cette propriété a permis de réduire la taille des antimirs de 15-16 nucléotides à des 8-mer-oligonucléotides avec des effets comparables, appelés des « *tiny LNAs* ». Ces derniers présentent également l'avantage de cibler la séquence « *seed* » du miARN, ciblant donc l'ensemble des miARNs d'une même famille (Obad *et al.*, 2011). Mais il existe bien évidemment d'autres formulations possibles d'antimirs amenant des perspectives alternatives pour l'inhibition de l'expression d'un ou plusieurs miARNs cibles.

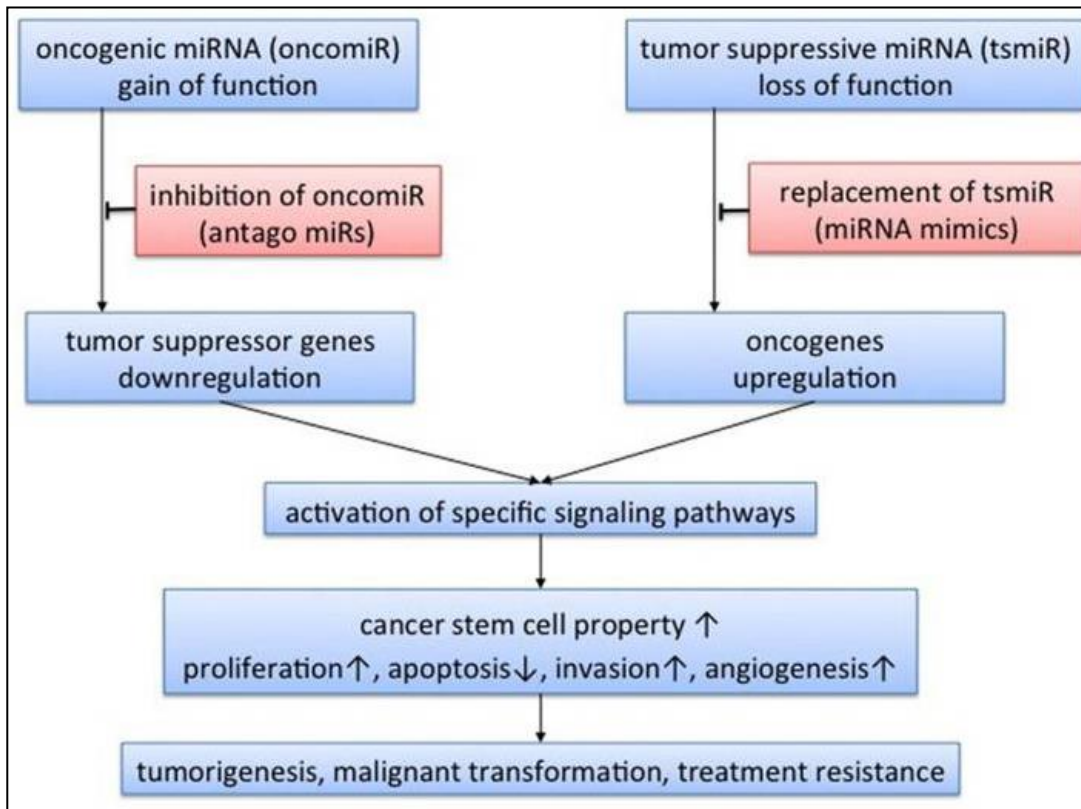


Figure I28 : Concept de thérapie ciblant les miARNs.

L'expression des gènes cibles est négativement régulée par les miARNs via la lyse de l'ARNm ou la répression de la traduction. Ainsi, des miARNs ciblant des gènes suppresseur de tumeurs sont qualifiés d'oncogéniques et, *a contrario*, des miARNs ciblant des oncogènes sont qualifiés de suppresseur de tumeurs.

Par la régulation de gènes associés à des tumeurs, les miARNs peuvent activer des voies de signalisations spécifiques. Aussi, un miARN unique peut réguler l'expression de plusieurs gènes, donc les fonctions des miARNs sont variées, affectant les propriétés des cellules cancéreuses, la prolifération tumorale, l'apoptose, l'invasion et l'angiogénèse. Les miARNs ont la possibilité de jouer un rôle dans la tumorigenèse, la transformation maligne et la résistance aux traitements. Théoriquement, deux approches sont envisagées, l'inhibition des miARNs oncogéniques avec des Antagomirs et la réexpression de miARN suppresseur de tumeurs avec des miARNs mimes (D'après Mizoguchi *et al.*, 2013).

Les principaux challenges pour l'utilisation thérapeutique des antimirs consistent tout d'abord à la distribution des antimirs dans l'organisme et ensuite à leurs effets secondaires et leur toxicité. Des antimirs « nus » peuvent atteindre pratiquement tous les tissus excepté les poumons et le cerveau (Obad *et al.*, 2011). Ceci implique que pour cibler spécifiquement un tissu, des méthodes alternatives de délivrance doivent être mises au point, comme l'utilisation de nanoparticules coatées avec des peptides $\alpha\beta 3$ permettant l'adressage à des tumeurs du sein ou de l'ovaire (Anand *et al.*, 2010). Pour l'heure, peu d'informations sont disponibles vis-à-vis de la toxicité des traitements basés sur l'utilisation d'antimirs. L'utilisation d'anti-miR-182 n'entraîne pas, par exemple, de variations de poids chez la souris, ni de variations histologiques au niveau des tissus étudiés (cerveau, poumon, rate et rein) ni d'altérations de la numération sanguine (Huynh *et al.*, 2011). Cependant des analyses histologiques du foie, principal organe de détoxification, révèlent une hépatite aigüe et des niveaux élevés des transaminases (Huynh *et al.*, 2011). Actuellement, anti-miR-122 (Miravirsén, Santaris Pharma) est le premier traitement par antimir à être testé en clinique (Phase II) dans le cadre du traitement de l'hépatite C (Pereira *et al.*, 2013). Le succès de cette étude devrait permettre d'ouvrir la voie aux essais cliniques pour d'autres antimirs.

3.4.2 Restauration (miRNA mimes et pré-miRNAs)

L'absence ou la sous-expression d'un ou plusieurs miARNs peut être restaurée par l'utilisation de miARN mimétique ou miARN mime. Ces miARNs mimes sont synthétisés sous forme d'ARN double-brin, avec un brin guide identique au miARN mature endogène dont l'expression doit être restaurée, et un brin « passager » complémentaire. Pour rendre ces miARNs mimes plus stables et résistants aux nucléases, les mêmes stratégies que précédemment sont utilisées. Par contre, les modifications apportées aux deux brins doivent être différentes afin d'assurer la capture par le complexe RISC du brin guide et la dégradation du brin passager (Henry *et al.*, 2011). De plus, là où les antimirs peuvent être délivrés « nus », ces miARNs mimes doivent être conjugués ou encapsulés dans un transporteur.

Plusieurs approches sont à l'étude, comme l'utilisation de l'atélocollagène, une forme soluble du collagène, permettant l'injection intraveineuse de miR-16 dans des modèles de cancer métastatiques de la prostate chez la souris et une inhibition complète de la croissance des métastases osseuses (Takeshita *et al.*, 2010). Des stratégies utilisées pour la transfection sont également étudiées pour la délivrance de miARNs mimes, comme l'utilisation de lipides cationiques qui présentent un risque d'induction du système immunitaire (Pecot *et al.*, 2011), le développement de lipides neutres moins toxiques (Craig *et al.*, 2011) ou la conjugaison avec des polymères synthétiques ou naturels facilitant l'absorption par la cellule et le relargage du miARN dans la cellule grâce au changement de pH (Chiou *et al.*, 2012). Sinon, une encapsidation dans des nanoparticules présentant à leur surface des anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes d'une tumeur permet un adressage ciblé du miARN (Tivnan *et al.*, 2012).

Les thérapies à base de miARNs mimes présentent les mêmes challenges que celles basés sur les antimirs. L'injection directe se limite à certains types de cancers comme l'œil ou du cerveau, de plus l'ensemble de la tumeur n'est pas exposée équitablement aux particules thérapeutiques. L'injection systémique de complexes lipidiques neutres peut surmonter une partie de ces problèmes au niveau d'organes richement vascularisés. Comme alternative, l'utilisation de nanoparticules coatées ou de vecteurs viraux génétiquement modifiés sont proposés afin de développer un tropisme pour un cancer spécifique, même si ces approches doivent encore faire l'objet d'études plus poussées.

3.4.3 Stratégie combinatoire

En plus des effets des traitements uniques à base de miARNs, une combinaison de ceux-ci avec des traitements déjà existants a été proposée. En effet, plusieurs études présentent des effets de sensibilisation par l'action de miARNs vis-à-vis de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou l'immunothérapie. Des progrès ont été réalisés sur la modulation de la réponse à la chimiothérapie d'un large panel de cancers par sensibilisation des cellules tumorales aux agents ciblant les

microtubules (comme le Paclitaxel ou le Docetaxel) par certains miARNs (Kanakkanthara et Miller, 2013). Pour exemple, miR-100 est retrouvé sous-exprimé dans des adénocarcinomes pulmonaires sensibles au Docetaxel comparé ceux résistants (Rui *et al.*, 2010). La restauration de l'expression de miR-100 dans ces cellules tumorales avant l'établissement d'une xéno greffe et après injection de Docetaxel, permet d'observer des tumeurs transfectées par miR-100 plus petites que les contrôles (Feng *et al.*, 2012). Les effets suppresseurs de tumeurs de miR-100 ayant été démontrés pour de nombreux cancers, comme l'hépatocarcinome (Petrelli *et al.*, 2012), une association avec des thérapies antimicrotubulaires peut avoir un impact important dans la thérapie anticancéreuse.

4 : MiARNs dans les Modèles Tumoraux

4.1 Oncocytomes Thyroïdiens

Les carcinomes thyroïdiens différenciés, ou DTC, comportent deux types histologiques principaux, les carcinomes papillaires, ou PTC, et les carcinomes folliculaires, ou FTC. Les PTC et les FTC constituent près de 94% des cas de cancers de la thyroïde (Busaidy et Cabanillas, 2012), mais une partie d'entre eux peut progresser en carcinomes peu différenciés, ou PDTC, voire même perdre complètement sa différenciation et se transformer en carcinome thyroïdien anaplasique, ou ATC. Une première étude fonctionnelle a montré que la dérégulation des profils d'expression de miARNs peut avoir de profonds impacts sur la carcinogenèse thyroïdienne. En effet, l'analyse par puces miARN montre une expression aberrante de certains miARNs entre des PTC clairement différenciés et des tissus thyroïdiens sains. En particulier il existe une surexpression de miR-221, miR-222, miR-146 et miR-181b (He *et al.*, 2005 ; Pallante *et al.*, 2006). L'analyse fonctionnelle de miR-221 et miR-222 montre que ce sont des inhibiteurs endogènes de l'expression de la protéine P27^{Kip1}, codée par le gène CDKN1B et contrôlant négativement entre autre l'activité de la CDK4 nécessaire à la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. Une surexpression de ces miARNs conduit donc à une augmentation de la prolifération cellulaire (Visone *et al.*, 2007 ; de la Chapelle et Jazdzewski,

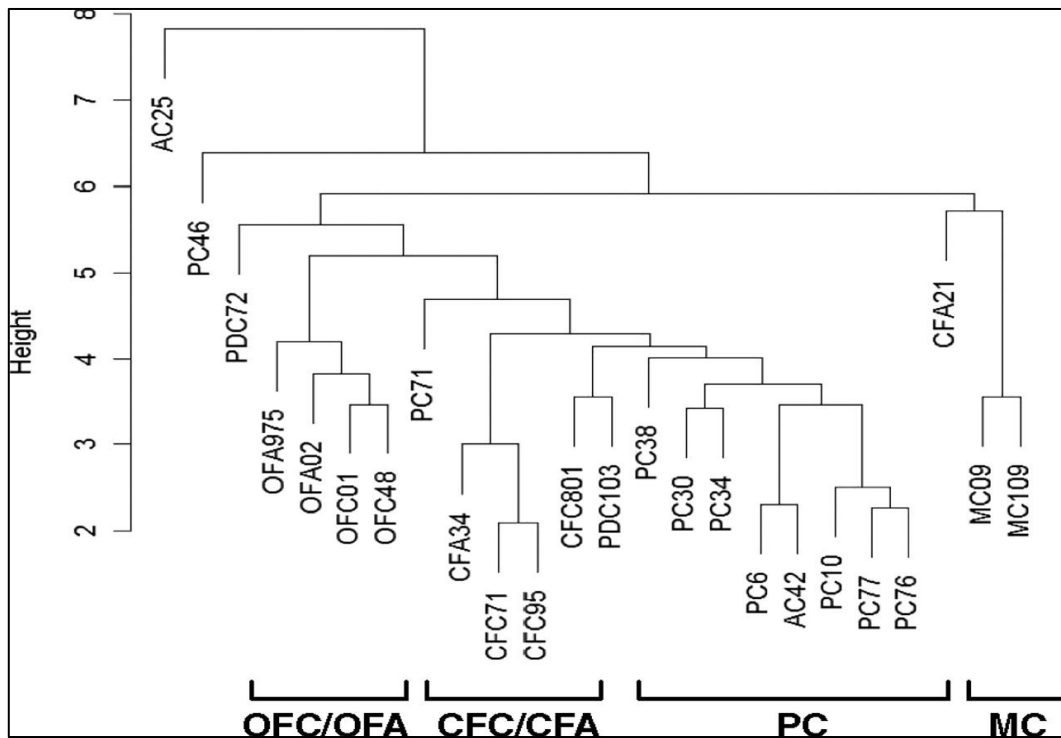


Figure I29 : Dendrogramme en cluster de l'expression de miARNs dans des tumeurs thyroïdiennes.

Le dendrogramme montre bien que l'expression des miARNs permet de classer les tumeurs thyroïdiennes étudiées en quatre classes qui dépendent du type et de l'origine tissulaire de la tumeur (D'après Nikiforova *et al.*, 2008).

OFC : Carcinome folliculaire oncocytaire ; OFA : Adénome folliculaire oncocytaire ; CFC : Carcinome folliculaire conventionnel ; CFA : Adénome folliculaire conventionnel ; PC : Carcinome papillaire ; MC : Carcinome médullaire.

2011) et à une surexpression du proto-oncogène *c-kit* (Kim *et al.*, 2008). Une étude plus récente a identifié miR-1 comme un suppresseur de tumeurs sous-exprimé dans les cancers thyroïdiens, capable de cibler l'expression des gènes *ccnd2*, *cxcr4* et *sdf-1*, suggérant une capacité à inhiber la prolifération cellulaire des carcinomes thyroïdiens (Leone *et al.*, 2011).

Le diagnostic bénin ou malin des variant oncocytaires des tumeurs folliculaires, ou OTT, est toujours soumis à débat, mais tous s'accordent à dire que ce variant est caractérisé par un contenu mitochondrial plus important que d'autres tumeurs thyroïdiennes lorsqu'il est malin (Asa, 2004). La détection de profils de miARNs spécifiques présente donc un enjeu majeur dans le diagnostic de malignité de ce type de tumeurs. L'analyse d'une hiérarchisation par cluster de l'expression de miARN entre plusieurs types de tumeurs thyroïdiennes (figure I29) dont les FTC, PTC et OTT, permet de clairement différencier les échantillons selon l'origine de la tumeur (folliculaire, papillaire ou médullaire) et la malignité de la tumeur (Nikiforova *et al.*, 2008 ; Nikiforova *et al.*, 2009 ; Rossing *et al.*, 2012). Les premières études ont montré un set de miARNs surexprimés dans ces tumeurs folliculaires, miR-221, -222, -187, -224 et -155 pour les FTC et miR-221, -222, -187, -339, -183 et -197 pour leur variant oncocytaire (Nikiforova *et al.*, 2008 ; Nikiforova *et al.*, 2009). L'inhibition de miR-197 dans des cellules de la lignée FTC133 conduit à l'arrêt de la croissance cellulaire (Weber *et al.*, 2006). Il peut donc constituer un premier indicateur de malignité des tumeurs folliculaires thyroïdiennes. Récemment, l'équipe de Nikiforova a présenté miR-885-5p comme un nouveau marqueur potentiel des OTT grâce à l'utilisation de puces à miARNs sur des échantillons provenant de 61 tissus thyroïdiens (38 FTC, dont 17 OTT ; 11 adénomes folliculaires ; 10 tissus sains ; 2 nodules hyperplasiques) (Dettmer *et al.*, 2013). Ils proposent que 3 miARNs « marqueurs » peuvent être employés pour caractériser à 100% l'origine tissulaire et la malignité d'un cancer thyroïdien (figure I30). Ainsi, ils présentent l'utilisation de deux miARNs dont l'expression est spécifique des FTC et OTT, un sous-exprimé, miR-574 et un surexprimé, miR-221, en comparaison de tissus normaux ; et du

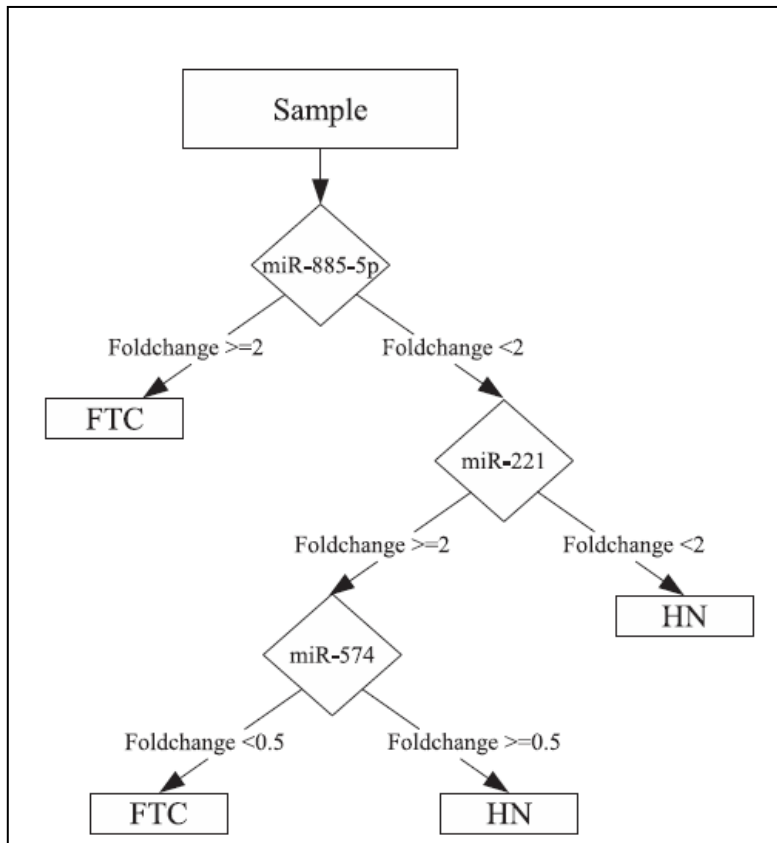


Figure I30 : Analyse par arbre de régression de l'expression de miARNs.

Cette classification permet de différencier les carcinomes folliculaires thyroïdiens (FTC) des nodules hyperplasiques (HN) et d'en déduire un algorithme de diagnostic. Trois miARNs (miR-885-5p, miR-221 et miR-574) sont suffisants pour obtenir un diagnostic fiable à 100% de biopsies FNAB (*Fine-Needle Aspiration* Biopsies) qu'elles soient dérivées de nodules hyperplasiques bénins que de carcinomes folliculaires (D'après Dettmer *et al.*, 2013).

miARN 885-5p fortement exprimé dans les variants oncocytaires comme outil de diagnostic potentiel. Ce dernier miARN est localisé dans l'intron du gène *atp2b2* en position 3p25.3, une région chromosomique fréquemment le siège d'une délétion dans les FTC non oncocytaires. La recherche de gènes cibles de miR-885-5p a conduit à l'identification de la peptidase sérine HtrA (HTRA2) comme candidat. Cette protéine est localisée dans la membrane mitochondriale et est capable d'interagir avec le gène *ndufa13* (*NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13*), aussi appelé *grim19*, codant pour une sous-unité du complexe I et impliquée dans la tumorigenèse oncocyttaire thyroïdienne (Ma *et al.*, 2007a). De la même façon, une étude de notre équipe sur une puce d'expression de 866 miARNs a montré un set de 18 miARNs différentiellement exprimés entre des tissus tumoraux thyroïdiens et des tissus sains (Jacques *et al.*, 2013). Six d'entre eux sont surexprimés (miR-125a-5p, -143, -23b, -425, -623, -654-3p), 8 sont sous-exprimés (miR-1225-3p, -1238, -135a, -150, -494, -663, -801, -923) et les 4 derniers (miR-181c, -199b-3p, -210, -140-3p) ont des profils différents entre les différents types de tumeurs. Entre ces deux études, seul miR-125a est commun, ce qui peut être lié au petit nombre de tumeurs oncocytaires explorées (Jacques *et al.*, 2013 ; Tableau 2).

4.2 Glioblastomes

Le glioblastome est un cancer du cerveau très agressif et présentant le plus mauvais pronostic vital de l'ensemble des pathologies du système nerveux central, et ce, malgré l'emploi d'intensives thérapies multimodales (Louis *et al.*, 2007). La récente introduction du Témazolomide (TMZ) dans le traitement de ce cancer permet de prolonger l'espérance de vie à 5 ans pour moins de 10% des cas, contre une médiane de 15 mois (Stupp *et al.*, 2009). Comme montré précédemment par Chan *et al.*, miR-21 est un miARN que l'on retrouve surexprimé dans de nombreux cancers dont le glioblastome pour son activité antiapoptotique (Chan *et al.*, 2005). Deux études transcriptomiques ont identifiés deux miARNs différentiellement exprimés dans les glioblastomes, une sous-expression de miR-128,

Référence	Type tumoral	Origine de l'échantillon	Méthode de profilage	miARNs régulés positivement	miARNs régulés négativement
He et al.	PTC	Tissus congelés	Puce, qRT-PCR et Northern blot	miR-146b, miR-221 et miR-222	-
Pallante et al.	PTC	Tissus congelés	Puce, qRT-PCR et Northern Blot	miR-181b, miR-221 et miR-222	-
Tetzlaff	PTC	FFPE	Puce, qRT-PCR et Northern blot	miR-21, miR-31, miR-34a, miR-172, miR-181a, miR-181b, miR-213, miR-221, miR-222, miR-223, miR-224	miR-19b-1,2, miR-30a-5p, miR-30c, miR-130b, miR-145sh, miR-218, miR-292-as, miR-300, miR-345
Chen et al.	PTC vs non-PTC	FFPE	qRT-PCR	miR-146b, miR-221, miR-222	-
Chou et al.	PTC	Tissus congelés	qRT-PCR	miR-146b, miR-221, miR-222	-
Nikiforova et al.	PTC et FTC	Tissus congelés	qRT-PCR	PTC: miR-187, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-146b, miR-155 FTC: miR-146b, miR-155, miR-187, miR-221, miR-222, miR-224 OTT: miR-183, miR-187, miR-197, miR-221, miR-222, miR-339	-
Weber et al.	FTC	Tissus congelés	Puce, qRT-PCR	miR-192, miR-197, miR-328, miR-346	-
Rossing et al.	FTC vs FTA/NT	Tissus congelés	Puce	FTC vs NT : 37 miARNs FTC vs FTA : 12 miARNs	FTC vs NT: 113 miARNs FTC vs FTA: 44 miARNs
Jacques et al.	FTC/FTA vs NT	Tissus congelés	Puce, qRT-PCR	FTA vs NT: 21 miARNs FTC vs NT: 13 miARNs	FTA vs NT: 16 miARNs FTC vs NT: 5 miARNs

Tableau 2: Récapitulatif de littérature sur les profils de miARNs dérégulés dans les cancers thyroïdiens différenciés.

Abréviations: PTC, papillary thyroid cancer; FTC, follicular thyroid cancer; FTA, follicular thyroid adenoma; NT, normal thyroid tissues; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded samples; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; miR, miRNA.

qui induit une réduction de la prolifération de cellules de lignées de glioblastomes (Zhang *et al.*, 2009a), et une surexpression de miR-10b, dont l'inhibition conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Godlewski *et al.*, 2008). L'équipe de Guan *et al.*, a montré une corrélation entre la surexpression de miR-196 et une survie diminuée des patients atteints de glioblastomes (Guan *et al.*, 2010). Ces quatre miARNs (miR-10b, miR-21, miR-128, miR-196) sont les seuls dont les expressions aberrantes sont retrouvées dans plusieurs études (Mizoguchi *et al.*, 2012), les observations faites sur les autres miARNs variant entre les études, ils doivent contribuer au développement des glioblastomes.

Les études les plus récentes présentent un impact de certains miARNs sur la chimiorésistance au TMZ des glioblastomes (Zhang *et al.*, 2012a). Parmi ces miARNs, on retrouve miR-21, dont la surexpression réduit le ratio Bax/Bcl-2 et l'activité de la caspase-3 de lignées de glioblastomes, ce qui entraîne une inhibition de l'apoptose induite par la TMZ (Zhang *et al.*, 2012a). Ce miARN est également retrouvé dans la résistance de plusieurs cancers à la radiothérapie par son action inhibitrice d'un réseau de suppresseurs de tumeurs activé par la voie PI3K/AKT (Gwak *et al.*, 2012). Un autre miARN, miR-221, intervient dans la résistance à la TMZ, et une suppression de ce dernier entraîne une sensibilisation des cellules de gliomes au traitement (Chen *et al.*, 2012). La sous-expression de miR-128 dans les cellules de glioblastomes, comparé au tissu cérébrale adjacent, induit une réduction de l'auto-renouvellement des cellules de gliomes par régulation négative de Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*), un facteur de répression de gènes impliqués dans la sénescence et assurant le maintien du pool de cellules souches (Park *et al.*, 2004). miR-34a, un miARN suppresseur de tumeurs bien connu pour son induction par p53 (Bader, 2012), est retrouvé sous-exprimé dans de nombreux cancers, et certaines études l'impliquent dans la pathogenèse des glioblastomes avec une activité semblable à celle de miR-128 pour le maintien des propriétés de cellules souches des gliomes (Li *et al.*, 2009). Aussi, une approche par restauration de son expression est une sérieuse piste d'investigation.

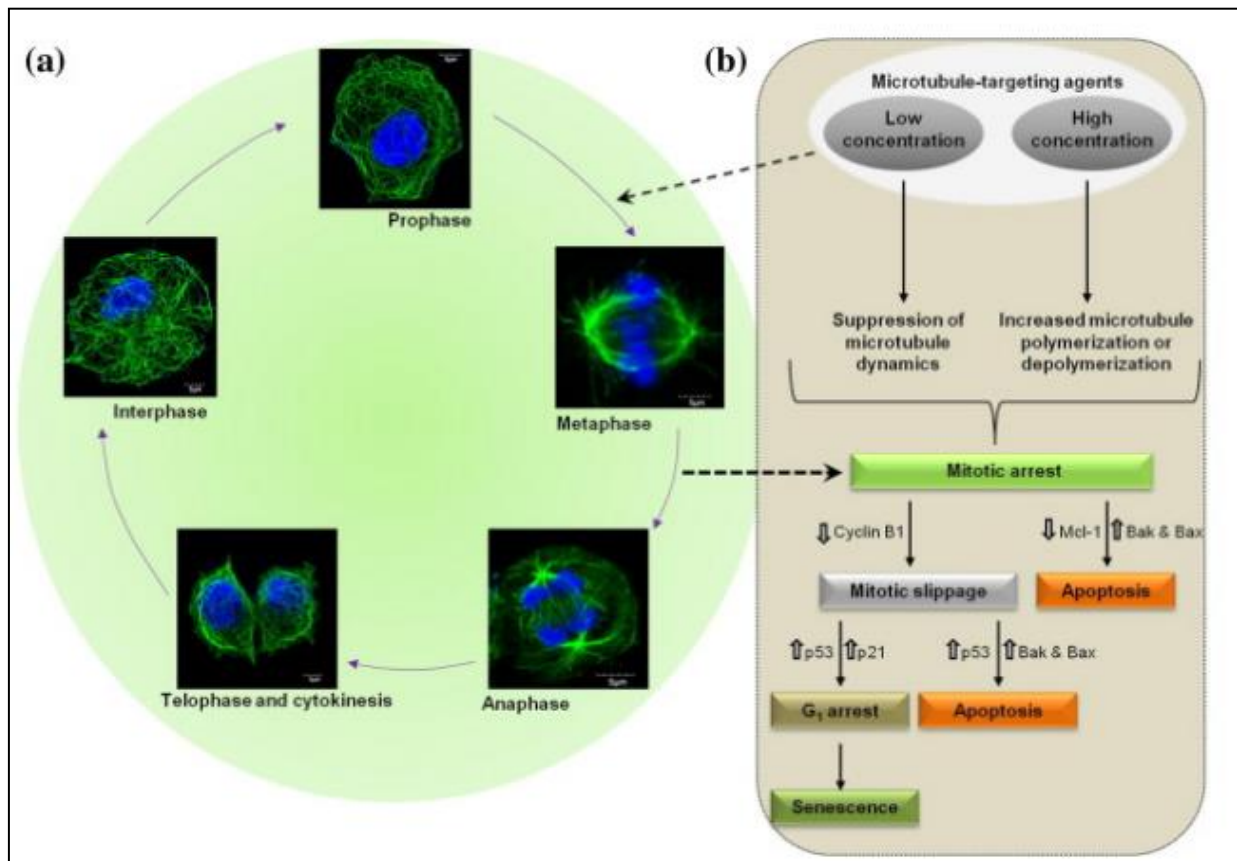


Figure I31: Structures des microtubules à différents stades du cycle cellulaire et mécanismes d'action des MTAs.

a: Les microtubules apparaissent en fluorescence verte dans des cellules humaines 1A9 de cancers ovariens. Le dynamisme de ces microtubules est important à tous les stades de la mitose. Les microtubules des fuseaux mitotiques sont plus dynamiques que ceux des cellules en interphase

b: Les MTAs (*Microtubule-Targeting Agents*) agissent principalement sur les fuseaux de microtubules. Des cellules traitées avec des MTAs sont stoppées au stade de transition métaphase/anaphase du fait de la destruction de ces fuseaux. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose durant l'arrêt de la mitose par les MTAs sont complexes. L'expression de Mcl-1 est provisoirement augmentée ce qui inhibe la voie apoptotique, conférant à la cellule un délai nécessaire pour la correction des « erreurs ». Si Mcl-1 est dégradé à des niveaux insuffisants pour inhiber Bak et Bax, la cellule peut entrer en apoptose. Autrement, si la cycline B1 est dégradée avant Mcl-1, la cellule peut sortir de la mitose (« *mitotic slippage* ») sans induction de la mort cellulaire. Cependant, une cellule peut toujours mourir après cette sortie de mitose selon les niveaux de p53. L'induction de Bak et Bax par p53 induit toujours l'apoptose alors que l'induction de p21 par p53 va conduire à un arrêt en phase G1 et une sénescence de la cellule (D'après Kanakkanthara et miller, 2013).

Le réseau microtubulaire constitue une cible thérapeutique dynamique pour le traitement des cancers. Ils jouent en effet un rôle critique de nombreuses fonctions cellulaires, incluant la mitose, le transport intracellulaire, la signalisation cellulaire et le maintien de l'architecture de la cellule (Rusan *et al.*, 2001). La diminution, voire la perte, du contact entre les faisceaux de microtubule et les kinétochores lors de la métaphase, le contrôle de l'alignement des chromosomes ne peut se faire, il y a arrêt du cycle cellulaire qui si la correction ne peut se faire conduit à la mort cellulaire (Kops, 2008). Les composés capables de cibler les interactions microtubulaires sont donc un groupe puissant de médicaments pour la chimiothérapie et capables de stopper la division de cellules cancéreuses, dans la littérature ils sont nommés MTAs (*Microtubule-targeting Agents*) (Dumontet et Jordan, 2010).

Les MTAs exercent donc leur activité en altérant la polymérisation des microtubules et leur dynamique, causant l'arrêt de la mitose et la mort cellulaire par voie apoptotique (figure I31). Cependant, des anomalies d'expression des miARNs ont été associées à une résistance aux MTAs de certaines tumeurs (Kastl *et al.*, 2012 ; Mei *et al.*, 2010). Cette résistance peut être liée à une altération des signaux apoptotiques. Les régulateurs anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-X_L, placés sur la membrane externe de la mitochondrie empêchent la libération de cytochrome c tandis que les signaux proapoptotiques, Bcl-X, Bak, Bad et Bax, accélèrent au contraire sa libération. Ainsi, la régulation de l'expression de ces différents facteurs est un mécanisme par lequel des miARNs peuvent conférer une résistance aux MTAs, comme let-7 offrant une résistance au Paclitaxel (Tsang et Kwok, 2008) ou miR-21 induisant une sensibilité à cette molécule (Mei *et al.*, 2010). Les miARNs peuvent également agir au niveau de l'efflux des MTAs, via la régulation de l'expression du gène *mdr1* (*MultiDrug Resistance 1*), la protéine codée réduit les concentrations intracellulaires de la molécule thérapeutique et confère une résistance à la chimiothérapie (Gottesman, 2002). Plusieurs miARNs ont été identifiés comme régulateurs de l'expression P-gp, une protéine régulée par MDR1, comme miR-27a (Zhang *et al.*, 2010) ou let-7g (Boyerinas *et al.*, 2012). Enfin, les tumeurs résistantes

aux MTAs présentent une forte concentration en isotypes de tubuline β qui participent à l'agressivité d'une tumeur (Kanakkanthara *et al.*, 2012). De récentes études impliquent les miARNs comme régulateurs de l'abondance de ces isotypes de tubuline β , comme miR-200c qui lorsqu'il est surexprimé induit une sous-expression de tubuline β III et une augmentation de la sensibilité aux MTAs (Cochrane *et al.*, 2010). Ces différentes observations sont cohérentes avec l'utilisation des miARNs comme complément d'un médicament déjà employé pour le traitement des cancers dans une stratégie combinatoire, afin d'améliorer les effets de ces molécules ou de contrecarrer les résistances développées par les tumeurs les plus agressives.

III : PROBLEMATIQUE

La mitochondrie est une unité métabolique indispensable pour la cellule. Elle participe la synthèse d'intermédiaires du cycle des acides gras et de la glycolyse, à la production d'ATP grâce à la fonction de phosphorylation oxydative et peut, si les conditions l'exigent, induire la mort cellulaire programmée ou apoptose, par l'activation de caspases suite à la libération du cytochrome C. La biogenèse mitochondriale est le mécanisme le plus complexe de la vie cellulaire car elle nécessite une expression coordonnée des génomes mitochondriaux et nucléaires, ainsi qu'une répartition adéquate des mitochondries dans la cellule afin d'assurer une fourniture énergétique optimale. Cela sous-tend alors une dynamique du réseau mitochondrial selon les besoins de la cellule.

Le modèle tumoral thyroïdien a ceci qu'il présente un développement lent permettant d'étudier la mise en place du mécanisme d'adaptation métabolique de la cellule. Les cellules oncocytaires thyroïdiennes représentent un modèle cellulaire « idéal » pour l'étude du réseau de régulation permettant la mise en place d'un métabolisme tumoral oxydatif avec une biogenèse mitochondriale accrue et une prolifération lente mais également un modèle pour l'étude des voies de régulation « fines » de la fonction énergétique mitochondriale. Les différents travaux réalisés par le laboratoire sur ces modèles cellulaires ont mis en évidence l'action des coactivateurs transcriptionnels PGC1- α et PRC, dans la réponse aux différents signaux environnementaux ainsi que dans le contrôle de la prolifération cellulaire et mitochondriale. Les cellules de carcinomes thyroïdiens humains expriment faiblement PGC1- α mais présentent une richesse en mitochondries fonctionnelles dont la biogenèse est alors presque exclusivement médiée par PRC. Ces lignées sont donc un bon modèle pour l'analyse des mécanismes contrôlés par PRC et impliqués dans la prolifération cellulaire et l'adaptation métabolique.

Récemment, l'équipe a réalisé une inhibition de PRC par siARN ce qui a permis de mettre en évidence un ensemble de gènes régulés par le coactivateur PRC. Parmi ces gènes ont été retrouvés des miARNs différentiellement exprimés. En partant de ce constat, nous avons cherché à connaître les miARNs directement régulés par PRC en utilisant une approche de CHIP-chip. Ces miARNs identifiés, une inhibition ciblée de chaque miARN et un screening fonctionnel ont été réalisés afin d'identifier les miARNs susceptibles d'impacter directement la fonction mitochondriale et les cibles de cette régulation post-transcriptionnelle ont été sélectionnées grâce aux outils bio-informatiques puis validées par qPCR.

Le modèle tumoral du glioblastome est utilisé par l'équipe pour la recherche de traitements efficaces pour l'un des cancers actuellement les plus agressifs avec une médiane de survie à 5 ans très courte (< 1 an). Le manque de spécificité des traitements actuels implique de développer des thérapies plus ciblées. Grâce à l'avancée des connaissances sur les agents ciblant les microtubules (MTA), l'équipe a isolé une séquence peptidique de quelques acides aminés dérivée de la sous-unité légère des neurofilaments, NFL-TBS.40-63. Ce peptide est capable de pénétrer spécifiquement dans les cellules de glioblastomes et d'induire la dépolymérisation de la tubuline, la destruction du réseau de microtubule et la mort cellulaire par apoptose. Des interactions entre le réseau de microtubule et la mitochondrie ont été montrées, ces dernières assurant la distribution et la dynamique fusion/fission des mitochondries dans la cellule.

La relation étroite entre les réseaux microtubulaires et mitochondriaux nous ont conduits à nous demander si le peptide NFL-TBS.40-63 outre la dépolymérisation des microtubules peut conduire à une destruction du réseau mitochondrial. Nous avons ensuite étudié l'impact fonctionnel de cette dépolymérisation sur la phosphorylation oxydative et la dynamique des mitochondries. De récentes études ont montré que les miARNs peuvent agir d'agents de chimiorésistances dans le cadre du traitement des glioblastomes. L'équipe a par ailleurs montré que l'introduction du peptide rendait les cellules ciblées plus sensibles à ces thérapies. Aussi, nous avons étudiés l'impact du peptide sur

l'expression de miARNs décrits comme surexprimés dans ces cancers et induisant une résistance au traitement. L'objectif final étant d'identifier une combinaison possible de thérapies ciblant spécifiquement les cellules de glioblastomes, capable d'induire la mort de ces dernières tout en protégeant les tissus sains des traitements agressifs utilisés actuellement.

Lors de cette thèse, mon travail a été de préciser la place de la fonction énergétique mitochondriale en regard de ses interactions avec le réseau de microtubules d'une part et de sa relation avec les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, c'est à dire sa capacité d'adaptation rapide au processus tumoral.

Matériel et méthodes

I : Lignées cellulaires et réactifs

A : Cellules :

Toutes les cellules sont mises en culture dans un incubateur à 37°C, 100% d'humidité et 5% de CO₂.

FTC-133:

Les cellules FTC-133 ont été obtenues à partir de métastase de carcinome folliculaire thyroïdien humain et fournies par Interlab Cell Line Collection (national institute for Cancer Research, Gênes, Italie). Elles sont cultivées en milieu DMEM/F12 GlutaMAX™ (*Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* ; GIBCO by Life Technologies, Saint Aubin, France) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) et 1% d'Anti-Anti 100X (*Antibiotic-Antimycotic*, GIBCO by Life technologies, Saint Aubin, France).

XTC.UC1:

La lignée XTC.UC1 a été fournie gracieusement au laboratoire par le professeur O. Clark (Département de chirurgie, Université de Californie, San Francisco, Etats-Unis). Ces cellules dérivent d'une métastase mammaire d'un variant oncocytaire de carcinome folliculaire thyroïdien humain. Elles sont cultivées dans le même milieu que celui utilisé pour la culture des FTC-133, additionné de 10mU/ml de TSH (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Cette TSH est obtenue par solubilisation de dix unités de TSH bovine lyophilisée dans 10ml d'eau stérile. Cette solution stock de TSH à 1U/ml est aliquotée et conservée à -20°C.

NIH-3T3 :

Cette lignée établie à partir de tissu embryonnaire de souris Swiss, par G. Todaro and H. Green, constitue un standard de lignée de fibroblastes fourni par ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM low glucose (1g/l) et L-glutamine (PAA Laboratories)

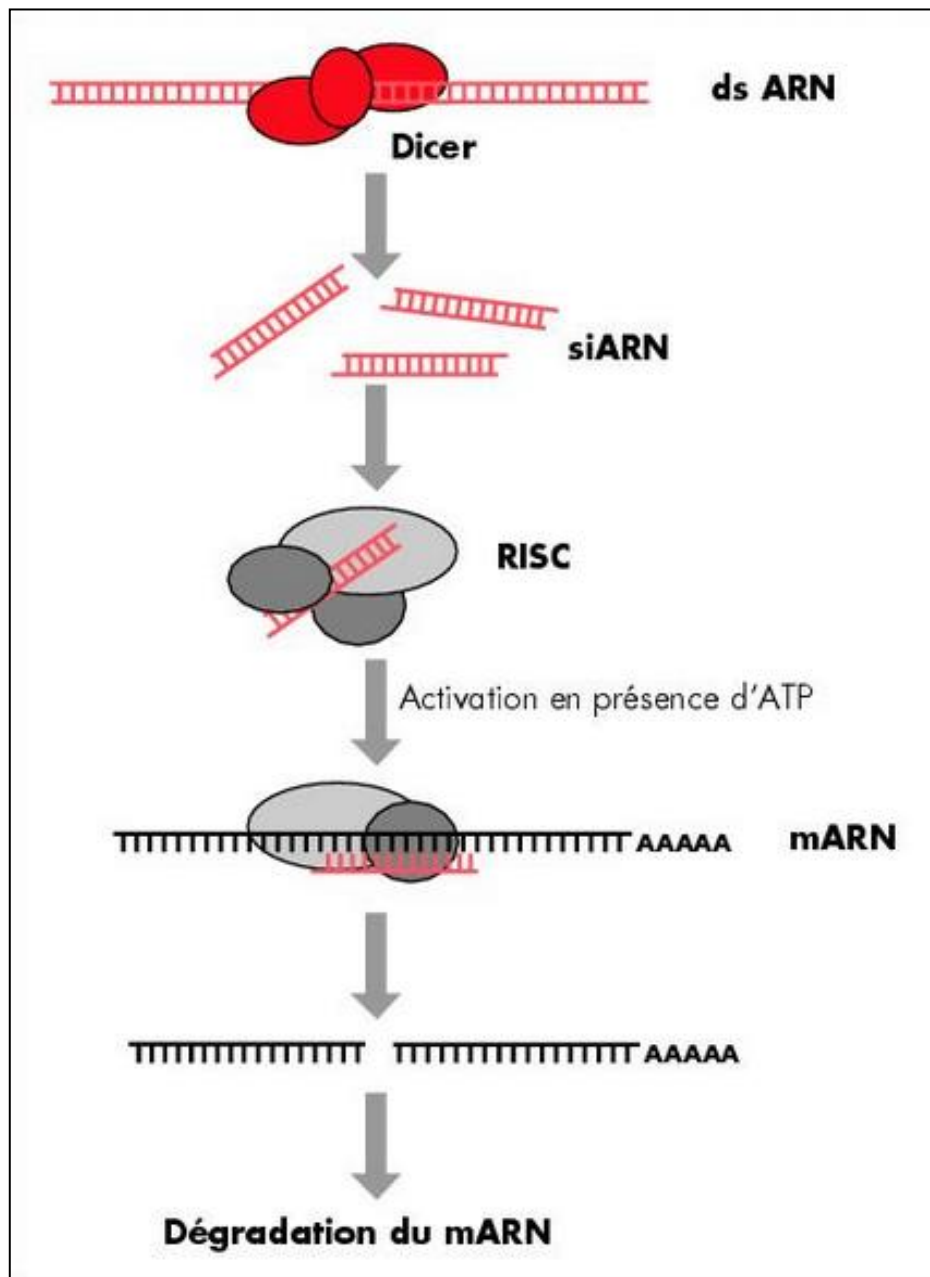


Figure M1 : Mécanisme général de l'ARN interférence.

Lors d'une étape d'initiation, les ARNs double brin sont clivés par l'enzyme Dicer en petits fragments de 19-21 paires de bases appelés siARNs ou ARN interférents. Ces siARNs sont reconnus par le complexe multiprotéique RISC. En présence d'ATP, le complexe activé utilise le brin antisens du siARN comme guide pour reconnaître et cliver la séquence homologue sur l'ARN messager cellulaire. La dégradation de l'ARN messager provoque le knock-down de la protéine pour laquelle il code normalement. Chez les mammifères, le même mécanisme peut être provoqué par l'administration de siARNs synthétiques (D'après Chauchereau et Harel-Bellan, 2004).

supplémenté par 10% de SVF (Lonza, Levallois-Perret, France), 1% de NEAA (*Non-Essential Amino Acids* ; Lonza) et 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich).

T98G :

Cette lignée est dérivée d'une tumeur de glioblastome humain et fournie par ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginie, Etats-Unis). Elles sont cultivées dans le même milieu que celui utilisé pour les NIH-3T3.

II : Inhibition de l'expression de PRC par siARN et des miARNs par antimir

A : Inhibition de l'expression de PRC par siARN

Afin d'inhiber l'expression de PRC dans des cellules XTC.UC1 selon le principe d'ARN interférence décrit dans la figure M1. Le siARN PRC N° 121729 a été choisi parmi trois siRNA testés car son introduction dans les cellules induit une inhibition d'au moins 70% de l'expression de PRC après 48h d'incubation.

Les cellules préalablement synchronisées par privation de sérum sont décollées par l'action de la trypsine puis réensemencées sur des plaques 6 puits à raison de 200 000 cellules par puits. Le lendemain, les complexes ARN/agent de transfection sont préparés. L'agent de transfection siPORT™ Amine (Applied Biosystems by Life Technologies) est dilué à raison de 5 µl de solution stock dans 100 µl de milieu OPTI-MEM® I (GIBCO by Life Technologies) puis incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Le siARN ou le contrôle est dilué à une concentration finale de 30 nM (solution stock à 50 µM) dans 100 µl de milieu OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium. Puis l'agent de transfection dilué et l'ARN dilué sont mélangés et ce mélange est incubé à température ambiante pour permettre aux complexes de transfection de se former. Après 10 minutes d'incubation, le milieu de culture des cellules, maintenant adhérentes, est retiré et remplacé par 200 µl de ce mélange. Finalement, 300 µl

de milieu OPTI-MEM® I sont ajoutés dans chaque puits, la plaque est doucement agitée et placée dans une étuve à 37°C pendant 5 heures.

Le mélange de transfection est alors enlevé et remplacé par du milieu de culture puis la plaque est replacée dans une étuve à 37°C pendant 24, 48 ou 72 heures avant que les cellules ne soient récupérées pour extraction d'ARN ou de protéines par la suite.

B : Transfection des antimir™ miRNA Inhibitor

Afin d'étudier l'impact d'un miARN sur l'expression des protéines cibles, des cellules XTC.UC1 et FTC-133 sont transfectées par des antimir™ miRNA Inhibitor (Ambion® by Life Technologie). Les antimir™ miRNA Inhibitor utilisés sont référencés dans le tableau ci-après. Le protocole de transfection, les volumes d'agent de transfection et la concentration finale en antimir™ miRNA Inhibitor sont identiques à ceux employés pour la transfection de siARN PRC.

Id antimir™	séquence
Hsa-miR-494	5'-UGAAACAUACACGGGAAACCUC-3'
Hsa-miR-181d	5'-AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU-3'
Hsa-miR-30a	5'-UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG-3'
Hsa-miR-21	5'-CAACACCAGUCGAUGGGCUGU-3'
Hsa-miR-561	5'-CAAAGUUUAAGAUCCUUGAAGU-3'
Hsa-miR-100	5'-CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAUG-3'
Hsa-miR-99	5'-CAAGCUCGCUUCUAUGGGUCUG-3'
Hsa-miR-125a	5'-ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC-3'
Hsa-miR-542	5'-UGUGACAGAUUGAUACUGAAA-3'
Hsa-miR-424	5'-CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA-3'
Hsa-miR-218	5'-UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU-3'
Hsa-miR-365	5'-AGGGACUUCAGGGGCAGCUGU-3'

III : Mesure de l'activité cellulaire via l'activité déshydrogénase du complexe II de la chaîne respiratoire

A : Principe de la méthode

Dans du milieu complet, le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide, Sigma-Aldrich) est un composé qui permet de mesurer l'activité de cellules vivantes via l'activité succinate déshydrogénase mitochondriale du complexe II de la chaîne respiratoire. L'activité déshydrogénase mitochondriale permet le clivage du cycle tétrazolium du MTT formant ainsi des cristaux de formazan de couleur mauve insoluble en milieu aqueux. Les cristaux sont dissouts dans du DMSO et donnent une solution mauve dont l'absorbance peut être mesurée par spectrophotométrie. Plus il y a de cellules vivantes, plus la quantité de cristaux de formazan augmente. Pour déterminer l'activité cellulaire des XTC.UC1 à J+2 après transfection par un antimir en plaque six puits, celles-ci sont directement incubées avec 10% de MTT.

B : Protocole

Le mode opératoire du dosage par le MTT est décrit ci-après. Eliminer le surnageant puis ajouter 0,5 ml de milieu de culture complet et 50 μ l de MTT. Incuber la plaque pendant 2 heures au minimum à 37°C. Après incubation éliminer le surnageant puis ajouter 100 μ l de MTT *Solvant* et 200 μ l de DMSO puis agiter. Faire deux blancs avec 100 μ l de MTT *Solvant* et 200 μ l de DMSO. Déposer 2 x 100 μ l de chaque échantillon et 2 x 100 μ l du blanc dans une plaque à fond clair et lire l'absorbance à 590 nm au spectrophotomètre « SpectraFluor Plus » (TECAN, Lyon, France).

IV : Extraction des ARNs totaux et miARNs à partir de cellules

A : extractions des ARN totaux

Les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Un culot sec de cellules congelées est d'abord lysé et homogénéisé dans 350 µl de tampon RLT, très dénaturant et riche en thiocyanate de guanidine, un inhibiteur des RNases. Le lysat est transféré sur une colonne QIAshredder® (Qiagen, Courtaboeuf, France) permettant l'élimination des agrégats et débris cellulaires. Après une centrifugation de deux minutes à 10000 g, le lysat est récupéré dans le tube collecteur placé sous la colonne.

Au lysat sont ajoutés 350 µl d'éthanol 70% et l'ensemble est transféré sur une colonne de silice placée sur un nouveau tube collecteur. Après 15 secondes de centrifugation à 10000 g, les ARNs sont retenus par les billes de silice alors que le reste est élué et éliminé. Ensuite trois lavages, avec centrifugation entre chaque, sont réalisés : un premier avec 700 µl de tampon RW1 (présence d'une faible concentration de thiocyanate de guanidine) suivi de deux lavages avec 500 µl de tampon RPE. Une dernière centrifugation est effectuée sans tampon afin d'éliminer complètement l'excédent de tampon et d'alcool de la colonne.

Les ARNs totaux sont ensuite élués par deux lavages avec addition de 25 µl d'eau stérile RNase free sur la colonne suivi d'une centrifugation d'une minute à 10000 g. Les échantillons d'ARN en solution peuvent alors être stockés à -80°C.

La concentration des ARNs totaux obtenus est mesurée à l'aide du spectromètre Nanodrop ND-1000 (Nyxor Biotech, Labtech, Palaiseau, France). Cet instrument, muni d'une fibre optique, permet d'obtenir rapidement la valeur de DO à partir d'un faible volume d'échantillon (1 à 2 µl). L'auto-calibration est effectuée avec de l'eau et le blanc avec le solvant utilisé. Le spectre d'absorption est réalisé et la densité optique (DO) des échantillons est relevée à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines). La pureté des échantillons est évaluée par le rapport DO_{260}/DO_{280} : celui-ci doit être supérieur à 1,8. La contamination par des dérivés alcooliques est évaluée par les rapports 230/280.

B : Extractions des ARN totaux dont miARNs

Les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit miRNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Un culot sec de cellules congelées est d'abord lysé et homogénéisé dans 700 µl de QIAzol, très dénaturant et riche en thiocyanate de guanidine, un inhibiteur des RNases. Le lysat est transféré sur une colonne QIAshredder® (Qiagen, Courtaboeuf, France) permettant l'élimination des agrégats et débris cellulaires. Après une centrifugation de deux minutes à 10000 g, le lysat est récupéré dans le tube collecteur placé sous la colonne.

Au lysat sont ajoutés 140 µl de chloroforme et l'ensemble est agité vigoureusement pendant 15 secondes. Les tubes sont ensuite placés à centrifuger pendant 15 minutes à 4°C. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est transféré dans un nouveau tube dans lequel on ajoute ensuite 1,5 fois le volume récupéré d'éthanol 100%. Après agitation à la pipette, 700 µl de l'échantillon sont transférés sur une colonne RNeasy Mini spin. Après 15 secondes de centrifugation à 10000 g, les ARNs sont retenus par les billes de silice alors que le reste est élué et éliminé. Ensuite trois lavages, avec centrifugation entre chaque, sont réalisés : un premier avec 700 µl de tampon RWT (présence d'une faible concentration de thiocyanate de guanidine) suivi de deux lavages avec 500 µl de tampon RPE. Une dernière centrifugation est effectuée sans tampon afin d'éliminer complètement l'excédent de tampon et d'alcool de la colonne.

Les ARNs totaux dont miARNs sont ensuite élués par deux lavages avec addition de 25 µl d'eau stérile RNase free sur la colonne suivi d'une centrifugation d'une minute à 10000 g. Les échantillons d'ARN en solution peuvent alors être stockés à -80°C.

Comme précédemment le dosage est réalisé à l'aide du spectromètre Nanodrop ND-1000.

V : Transcription Inverse (RT)

A : ARN messagers

La transcription inverse permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice d'ARNm grâce à une reverse transcriptase rétrovirale, MMLV (*Moloney-Murine Leukemia Virus*). Elle est réalisée à l'aide du kit Advantage® RT-for-PCR (Clontech ; Ozyme, Montigny Le Bretonneux, France).

Un volume correspondant à 1 µg d'ARN total est utilisé. De l'eau contenant du DEPC (DiEthylPyroCarbonate), permettant la dégradation des RNases, est ajoutée au mélange. Le tout est chauffé à 72°C pendant 2 min puis la réaction est stoppée en plaçant les tubes dans la glace. On réalise un mix avec l'équivalent en composés suivant pour chaque tube :

- 4 µl de tampon de réaction 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, contenant 375 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂)

- 1 µl de mélange de dNTPs (10 mM de chaque)

- 0,5 µl de RNasin (inhibiteur de RNases)

- 1 µl de transcriptase inverse MMLV

La réaction de transcription inverse est alors réalisée en incubant les tubes à 42°C pendant une heure. Ceux-ci sont ensuite chauffés à 94°C pour stopper la réaction de synthèse des ADNc complémentaires et détruire toute activité DNase. Les échantillons d'ADNc ainsi obtenus sont ensuite dilués en ajoutant 30 µl d'eau DEPC puis congelés en aliquots à -20°C.

B : microARNs

Pour produire l'ADNc des miRNAs, le kit NCode™ EXPRESS SYBR® GreenER™ miRNA qRT-PCR Kit Universal (Invitrogen) a été utilisé. Celui-ci permet dans un échantillon d'ARN totaux de 100 pg à 1µg,

de produire l'ADNc de miRNAs pour une qPCR classique. Le principe du kit est d'ajouter aux miRNAs une queue poly(A) en 3' et en même temps de produire leur ADNc par reverse transcription grâce à un primer universel qui va reconnaître cette queue poly(A). Le mode opératoire de cette reverse transcription est décrit ci-après. Pour chaque échantillon mettre un volume contenant 100 pg à 1 µg d'ARNs extraits au TRIzol®, ajouter un mix contenant 4 µl de Reaction Mix 5X, 2 µl de SuperScript® Enzyme Mix 10 X et compléter à 20 µl avec de l'eau RNase-free. Centrifuger brièvement pour récupérer tout le liquide dans le fond de la barrette. Incuber 60 minutes à 37°C et 5 min à 95°C pour arrêter la réaction. L'incubation à 37°C est importante pour produire uniquement l'ADNc des miRNAs matures et garder intacte les tige-boucles des formes non matures des miRNAs.

VI : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (qPCR) en temps réel

A : Principe de la méthode

La PCR quantitative repose sur la détection et la quantification de l'intégration d'une sonde fluorescente dans une structure d'acides nucléiques double-brin. L'augmentation du signal est donc directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés depuis le début de la réaction (PCR d'ordre 0). Cette linéarité est appréciée par la définition arbitraire d'un cycle seuil ou Ct (*Cycle threshold*) où le signal de la sonde est différentiable du bruit de fond et correspond au début de la phase exponentielle d'amplification. La sonde utilisée lors de ces expériences est le SYBR Green I dont l'émission fluorescente augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Cette technique permet une détection assez sensible et rapide de la quantité d'ADN double brin synthétisé. Cependant, le

SYBR Green I se fixe de manière aspécifique à tous les fragments d'ADN, les dimères d'amorces peuvent donc être également détectés et conduire à une surestimation de la quantité d'ADNc étudié ; il convient alors de s'assurer de la spécificité des amplicons par la détermination d'une courbe de fusion des produits obtenus par cette PCR.

B : Protocole pour ARN messagers

Deux approches de quantification sont utilisées : une quantification absolue par l'établissement d'une courbe de standards et une quantification relative par la méthode du $\Delta\Delta Ct$.

B.1 Préparation de Standards

L'approche quantitative est permise d'un côté par la réalisation d'une gamme de nombres de copies connus d'amplicons du gène étudié. Dans ce but, une PCR classique est effectuée en mélangeant les éléments suivants : 2 μ l d'ADNc (obtenu à partir d'ARNm extraits de tissu thyroïdien sain ou de lignées cellulaires thyroïdiennes), 2 μ l d'amorce sens à 20 mM, 2 μ l d'amorce anti-sens à 20 mM, 14 μ l d'eau et 20 μ l de HotGoldStar Mix (Eurogentec, Angers, France) contenant l'ADN polymérase Taq HotStar, les dNTPs (concentration finale à 200 μ M), du $MgCl_2$ (concentration finale à 1,5 mM) et du tampon 2X. Les ADNc sont d'abord dénaturés à 95°C pendant 10 minutes puis 35 cycles d'amplification sont effectués, composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30°C, d'une hybridation à la température d'hybridation adéquate des amorces, T_a (*Temperature annealing* ; correspondant à la température de demi-dénaturation ou $T_m - 5^\circ C$) du couple d'amorces pendant 30 secondes et d'une phase d'élongation de 30 secondes à 72°C. L'amplification du produit de PCR est vérifiée par migration de 8 μ l de ce-dernier sur gel d'agarose à 2,5%. Les ADNc amplifiés sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) puis quantifiés par mesure de la DO à 260 nm grâce au Nanodrop ND-1000. Le nombre de copies est calculé grâce à la formule suivante :

$\text{Nombre de copies}/\mu\text{l} = \text{DO (ng}/\mu\text{l}) \times 9,1 / \text{nombre de paires de bases du produit de PCR}$
--

Les échantillons sont ensuite dilués afin d'obtenir 10^{10} copies/ μl . La gamme peut alors être réalisée par dilutions en cascade dans de l'eau stérile de cette solution mère.

B.2 PCR quantitative en temps réel

Les quantifications sont réalisées en plaque 96 puits sur l'appareil ABI 7900 (Applied Biosystems by Life Technologies, Saint Aubin, France). Un mélange réactionnel est préparé pour l'ensemble des échantillons. Celui-ci comprend, pour chaque échantillon, 0,8 μl d'amorces sens et antisens à 10 μM (concentration finale de 400nM), 5,6 μl d'eau stérile et 10 μl de Power SYBR® Green Master Mix 2X (Invitrogen by life technologies) contenant du SYBR Green I, de l'AmpliTaQ Gold DNA Polymerase LD, des dNTPs et du tampon de réaction. Dans chaque tube sont déposés 16 μl de ce mix auquel on ajoute 4 μl de l'ADNc à amplifier ; les amorces utilisées sont référencées dans le tableau ci-dessous.

PRC/PPRC1	For: 5'-CACTGGTTGACCCTGTTCT-3'	Rev: 5'-GTGTTTCAGGGCTTCTCTGC-3'
ERR α /ESRRA	For: 5'-AAGACAGCAGCCCCAGTGAA-3'	Rev : 5'-ACACCCAGCACCAGCACCT-3'
ATP5B	For: 5'-CCTTCTGCTGTGGGCTATCA-3'	Rev: 5'-TCAAGTCATCAGCAGGCACA-3'
CYCS	For: 5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3'	Rev: 5'-TCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'
PGC-1 α /PPARGCA1	For: 5'-ACTCAAGTGGTGCAGTGACC-3'	Rev: 5'-CTGGGTACTGAGACCACTGC-3'
NRF-1	For: 5'-GGAGTGATGTCCGCACAGAA-3'	Rev: 5'-CGCTGTTAAGCGCCATAGTG-3'
NRF-2/GABPA	For: 5'-AAGGCCACAAATACAGCAC-3'	Rev: 5'-GGGGAACAGAACAGGAAACA-3'
TFAM	For: 5'-CCGAGGTGGTTTTTCATCTGT-3'	Rev: 5'-CAGGAAGTTCCTCCAACGC -3'
FIS1	For: 5'- GGAGGAACAGCGGGATTACGT -3'	Rev: 5'- CTTTCATGGCCTTGTCATGAGC -3'
MFN2	For: 5'- GAAGAACAGGTTCTGGACGTC -3'	Rev: 5'- CCTCATGGCCATCTGTGCCC -3'
β -Globin	For: 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	Rev: 5'-ACACAACTGTGTTCACTAG-3'

Pour chaque expérience, un témoin négatif, à savoir de l'eau, est utilisé à la place de l'ADN pour s'assurer de l'amplification spécifique du gène d'intérêt. Le programme consiste en une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C puis 40 cycles d'amplification. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle, permettant ainsi d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles (mettre un exemple de courbe de qPCR).

Une courbe de fusion est réalisée après la phase d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés. Cette courbe permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques. Pour cela, une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C est effectuée puis une hybridation à 50°C pendant 15 secondes et enfin une étape de fusion avec élévation progressive de la température jusqu'à 95°C par incrément de 0,1°C par seconde, c'est durant cette dernière phase que la fluorescence est lue. Un pic unique pour l'échantillon, se superposant aux pics obtenus pour les dilutions du standard correspondant indique la fiabilité des mesures de quantification.

B.3 Normalisation

Pour la quantification absolue, les valeurs de Ct obtenues pour les différents points de la gamme de dilution en cascade permettent de tracer une droite standard. L'équation de cette droite permet de déterminer le niveau d'expression (exprimé en nombre de copies) du gène d'intérêt correspondant au Ct obtenu pour un échantillon donné. L'expression du gène d'intérêt est ensuite normalisée en rapportant la valeur obtenue à celle calculée pour un gène de référence dont l'expression n'est pas influencée par les diverses conditions.

Pour la quantification relative, on va comparer la différence de Ct entre échantillons deux à deux par la méthode du $\Delta\Delta Ct$, ou quantification relative normalisée par un calibrateur. Le premier delta correspond à la différence entre les Ct du gène référence et du gène d'intérêt. Le second delta

correspond à la différence entre les ΔCt des deux conditions étudiées. L'expression relative R est alors exprimée par la formule suivante :

$$R=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

B : Protocole pour microARNs

Cette qPCR a été faite pour les gènes des miRNAs 34a, 195 et 218. Elle utilise le kit IQ™ Sybr Green Supermix (Invitrogen) et suit le même mode opératoire décrit précédemment en utilisant pour chaque gène une amorce spécifique du miRNA et une amorce universelle fournie dans le kit et reconnaissant la queue poly(A) ajoutée lors de l'étape de reverse transcription. Le programme de qPCR est le suivant, 2 minutes à 95°C et 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Les miARN testés sont les suivants et leur expression est normalisée en fonction de celle de miR-26b dont l'expression a été décrite comme la plus stable pour les modèles thyroïdiens (Chang *et al.*, 2010) et en fonction de l'expression de U5snRNA, un snoARN très stable, pour les modèles de glioblastomes (Galiveti *et al.*, 2010).

miR-218	5'-CGTTGTGCTTGATCTAACCATGT-3'	miR-561	5'-CGCAAAGTTTAAGATCCTTGAAGT-3'
miR-15b	5'-GCGAATCATTATTTGCTGCTCTA-3'	miR-107	5'-GTCGTGAGCAGCATTGTACAG-3'
miR-181d	5'-ATTCATTGTTGTCGGTGGGT-3'	miR-146b	5'-TGAGAACTGAATTCCATAGGCT-3'
miR-424	5'-AAACGTGAGGCGCTGCTAT-3'	miR-96	5'-TTTGGCACTAGCACATTTTTGCT-3'
miR-99a	5'-ACCCGTAGATCCGATCTTGTG-3'	miR-221	5'-ACCTGGCATAACAATGTAGATT-3'
miR-100	5'-GCCCAAGCTTGTATCTATAGGTATG-3'	miR-885	5'-AGGCAGCGGGGTGTAGTGGATA-3'
miR-21	5'-CGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'	miR-31	5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3'
miR-30a	5'-TGTA AACATCCTCGACTGGAAG-3'	miR-542-3p	5'-CGTGTGACAGATTGATAACTGAAA-3'
miR-365	5'-GCTAATGCCCTAAAAATCCTTAT-3'	miR-125a-3p	5'-GGTGAGGTTCTTGGGAGCC-3'
miR-26b	5'-CGCTTCAAGTAATTCAGGATAGGT-3'	U5snRNA	5'-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-3'

VII : Détection de protéines par Western-Blot (WB)

A : Principe de la technique

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité relative d'une protéine dans un échantillon. Le motif antigénique de la protéine d'intérêt est reconnu par un anticorps primaire dirigé contre cette protéine. Un anticorps secondaire (une immunoglobuline de type G non spécifique) couplée à la peroxydase reconnaît ensuite l'anticorps primaire. Le complexe antigène/anticorps est ensuite révélé par chimioluminescence.

B : Réactifs

B.1 Tampon Tris-SDS pH 8,8

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser
Tris	1 M	1,12 g
SDS	20%	0,20 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 100 ml de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 6,8 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C.

B.2 Tampon Tris-SDS pH 6,8

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser
Tris	300 mM	3,63 g
SDS	20%	0,20 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 100 ml de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,8 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C.

B.3 Tampon échantillon 2X

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser ou volume à prélever
Tampon Tris-SDS pH	100m M	10 ml
SDS	1,2%	1,2 g
Glycérol	4,1 M	37,8 g
Bleu de bromophénol	28,9 μ M	2 mg
2 β Mercaptoéthanol	1,875 M	15 ml

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 100 ml de tampon, il sera conservé à +4°C.

B.4 tampon électrophorèse 10X

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	1,37 M	81 g
KCl	25,5 mM	1,9 g
Tris	250 mM	30,3 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 1 l de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,3 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C. Une dilution au 1/10^{ème} est réalisée avant toute utilisation de ce tampon.

B.5 Tampon de transfert

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser
Tris	20 mM	2,4 g
Glycine	150 mM	11,3 g
Ethanol	20%	200 ml

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 1 l de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,3 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C.

B.6 Tampon TBS (Tris Buffered Saline) 10X

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	1,37 M	81 g
KCl	25,5 mM	1,9 g
Tris	250 mM	30,3 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 1 l de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 7,4 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C. Une dilution au 1/10^{ème} dans 1 l d'eau distillée est réalisée avant toute utilisation de ce tampon avec addition de 1 ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Lyon) afin d'obtenir du tampon TBS/Tween 20.

B.7 Anticorps monoclonaux

Nom	Fournisseur	Dilution finale
Anti-OXPHOS	Mitosciences (Eugène, Oregon, Etats-Unis)	1/500 ^{ème}
Anti-Complexe IV (MS408)	Mitosciences (Eugène, Oregon, Etats-Unis)	1/2000 ^{ème}
Anti-Complexe II (MS203)	Mitosciences (Eugène, Oregon, Etats-Unis)	1/2000 ^{ème}
anti-PGC-1 α (Ab77210)	Abcam (Cambridge, Royaume-Uni)	1/2000 ^{ème}
Anti- α -tubuline	Abcam (Cambridge, Royaume-Uni)	1/10000 ^{ème}

C : Protocole

C.1 Préparation des échantillons

Chaque culot cellulaire est repris dans 50 μ L de Cell Lysis Buffer 1X (Cell Signaling Technology[®] ; Saint-Quentin, Yvelines, France). Après 5 minutes d'incubation sur glace, les cellules sont grattées puis placées à centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 14000 g. Le surnageant est alors prélevé pour le dosage protéique à l'aide du kit Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific ; Courtaboeuf, France). Ce kit repose sur l'utilisation d'une gamme étalon à partir de standards dont la concentration en protéines est connue afin de déterminer celle des échantillons testés. La gamme

étalon est réalisée grâce à des dilutions en cascade d'une solution stock contenant de l'Albumine à 2 mg/ml dans du Cell Lysis Buffer 1X.

Gamme réalisée

Gamme (en µg/µl)	250	125	50	25	5	0
Tube	A	B	C	D	E	F
Volume diluant (en µl)	70	40	45	40	40	40
Volume/ Source (en µl)	10/stock	40/A	30/B	40/C	10/D	0

Le tampon de réaction se constitue d'un mélange d'une solution A, contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3), du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), de l'acide bicinchoninique ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, le réactif colorigène permettant le dosage) et du tartrate de sodium ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$); et d'une solution B, contenant du sulfate de cuivre (CuSO_4). Ce sulfate de cuivre est un composé bleu en solution qui réagit avec l'acide bicinchoninique pour former un composé vert en solution et capable de interagir avec la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines ce qui produit un composé violet absorbant à 562 nm. Dans une microplaque 96 puits, on dépose 200 µl du tampon de réaction dans chaque puits, puis sont déposés, 20 µl de chaque standard ou échantillon à doser, généralement dilué pour ne pas être hors gamme. La plaque est ensuite placée à incuber à 37°C pendant 30 minutes avant d'être lue au spectrophotomètre VICTOR™ X3 (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) à 562 nm. Un volume équivalent à 20 µg de protéines totales est alors prélevé et le même volume de tampon d'échantillon 2X y est ajouté. Afin de dénaturer les interactions protéiques perturbant la migration sur gel, le mélange est chauffé à 95°C pendant 10 minutes puis déposé sur gel d'acrylamide 4-20% (Mini-PROTEAN® Gels ; Biorad ; Marnes-la-Coquette, France).

C.2 Dépôt des échantillons et migration

Cette étape a pour but de séparer les protéines des échantillons selon leur poids moléculaire. Après dénaturation, les échantillons de protéines sont déposés dans chaque puits. Un marqueur de poids moléculaire (*Precision Plus Protein Dual Color Standards* ; BioRad) est également déposé pour suivre la migration. La cuve d'électrophorèse (BioRad) est fermée et reliée au générateur (PowerPac HC ; BioRad). Une première migration de 20 minutes à 100 V est réalisée afin de concentrer les échantillons au fond du gel de concentration. Cette étape est suivie d'une seconde migration de 1h30 à 140 V visant à séparer les protéines. Ces dernières ont été rendues électronégatives par l'action du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), elles se séparent donc uniquement en fonction de leur poids moléculaire (exprimé en kDa) et ce, qu'autant plus loin du puits que leur masse est faible. Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration doit être stoppée.

C.3 Transfert sur membrane de PVDF

Cette étape permet le transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) (*Amersham Hybond-P* ; GE Healthcare ; Orsay, France). La membrane est placée pendant 15 secondes dans un bain d'éthanol absolu afin d'être ionisée puis rincée 5 minutes dans de l'eau distillée puis équilibrée 30 secondes dans le tampon de transfert. Pendant ce laps de temps, le gel est démoulé et placé dans l'appareil de transfert (*Trans-Blot Semy-Dry* ; BioRad) sur du papier buvard (*Whatman* ; VWR ; Fontenay sous bois, France) imbibé de tampon de transfert. La membrane est déposée sur le gel et recouverte à son tour de papier buvard imbibé de tampon de transfert. Ce transfert des protéines est réalisé par application pendant une heure d'un courant de 260 mA.

C.4 Saturation de la membrane

Afin de saturer les sites de fixation aspécifiques, la membrane est placée dans une solution de saturation composée de 5% de lait écrémé repris dans tu tampon TBS/Tween 20, sous agitation pendant une heure minimum à température ambiante (ou une nuit à +4°C).

C.5 Incubation de la membrane avec l'anticorps primaire

La membrane est rincée 3 fois pendant 5 minutes dans un bain de TBS/Tween 20 puis incubée dans la solution d'anticorps primaire (dilué à la concentration souhaitée) pendant 2 heures à température ambiante (ou une nuit à +4°C).

C.6 Incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire

Après 3 rinçages de 5 minutes dans du TBS/Tween 20, la membrane est incubée pendant 2 heures dans la solution d'anticorps secondaire (Anticorps de souris dilué au 1/20000^{ème} dans du TBS/Tween 20) dirigé contre les immunoglobulines G de l'anticorps primaire couplé à la peroxydase.

C.7 Révélation

L'hybridation des anticorps sur la membrane est révélée par chimioluminescence à l'aide du kit Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est rincée deux fois 5 minutes avec du tampon TBS/Tween 20 puis une fois avec du tampon TBS. Un mélange contenant 2 ml de la solution A du kit ECL Plus et 50 µl de la solution B est déposé uniformément sur la membrane. Après 5 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, l'excès de réactifs est retiré de la membrane et celle-ci est placée dans l'appareil de détection (*Chemidoc XRS* ; BioRad). Différents temps d'exposition sont réalisés jusqu'à l'obtention de bandes d'intensité satisfaisante mais non saturante.

C.8 Quantification

L'intensité des différentes bandes est quantifiée grâce au logiciel Image Lab 3.0 (BioRad).

VIII : Oxygraphie sur XF-24

A : Principe de la méthode

La technologie des *XF Extracellular Flux Analyzers* (Seahorse Bioscience ; Copenhague, Danemark) permet de mesurer en temps réel et simultanément les deux principales voies de productions d'énergie de la cellule, la production de lactate et la respiration mitochondriale de cellules ensemencées sur des microplaques. L'un de ces analyseurs, le XF-24 permet une mesure simultanée de la consommation en oxygène (OCR : *Oxygen Consumption Rate*) et de l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR : *ExtraCellular Acidification Rate*) au niveau de 24 puits.

La mesure se fait par isolement d'un volume faible (moins de 7 μ l) du milieu recouvrant une monocouche de cellules. La respiration cellulaire et la glycolyse anaérobie induisent des changements rapides facilement mesurables de composition de ce milieu. Les concentrations en oxygène dissout et en protons libres (pH) sont mesurées dans cette « microchambre transitoire » par intervalle de quelques secondes grâce aux variations d'émissions de sondes fluorophores placées à 200 μ m de la monocouche cellulaire et lues par des capteurs semi-conducteurs (mettre schéma microchambre seahorse).

B : Protocole

B.1 Hydradation du kit Cell Mito Stress :

Trois drogues sont utilisées pour étudier l'impact des différentes transfections testées sur la fonction OXPHOS. Ces drogues sont l'Oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase induisant une diminution de la respiration en oxygène liée au renouvellement de l'ATP, le FCCP (Trifluorocarbonylcyanide Phenylhydrazone), un protonophore découplant la chaîne respiratoire et induisant une consommation maximale de l'oxygène, et l'Antimycine A, un inhibiteur du complexe II inhibant complètement la chaîne respiratoire et inhibant la consommation en oxygène par cette

dernière (mettre schéma oxygraphie). Ces drogues sont fournies stabilisées dans un kit, le Cell Mito Stress Kit (Seahorse Bioscience). Sous forme de lyophilisats, elles doivent être solubilisées dans 180 µl de DMSO après une centrifugation initiale. La solution mère ainsi obtenue est à 2,5 mM et aliquotée pour une conservation à -20°C.

B.2 Ensemencement sur plaque de culture XF-24

Les microplaques de culture XF-24 (Seahorse Bioscience) utilisées pour l'ensemencement de cellules destinées de l'appareil XF-24 comportent 24 puits dont la surface d'adhésion est équivalente à celle d'une microplaque 96 puits, soit 0,32 cm², le nombre de cellules ensemencées doit donc être adapté en conséquence (10 à 40 000 cellules par puits) afin d'obtenir un degré de confluence d'environ 70%. Afin d'éliminer le bruit de fond, 4 puits sont laissés vides avec de préférence, 2 puits en périphérie et 2 autres au centre de la plaque. Les cellules en suspension sont déposées dans 100 µl de leur milieu de culture, puis incubées à 37°C et 5% de CO₂ de une à cinq heures afin qu'elles adhèrent au support. Ce délai passé, 150 µl de milieu sont rajoutés avant de replacer la microplaque à incuber.

B.3 Hydratation de la cartouche XF24 extracellular flux assay kits

Les pastilles de fluorophores des cartouches XF24 extracellular flux assay kits (Seahorse Bioscience) doivent réhydratées dans le tampon de calibration fournit avec le kit Flux pack (Seahorse Bioscience). Pour cela, du tampon de calibration est déposé à raison de 1 ml par puits. La cartouche est ensuite placée à incuber dans une étuve à 37°C sans addition de CO₂ au moins 6 heures avant le début de l'oxygraphie. En parallèle, l'appareil doit également être allumé à l'avance afin de stabiliser la température de la chambre de mesure à 37°C.

B.4 Préparation des réactifs

Un aliquot de 25 ml de milieu DMEM Seahorse (Seahorse Bioscience) non tamponné, sans glucose ni pyruvate, est préparé : Du glucose et du pyruvate sont ajoutés aux concentrations utilisées pour la culture des cellules ; à savoir pour les XTC.UC1 et les FTC.133 3,151 g/l de Glucose et 110 mg/l de Sodium Pyruvate, et pour les NIH-3T3 et les T98G, 1 g/l de Glucose et 110 mg/l de Sodium Pyruvate. Il est nécessaire d'éviter le SVF et tout réactif avec un fort pouvoir tampon afin de ne pas fausser les mesures. Le milieu est équilibré à 37°C dans un bain marie, puis le pH est ajusté à 7,4 par ajout de NaOH 5M. Le milieu de culture des cellules à tester est retiré et remplacé par 500 µl de ce milieu complété avant que la microplaque ne soit replacée dans un incubateur à 37°C et sans CO₂.

Les différentes drogues utilisées sont diluées dans le milieu DMEM Seahorse complété en Glucose et Pyruvate à 10 fois la concentration finale souhaitée (1 µM) puis disposée sur dans les puits verts de la cartouche XF24 extracellular flux assay kits suivant l'ordre suivant :

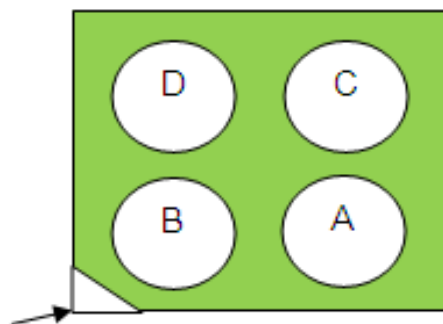
A : 55 µl d'Oligomycine 10 µM

B : 60 µl de FCCP 10 µM

C : 65 µl de CCCP 10 µM

D : 70 µl d'Antimycine A 10 µM

Coin biseauté de la plaque



B.5 mesure polarographique

Le programme de mesure suivant est programmé sur l'appareil grâce à l'interface dédiée XF-Software:

- Calibration des sondes
- Placer la microplaque de cultureensemencée
- Equilibrage de la température
- Mesure de la respiration basale sur 3 cycles (3 minutes de mélange, 2 minutes d'attente et 3 minutes de mesure)
- Injection du contenu du port A (Oligomycine)
- Mesure de la respiration sur deux cycles
- Injection du contenu du port B
- Mesure de la respiration sur deux cycles
- Injection du port C
- Mesure de la respiration sur deux cycles
- Injection du port D
- Mesure de la respiration sur deux cycles

Le run est ensuite lancé et lorsque ce dernier est terminé, l'intégrité des cellules est contrôlée sous microscope.

B.6 Normalisation

L'OCR est exprimé en pmoles/min, aussi pour pouvoir comparer l'effet des différentes conditions testées les unes par rapport aux autres, il est nécessaire de normaliser ces valeurs en fonction de la quantité réelle de cellules présentes dans chaque puits. Pour cela, on dose la quantité totale de protéines présentes grâce au kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific) suivant le même protocole que précédemment (chapitre VI.C.1 : Préparation des échantillons). L'OCR est alors

exprimé en pmoles/min/mg de protéine et les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes avec les valeurs d'OCR dites de fraction oligo-sensible, correspondant à la valeur de la respiration basale moins celle mesurée après injection de l'oligomycine, et celles d'OCR dites de fraction oligo-insensible, correspondant aux valeurs mesurées après injection de l'oligomycine (mettre exemple de schéma).

IX : Immunoprécipitation de la chromatine et hybridation sur puces à ADN (ChIP-on-chip)

A : Principe de la méthode

Le ChIP-on-chip, ou ChIP-chip, est une technologie qui permet l'étude *in vivo* des sites de liaisons de protéines à l'ADN, et plus particulièrement de facteurs de transcription sur des séquences régulatrices des promoteurs proximaux ou distaux. Elle fait appel à deux techniques : l'immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) et l'hybridation sur puces à ADN correspondant à des zones promotrices de gènes (chip).

Après un traitement rapide des cellules (1 million) par du formaldéhyde 37%, agent fixant les protéines de manière covalente à l'ADN, le tissu ou les cellules sont lysés et l'ADN fragmenté par sonication. En utilisant un ou plusieurs anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques d'un facteur de transcription ou d'un coactivateur, il est possible de capturer les séquences ciblées par ces facteurs. Une étape de « reverse crosslink » permet de détacher les protéines de la chromatine qui sera ensuite purifiée. Au cours de l'immunoprécipitation (IP), plusieurs points de contrôle sont à effectuer. Tout d'abord après l'étape de sonication, une électrophorèse sur gel d'agarose permet de contrôler la taille des fragments obtenus. Ensuite, avant de passer à l'étape d'amplification puis d'hybridation sur puce à ADN, une PCR quantitative (qPCR) est réalisée afin de mesurer

l'enrichissement et le rendement du CHIP par comparaison à une fraction de chromatine non immunoprécipitée ou par rapport à une fraction immunoprécipitée de façon non spécifique (IgG).

En sortie de CHIP, la quantité de matériel est trop faible pour permettre une hybridation correcte sur la puce ; une étape d'amplification est donc obligatoire. L'hybridation, qui suit, permet d'identifier les gènes dont l'expression est régulée par les facteurs considérés, par comparaison entre l'échantillon immunoprécipité (IP) et l'échantillon non-immunoprécipité (l'Input). L'IP est marqué par un fluorophore émettant dans le vert (Alexa 555) tandis que l'Input l'est par un fluorophore qui émet dans le rouge (Alexa 647). La superposition de ces deux signaux permet de définir les séquences enrichies. Les échantillons peuvent être hybridés sur plusieurs types de puces : les puces à îlots CpG (Weinmann et coll., 2002), les puces à promoteurs (Kirmisis et Farhnam, 2004), les puces tiling (Mockler et Ecker, 2005) et les puces à façon. Les premières, les moins coûteuses, ne couvrent que ≈50% du génome total (dont 100% des gènes ubiquitaires), tandis que les puces à promoteurs couvrent d'avantage de gènes d'intérêt mais impliquent qu'ils soient bien annotés. En combinant ces informations avec les données issues de l'étude du transcriptome (Kirmisis et Farhnam, 2004), il est envisageable de recréer des réseaux de régulation transcriptionnelle et ainsi élucider les dérégulations qui entrent en jeu dans les états pathologiques.

B : Réactifs

B.1 Solutions pour CHIP (à préparer le jour même et à garder sur glace jusqu'à utilisation) :

Solution 1 : 1 mL PBS 10X, 1 mL PIC 10X, 270 µL de formaldéhyde, 7,7 mL d'eau

Solution 2 : 1 mL PBS 10X, 1 mL PIC 10X, 8 mL d'eau

B.2 Salmon Sperm DNA

Solution stock à 10 mg/ml à diluer dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml. La solution est alors soniquée grâce au sonicateur Bioruptor (Diagenode ; Liège, Belgique) 4 fois suivant le cycle suivant : 15 secondes ON et 10 secondes OFF. Puis le tube est placé à centrifuger 15 minutes à 5000g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et aliquoter pour une conservation à -20°C.

B.3 Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Le cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC ; Roche ; Boulogne-Billancourt, France) est fourni sous forme de pastilles concentrées à 200X. Afin d'obtenir une solution contenant du PIC à 10X, 4 pastilles sont dissoutes dans 2 ml d'eau stérile, tandis que pour une solution de PIC 200X, 1 pastille est dissoute dans 1 ml d'eau stérile.

B.4 Protéinase K (Invitrogen by Life Technologies)

La protéinase K est fournie en solution concentrée à 20 mg/ml. La concentration finale utilisée est de 10 mg/ml, aussi une dilution au ½ est réalisée en ajoutant 500 µl d'eau stérile à 500 µl de solution stock de protéinase K.

B.5 Solutions Stocks Ioniques :

Réactifs	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (Mol)	Masse à peser (g)	Volume d'eau stérile ajoutée (ml)	pH
NaHCO ₃	84,007	1	8,4	100	/
NaCl	58,44	5	29,2	100	/
EDTA	292,24	0,5	14,16	100	8
Tris-HCl	157,59	1	15,76	100	6,5

B.6 SDS Lysis Buffer

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser ou volume prélevé
SDS 20%	1%	50 ml
EDTA 0,5 M	10 mM	20 ml
Tris	50 mM	6,06 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final d'un litre de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,1 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C. Des aliquots de 3 ml de SDS Lysis Buffer auxquels on ajoute 15 µl de Protease Inhibitor Cocktail 200X sont préparés. Ils serviront à lyser les cellules à hauteur d'un aliquot pour 1.10⁶ cellules.

B.7 Dilution Buffer (DB)

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser ou volume prélevé
SDS 20%	0,01%	500 µl
EDTA 0,5 M	1,2 mM	2,4 ml
Tris HCl	16,7 mM	2,63 g
Triton X-100	1,1 %	11 ml
NaCl	167 mM	9,75 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final d'un litre de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,1 grâce à du HCl à 5n, il sera conservé à +4°C. Du PIC 200X est ajouté au DB pour réaliser les lavages des billes magnétiques, à raison de 4,5 µl de PIC 200X pour 900 µl de DB.

B.8 High Salt

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser ou volume prélevé
SDS 20%	0,1%	5 ml
EDTA 0,5 M	2 mM	4 ml
Tris HCl 1M	20 mM	3,15 g
Triton X-100	1 %	10 ml
NaCl	500 mM	42 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final d'un litre de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8,1 grâce à du HCl 5N, il sera conservé à +4°C.

B.9 TE Buffer

Réactifs	Concentration finale	Masse à peser ou volume prélevé
EDTA 0,5 M	1 mM	2 ml
Tris-HCl 1M	10 mM	1,58 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final d'un litre de tampon. Son pH est ensuite ajusté à 8 grâce à du HCl 5N il sera conservé à +4°C.

C : Protocole :

C.1 Préparation de l'échantillon

C.1.1 Crosslink :

10⁶ cellules XTC.UC1 sont mises à incuber dans la solution 1 (Formaldéhyde 37%, eau, PBS 10X, PIC 10X) pendant exactement 10 min. Le formaldéhyde entraîne une liaison covalente des protéines à leurs séquences nucléotidiques cibles. La réaction est stoppée par addition de Glycine 2,5 M.

C.1.2 Lavages

Après centrifugation (3 500 rpm, 8°C, 10 min), le surnageant est retiré tandis que le culot est lavé deux fois avec de la solution 2 (PBS 10X, PIC 10X, eau). Chaque lavage est suivi d'une nouvelle centrifugation (3 500 rpm, 8°C, 10 min) avec retrait du surnageant.

C.1.3 Sonication :

Le culot est resuspendu dans un mélange de SDS Lysis Buffer/PIC 1X final. La sonication permet la rupture des membranes cellulaires et la fragmentation de la chromatine grâce à l'utilisation d'ondes sonores de très haute fréquence. L'obtention de fragments de taille comprise entre 500 et 1000 pb est recommandée pour l'hybridation sur puce. La sonication est réalisée en immersion dans un bain à

4°C par le Bioruptor® (Diagenode) suivant des cycles, 15 sec ON et 1 min OFF, avec un total de 3 min de sonication (15 min au timer).

C.1.4 Reverse crosslink

Cette étape permet de détacher le facteur étudié de ses séquences cibles. Tout d'abord, les liaisons sont rompues par une incubation de 2 h à 65°C en présence de NaCl 5 M (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont ensuite incubés 20 min à 37°C en présence de RNase A avant une dernière incubation à 45°C pendant 1h en présence d'une solution composée, pour chaque tube, de 10 µl d'EDTA 0,5 M, de 20 µl de Tris-HCl 1M et de 2 µl de Protéinase K à 10 mg/ml.

C.1.5 Purification de l'ADN

La purification se fait dans des tubes Phase Lock Gel Light 2 ml (5Prime ; Hambourg, Allemagne) grâce à des solvants organiques. Les échantillons sont déposés dans chaque tube avec du Phénol-SEVAG (phénol : chloroforme : alcool isoamylique) (Invitrogen). Après une centrifugation de 3 min à 13 000 rpm, du Phénol-SEVAG est à nouveau ajouté puis on réitère l'opération avec du SEVAG seul (chloroforme : alcool isoamylique) (Sigma-Aldrich). La phase aqueuse est finalement prélevée et déposée dans un nouveau tube 1,5 ml contenant de l'éthanol 95° froid, permettant la précipitation de l'ADN, des sels (NaCl 5 M) et un carrier d'acides nucléiques, le glycogène. La précipitation s'effectue pendant une nuit à -20°C. Une centrifugation (30 min, à 4°C et 13 000 rpm) permet d'obtenir un culot d'ADN qui après élimination du surnageant est lavé avec de l'éthanol 70° lors d'une seconde centrifugation (15 min, à 4° et 13 000 rpm). Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot est repris dans 15 µL d'eau.

Le contrôle de la sonication se fait par dosage au Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Nucleic acids, DNA-50) et par migration sur gel d'agarose et sur puce de Bioanalyser 2100 (Agilent).

C.2 Contrôle de la sonication

C.2.1 Dosage des acides nucléiques

La concentration en ADN d'un échantillon est évaluée par mesure de la densité optique (DO) grâce au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Nucleic acids, DNA-50).

C.2.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Selon le temps de sonication, la taille des fragments va varier. Cette variation peut être observée par une migration à 100 Volts sur un gel d'agarose à 1,5% renfermant du Bromure d'Ethidium (BET) dans une cuve contenant du TAE 0,5X. Les fragments d'ADN seront révélés à l'aide d'une table à UV.

C.2.3 Bioanalyzer 2100

Le Bioanalyseur Agilent 2100 permet l'analyse de la migration en simultanée de 12 échantillons de très faible volume d'échantillon (1µl). L'électrophorèse est réalisée par le biais de puces DNA 7500 renfermant un gel de polyacrylamide contenant un fluorophore. Les fragments sont marqués puis séparés selon leur taille, grâce au réseau de capillaires présents dans la puce, et leur fluorescence est mesurée dans l'appareil. Le protocole détaillé est décrit sur le site de la plateforme (annexe 1)

C.3 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

C.3.1 Immunoprécipitation :

L'immunoprécipitation s'effectue par l'intermédiaire de billes magnétiques de type Dynabeads Protein A (Invitrogen). Ces billes vont fixer les anticorps dirigés contre le facteur de transcription étudié via les protéines A couvrant leur surface. Le choix des billes magnétiques est lié à des études réalisées par l'équipe qui ont montré qu'elles étaient nettement plus efficaces et pratiques d'utilisation que des billes d'agarose.

C.3.2 Coating des billes magnétiques

La première étape consiste à coater les billes, c'est-à-dire à saturer les sites de fixation aspécifiques. Deux séries de tubes contenant des billes magnétiques sont préparées, la première servira pour le pré-clearing et la seconde pour l'immunoprécipitation. Après deux rinçages avec du Dilution Buffer (DB), les billes sont coatées, sous rotation pendant 5h à 4°C, grâce à un mélange de DB, de Protease Inhibitor Cocktail 200X (PIC 1X final) et d'ADN soniqué de sperme de saumon à 0,1 mg/ml (Ambion).

C.3.3 Pré-cleaning

Cette étape, qui consiste en un premier lavage de la chromatine, permet de réduire la fixation de protéines non-spécifiques aux billes magnétiques. Les tubes sont placés sur un rack magnétique afin de pouvoir éliminer la solution de coating tout en conservant les billes. Ces dernières sont reprises dans une solution composée de DB, de PIC 200X (1X final) et de l'échantillon soniqué, avant d'être incubées en rotation pendant 30 min à 4°C.

C.3.4 ChIP

Une fraction du surnageant est prélevée et conservée à 4°C jusqu'à l'étape d'élution. Cet échantillon ne subit pas l'immunoprécipitation afin de constituer le témoin de chromatine totale, ou Input. Il représente exactement 1/11ème du surnageant, afin de conserver au cours de l'expérimentation un rapport constant entre IP et Input de 1/10. Le reste du surnageant est placé une nuit à incuber en présence de l'anticorps d'intérêt, anti-PRC (Eurogentec, Angers, France); un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide humain (1520-1534) sélectionné préalablement et validé par western blot dans une précédente étude (Raharijaona *et al.*, 2009). Parallèlement, une immunoprécipitation avec une IgG non immune est réalisée sur le même échantillon afin de servir de contrôle « non-spécifique ».

Le lendemain, les billes coatées de la seconde série de tubes sont lavées deux fois au DB avant d'être mise en contact pendant 2h sous rotation à 4°C avec les IP.

C.3.5 Lavages

Les billes magnétiques sont lavées, deux fois avec du DB, puis deux fois avec du tampon Tris-EDTA (tampon TE), sous agitation pendant 5 min à 4°C.

C.3.6 Elution des complexes ADN/Protéines

L'élution des IP se fait grâce à un tampon d'élution (EB) constitué, pour chaque tube, de 25 µl de SDS 20%, de 50 µl de NaHCO₃ 1M et de 425 µl d'eau stérile, sous agitation à température ambiante. Afin de se situer dans les mêmes conditions salines et de pH, du tampon EB est également ajouté aux Inputs, qui sont conservés à température ambiante jusqu'au reverse crosslink.

C.3.7 Reverse crosslink et purification

Le reverse crosslink et la purification sont réalisés de la même façon que pour la contrôle de la sonication (C.2 Contrôle de la sonication). Les échantillons sont ensuite dosés au Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Nucleic acids, DNA-50) et contrôlés par PCR quantitative.

C.4 Contrôle par qPCR

La qPCR est réalisée en plaque 96 puits sur l'appareil ABI 7900-HT (Applied Biosystems). Une dilution au dixième des IP est réalisée afin de pouvoir les comparer aux Inputs avec un ratio 1:1 (seul 1/11ème de l'échantillon a été prélevé pour faire l'Input). De l'ADN génomique humain est utilisé comme contrôle positif pour la qPCR, tandis que de l'eau sert de contrôle négatif.

Un mix, contenant les amorces sens et antisens à 10 µM de concentration finale, la BSA 10X et le power SYBR Green (Applied Biosystems), est préparé. Sur les cellules XTC.UC1, le gène recherché comme meilleur contrôle positif après IP de PRC est NRF-1 pour la qPCR. En sortie de qPCR,

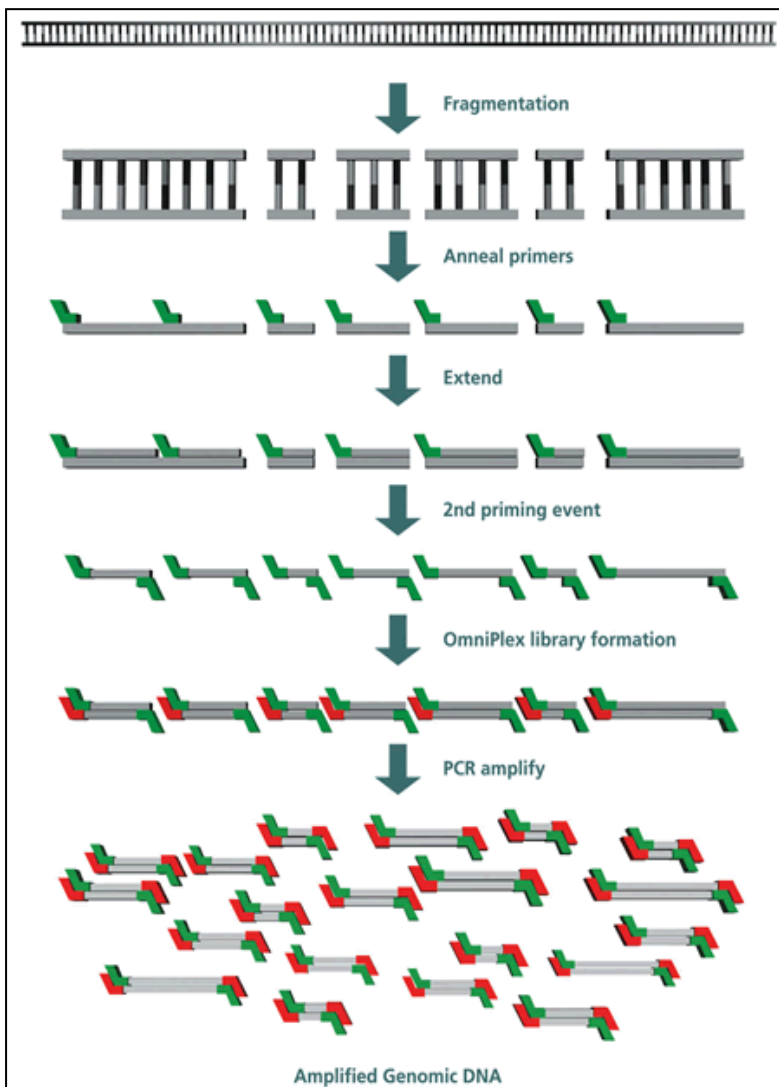


Figure M2 : Principe du GenomePlex Complete Whole Genome Amplification kit

l'enrichissement est calculé en comparant les valeurs de Ct des IP et des IgG selon la formule suivante, $2^{Ct_{IgG}-Ct_{IP}}$.

C.5 Amplification de l'ADN

L'amplification des échantillons est effectuée en suivant le protocole décrit par Sigma « Genomeplex Complete Whole Genome Amplification Kit WGA2 » (Sigma-Aldrich). Dans le protocole il est décrit une étape de fragmentation aléatoire de l'ADN, or l'ADN étant soniqué lors du ChIP, cette étape n'est donc pas nécessaire. La première étape consiste dès lors en la création d'une bibliothèque d'ADN par adjonction d'amorces universelles qui vont permettre la synthèse de fragments doubles brins à partir de ceux issus du ChIP. Ces amorces serviront ensuite de point de départ à l'amplification (figure M2)

C.5.1 Préparation de la bibliothèque

Chaque échantillon est préparé pour l'amplification par mélange avec le tampon de préparation de la bibliothèque de séquences d'ADN fragmenté flanquées par des amorces universelles. Ils sont incubés 2 min à 95°C en présence de la solution de stabilisation afin de les dénaturer, puis ils sont immédiatement placés dans la glace pour conserver leur état simple brin. La synthèse du brin complémentaire se fait grâce à l'ajout dans chaque tube de l'enzyme permettant la synthèse de la bibliothèque. Ces tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmé selon les paramètres suivants : 20 min à 16°C ; 20 min à 24°C ; 20 à 37°C et 5 min à 75°C, puis conservation à 4°C.

C.5.2 Amplification

La réaction d'amplification est réalisée en présence d'un master mix contenant de l'Amplification Master Mix 10X, de l'eau nucléase-free et la WGA DNA Polymérase. Quatorze cycles de PCR sont effectués, après une dénaturation initiale de 3min à 95°C, dans un thermocycleur réglé avec les paramètres suivants : dénaturation, 15 sec à 94°C ; hybridation/élongation, 5 min à 65°C.

C.5.3 Purification des amplicons

Les produits d'amplification sont purifiés sur colonnes QIAquick suivant le protocole donné par le fournisseur (PCR purification kit protocol de QIAGEN). Les ADN sont ensuite dosés au Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Nucleic acids, DNA-50).

C.6 Marquage de l'ADN

Le marquage est effectué en utilisant le kit Bioprim Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System (Invitrogen) en suivant le protocole rédigé par la plateforme.

C.6.1 Incorporation de dUTP marqués

L'ADN purifié est incubé 5 min à 95°C en présence d'eau et d'une solution de random primer 2,5X (amorces aléatoires, Tris-HCl 125 mM, MgCl₂ 12,5 mM, 2-mercaptoéthanol 25 mM) et placé dans la glace immédiatement après. Un mélange de nucléotides, dont des 5-aminohexylacrylamido-dUTP (aha-d-UTP), est ajouté dans chaque tube ainsi que le fragment exo-Klenow. Ce fragment correspond à une forme mutée du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et permet une polymérisation à taux élevé de par sa déficience en activité exonucléasique 5'-3' et 3'-5'. Le groupement aminohexylacrylamide (aha) sert de bras espaceur entre le nucléotide et le marqueur fluorescent qui est ajouté par la suite. Après une incubation de 2h à 37°C, la réaction de polymérisation est arrêtée par ajout de solution Stop (EDTA 0,5 M, pH 8).

Les échantillons sont ensuite purifiés sur colonne après avoir été mélangé à du tampon de fixation. L'élution se fait, après lavage par un tampon de lavage puis de l'eau. L'incorporation est contrôlée au Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Nucleids acids, DNA-50).

C.6.2 Couplage avec des fluorochromes

Les fluorochromes (Alexa 647 pour les Input et Alexa 555 pour les IP) repris dans du DMSO (Diméthyle Sulfoxide) sont ajoutés à l'ADN, préalablement lavé à l'éthanol 100%, en présence d'un

tampon de couplage 2X et l'ensemble est placé 1h à incuber à température ambiante. Le DMSO sert de support à la réaction d'estérification qui permet la fixation des Alexa au groupement aha. L'ADN ainsi marqué est purifié comme précédemment à ceci près que l'élution se fait avec de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. La bonne incorporation des fluorochromes est contrôlée au Nanodrop ND-1000 (module d'analyse : Microarray, DNA-50).

C.7 Hybridation sur lames Agilent

L'hybridation se fait sur des lames *Agilent Human Promoter ChIP-on-chip 244K array* (Agilent Technologies ; Santa Clara, Californie, Etats-Unis) contenant environ 17 000 sondes 60-mer par puce et correspondant aux promoteurs des gènes de miARN. L'hybridation et les lavages sont réalisés en suivant le protocole fourni par Agilent « *Agilent Mammalian ChIP-on-chip protocol 10.11* » section « *Hybridization and wash* ». IP et Input marqués de chaque échantillon sont mélangés avant ajout d'un mix d'hybridation, composé d'Human cot-1 DNA et de « *Blocking agent et d'Hybridization Buffer* ». Après une incubation de 3 min à 95°C, les tubes sont immédiatement placés 30 min dans un thermoblock à 37°C. Chaque échantillon est ensuite déposé sur la « *gasket slide* », elle-même positionnée sur la lame et l'ensemble est placé dans la chambre d'hybridation. L'hybridation se fait dans une rôtisserie en rotation (20rpm) pendant 24h à 65°C.

L'hybridation achevée, la lame est lavée par passages successifs dans 5 bains. Pour commencer, un lavage dans un premier tampon à T° ambiante (*Wash Buffer 1, Agilent*), permet de désassembler la « *gasket slide* » et la lame. Le second, 5 min dans ce même tampon à T° ambiante, assure un rapide lavage de la surface active de la lame, le suivant est réalisé dans un second tampon de lavage (*Wash Buffer 2*) à 31°C pendant 5 min. Ensuite, dix secondes dans un bain d'Acétonitrile (Sigma-Aldrich), permettent de sécher la lame avant un passage de 30 secondes dans la solution de stabilisation qui va fixer les séquences, permettant ainsi une conservation de la lame.

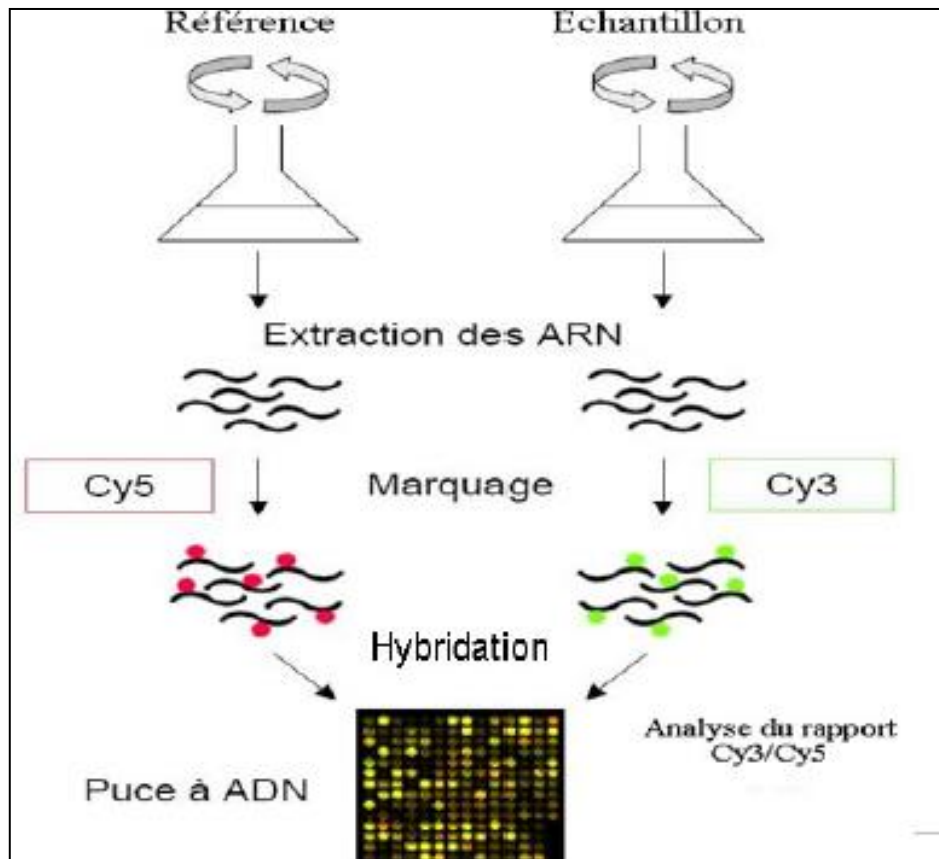


Figure M3 : résumé des étapes permettant d'hybrider une puce à ADN.

La référence est commune à tous les échantillons et permet de les comparer entre eux.

C.8 Extraction et analyse des données

Les lames sont ensuite lues par le Scanner Agilent® G2565BA et les données sont extraites grâce au logiciel Feature Extraction v10.7(Agilent).

Une fois l'extraction effectuée, l'analyse est réalisée à l'aide d'un script établi par la plateforme afin de mettre en évidence les gènes enrichis par l'IP. Pour cela, l'intensité du signal pour chaque spot subit une étape de normalisation par Lowess (Locally weighted scatterplot smoothing).

La normalisation intra-lame est un procédé qui permet de diminuer les biais techniques, systématiques et liés au hasard. Un script en R (<http://www.r-project.org/>) permet d'appliquer un algorithme, le lowess aux données, afin d'éliminer les biais linéaires et non linéaires liés à la saturation, au bruit de fond et à la taille variable des spots. Le lowess est une normalisation non linéaire qui utilise des courbes de régression par fenêtre glissante pour mettre les valeurs à la même échelle. Cette normalisation est appliquée avec le profil médian (médiane par ligne). La normalisation permet ainsi de centrer la distribution des valeurs autour d'un même point pour toutes les puces. Ces valeurs sont ensuite exprimées en logarithme de base 2 ou 10 et visualisables sous la forme d'un nuage de points représentant les signaux IP en fonction des signaux Input. Enfin, il s'agit de faire l'annotation fonctionnelle des gènes reconnus comme enrichis.

X : Etude transcriptomique par hybridation sur puces à ADN

A : Principe de la méthode

Les puces à ADN permettent d'étudier le transcriptome cellulaire en hybridant des ARN ou des ADNc issues de tissus ou de lignées en culture sur une lame contenant des dizaines de milliers de sondes couvrant l'intégralité du génome (figure M3). L'analyse du transcriptome met en évidence les modifications transcriptionnelles entrant en jeu dans différentes conditions, cela nous renseigne sur

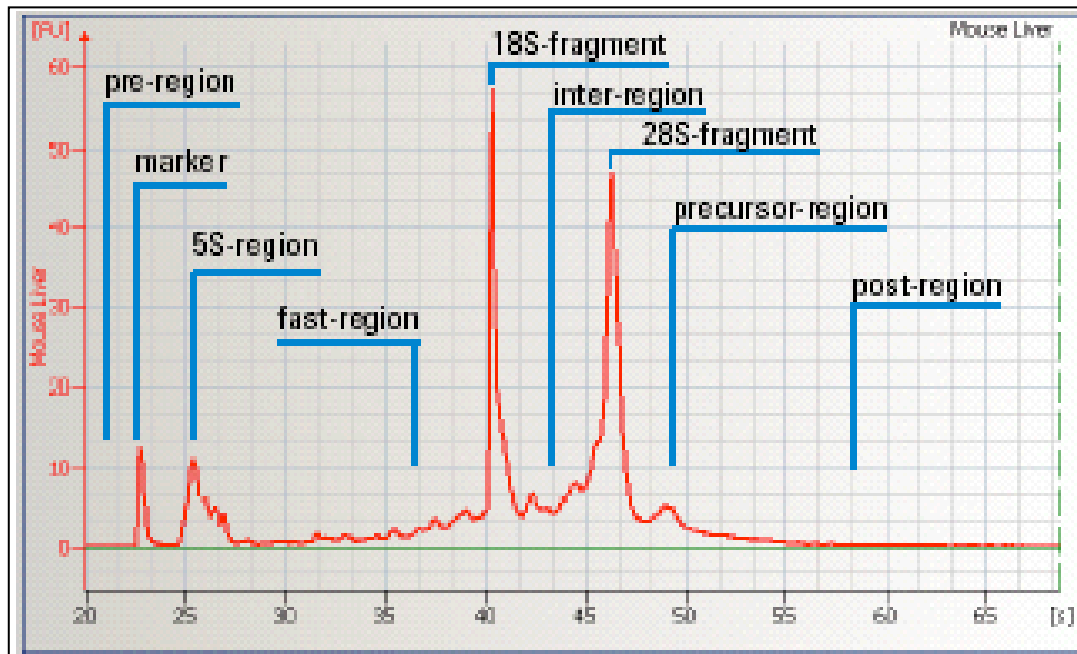


Figure M4 : Zones utilisées dans le calcul du RIN.

les différentes fonctions cellulaires impliquées. Dans notre cas, l'étude va porter sur l'impact d'une transfection de 48h de cellules XTC.UC1 en présence de l'anti-miR-494.

B : Protocole

B.1 Contrôle de la qualité des ARN_{tot} par Bioanalyzer 2100

Le Bioanalyseur Agilent 2100 permet l'analyse de la migration en simultanée de 12 échantillons de très faible volume d'échantillon (1 μ l). L'électrophorèse est réalisée par le biais de puces RNA 6000 Pico (Agilent) renfermant un gel de polyacrylamide contenant un fluorophore. Les fragments sont marqués puis séparés selon leur taille, grâce au réseau de capillaires présents dans la puce, et leur fluorescence est mesurée dans l'appareil. Le protocole détaillé est décrit sur le site de la plateforme (annexe 2). L'apport majeur du logiciel 2100 Expert est le calcul automatique d'un critère de qualité appelé RNA Integrity Number (RIN). Ce calcul intègre l'ensemble du profil et pas uniquement le ratio des pics ribosomiaux (figure M4). Sa valeur, comprise entre 1 et 10, est un critère objectif du niveau de qualité des ARN. Un RIN supérieur à 8 est recherché avant de procéder au marquage et à l'hybridation sur puces.

B.2 Marquage des ARN_{tot} et des spikes

Le marquage et l'amplification des échantillons sont réalisés grâce au kit *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification kit* (Agilent) en suivant le protocole décrit par la plateforme et suivant le protocole du fournisseur « *Two-color microarray-based gene expression analysis* » (annexe 3).

B.2.1 Préparation des spikes

Les tubes contenant les spikes sont vortexés puis chauffés à 37°C pendant 5 minutes. Trois dilutions successives sont réalisées dans le tampon fourni et dont la valeur dépend de la quantité d'ARN de départ.

ARN _{tot} (ng)	ARN PolyA (ng)	1 ^{ère} dilution	2 ^{nde} dilution	3 ^{ème} dilution	Volume spike de départ (µl)
50-200	/	1/20	1/40 de la 1 ^{ère} dilution	1/16 de la 2 ^{nde} dilution	2
201-2000	/	1/20	1/40 de la 1 ^{ère} dilution	1/4 de la 2 ^{nde} dilution	2
>2000	200	1/20	1/40 de la 1 ^{ère} dilution	0	2

B.2.2 Synthèse de l'ADNc simple brin

Les différents produits du kit, hormis l'enzyme, sont mis à décongeler sur glace. Le *5X First Strand Buffer* est mis à chauffer à 80°C pendant 3 à 4 minutes pour une resuspension complète puis l'ensemble des produits décongelés sont vortexés et centrifugés.

Dans un tube 0,5 ml, on prépare le mix contenant, pour une réaction, 8,3 µl d'ARNp (entre 50 et 500 ng), 2 µl de spike dilué et 1,2 µl de *T7 Promoter Primer*. L'ensemble est mélangé et incubé à 65°C pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite placés sur la glace pendant 5 minutes.

Un nouveau mix est réalisé en vue de l'élongation. Dans celui-ci, on dépose pour chaque réaction, 4 µl de *5X First Strand Buffer*, 2 µl de DTT 0,1 M et 1 µl de dNTP. Le mix est vortexé puis centrifugé et 7 µl sont déposés dans chacun des tubes précédents. Enfin on ajoute les deux enzymes, à savoir, par tube, 0,5 µl de RNase OUT et 1 µl de MMLV-RT. Le contenu de chaque tube est mélangé délicatement à la pipette, puis les tubes sont placés à incuber 2 heures à 40°C. Ils sont ensuite placés à incuber 15 minutes à 65°C avant d'être replacés sur glace.

B.2.3 Synthèse de L'ARNc fluorescent

Le PEG (Polyéthylène glycol) est chauffé à 40°C pendant une minute puis conservé à température ambiante. Selon le marquage souhaité, 2,4 µl de Cyanine3-CTP (10 mM) ou de Cyanine5-CTP (10 mM) sont ajoutés à chaque tube. Un master mix de transcription est alors préparé, avec pour chaque réaction, 15,3 µl d'*H₂O RNase free*, 20 µl de *4X transcription Buffer*, 6 µl de *DTT 0,1 M*, 8 µl de *NTP Mix* et 6,4 µl de PEG 50%. Le master mix est vortexé et centrifugé puis 55.7 µl est déposé dans chaque tube. On ajoute ensuite les enzymes dans chaque tube, à savoir, 0,5 µl de *RNase OUT*, 0,6 µl d'*Inorganic Phosphatase* et 0,8 µl de *T7 RNA Polymerase*. Le contenu de chaque tube est délicatement mélangé à la pipette avant que les tubes ne soient placés à incuber 2 heures à 40°C. A la fin de l'incubation les tubes sont placés sur glace.

B.2.4 Purification des ARNc marqués

Les ARNc marqués sont purifiés à l'aide du kit *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen). A chaque échantillon, on ajoute 20 µl d'*H₂O RNase free* pour ajuster le volume à 100 µl, puis 350 µl de tampon RLT et 250 µl d'éthanol 96%. Les 700 µl ainsi obtenus sont mélangés et directement transférés sur colonne RNeasy mini (Qiagen). Les colonnes sont mises à centrifuger 30 secondes à 13000 rpm. L'éluat est éliminé et le tube de collecte changé. La colonne est alors lavée deux fois avec 500 µl de tampon RPE avec une centrifugation de 13000 rpm pendant 30 à 60 secondes après chaque lavage. La colonne est ensuite placée sur un tube d'élution, on dépose 30 µl d'*H₂O stérile* au centre de la colonne et suite à une incubation à température d'une minute, l'ensemble est placé à centrifuger pendant 30 secondes à 13000rpm. Cette étape d'élution est répétée une seconde fois pour récupérer un maximum d'ARNc marqué.

Une fois l'amplification et le marquage réalisé, il faut calculer l'activité spécifique. Pour cela, on dose cette activité au nanodrop ND-1000 avec le module d'analyse « *microarray RNA 40* ». L'activité spécifique est alors calculée en divisant l'activité d'un échantillon (en pmol/µl) par sa concentration

(en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), nous donnant ainsi l'activité de l'ARN exprimée en $\text{pmol}/\mu\text{g}$. Afin d'optimiser l'hybridation sur puces ADN, la concentration recherchée en ARNc doit être supérieure à 825 ng et l'activité spécifique supérieure à 8 $\text{pmol}/\mu\text{g}$.

B.3 Hybridation des ARNc marqués sur puce d'expression 4*44k

B.3.1 Préparation du 10X Blocking Agent

Le *10X Blocking Agent* est fourni sous forme de lyophilisat, il est donc solubilisé par addition de 500 μl d'eau stérile et dépourvue de nucléase. Le tube est alors vortexé puis centrifugé une dizaine de secondes. Une fois solubilisé, il peut être conservé à -20°C pendant deux mois.

B.3.2 Préparation des échantillons à hybrider

Le bain marie est allumé à l'avance avec une température stable de 60°C . Pour chaque puce, un tube de 1,5 ml est préparé avec les composants suivants : 825 ng d'ARNc marqué en Cyanine 3, 825 ng d'ARNc marqué en Cyanine 5, 6 μl de *10X Blocking Agent*, de l'eau stérile qsp 28.8 μl et 1,2 μl de tampon de fragmentation 25X pour un volume final de 30 μl . Les tubes sont mis à incuber à 60°C pendant 30 minutes afin de fragmenter les ARNc. Afin de stopper la réaction et de préparer l'hybridation, 30 μl de *2x GEX Hybridization Buffer HI-RPM* sont ajoutés dans chaque tube. L'ensemble est mélangé délicatement à l'aide d'une pipette et en évitant la formation de bulles d'air. Une centrifugation d'une minute à température ambiante et 13000 rpm est alors réalisée puis le contenu de chaque tube est rapidement déposé sur la puce. Les puces sont alors placées dans des chambres d'hybridation, elles-mêmes placées dans un four à hybridation en rotation (20 rpm) à 65°C pendant 17 heures minimum.

B.3.3 Lavages des puces

Afin de prévenir l'oxydation et la perte de signal, les puces sont lavées avec une solution de stabilisation et de séchage (*Stabilization and Drying Solution*, Agilent).

B.3.3.1 Stabilization and Drying Solution

La bouteille de cette solution est placée dans un bain marie à 40°C afin de dissoudre les éventuels agrégats liés à une précipitation à température ambiante de ses composants. La bouteille est donc sortie peu de temps avant les lavages afin d'équilibrer sa température à celle ambiante.

B.3.3.2 lavages

L'hybridation achevée, la lame est lavée par passages successifs dans 5 bains comme présenté dans le chapitre VIII.C.7 : Hybridation sur lames Agilent.

B.3.4 Lecture des lames

Les lames sont ensuite lues par le Scanner Agilent® G2565BA et les données sont extraites grâce au logiciel Feature Extraction v10.7(Agilent). Pour cela les lames sont placées dans un support adapté avant d'être inséré dans le carrousel du scanner. Les différents paramètres sont vérifiés ou modifiés au besoin, en s'assurant tout d'abord d'une lecture à une résolution de 5 µm. L'appareil nommera les lames en fonction de son numéro de série et du code barre de la lame lue. Une fois l'icône « *scanner ready* » apparue, le run peut être lancé en cliquant sur l'icône « *Scan slot m-n* » où m correspond à la lame de départ et le n à celle de fin.

B.3.5 Extraction des données

Les données issues de l'hybridation sur puces Agilent sont extraites grâce au logiciel Feature Extraction v10.7 (Agilent). Pour cela, le fichier .tif issu du scanner est chargé dans le logiciel grâce à l'onglet « *Add New extraction set* ». Ensuite les différents paramètres sont entrés et en particulier la grille de lecture utilisée qui varie selon le type de lames. L'extraction est ensuite lancée (onglet « *Start Extracting* »), un fichier de données est alors généré tout comme un fichier nommé *QC report*, offrant un résumé de l'extraction. Les données pourront alors être analysées par la plateforme de bio-informatique.

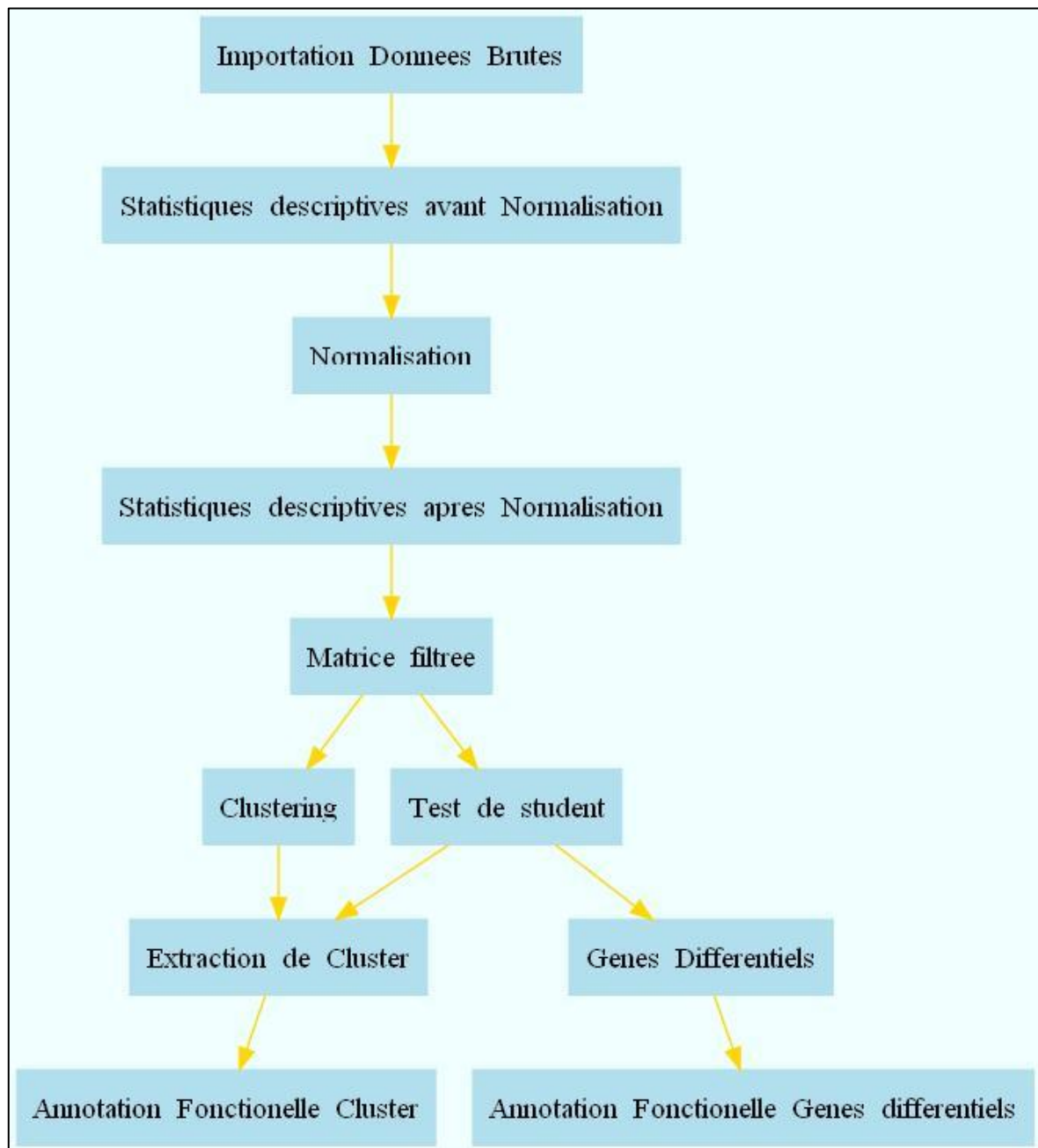


Figure M5 : résumé des étapes permettant l'analyse statistique de puces à ADN.

B.3.6 Analyse statistique

Les différentes étapes de l'analyse sont résumées sur la figure M5. L'analyse est réalisée à l'aide d'un script établi par la plateforme afin de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés. Pour cela, l'intensité du signal pour chaque spot subit une étape de normalisation par Lowess (Locally weighted scatterplot smoothing).

Avant normalisation, le profil médian de chaque sonde pour tous les échantillons est calculé sous excell puis un test statistique (test de Pearson) permet d'obtenir le coefficient de corrélation entre les valeurs de fluorescence de chaque échantillon et les valeurs de fluorescence du profil médian. De manière générale la corrélation varie entre -1(anti corrélé) et 1 (corrélé). Si elle est égale à 0 il n'y a pas de corrélation. Nous considérons qu'une corrélation ≥ 0.8 est une bonne corrélation.

Un script en langage R permet d'appliquer l'algorithme Lowess aux données afin d'éliminer au maximum ces biais liés à la saturation, au bruit de fond et à la taille variable des spots. Cette normalisation est appliquée avec le profil médian (médiane par ligne).

Afin de vérifier l'efficacité du lowess, nous recalculons les profils médians et les coefficients de corrélation, ainsi que les plus petites et plus grandes valeurs pour chaque échantillon. Les sondes de faibles intensités sont filtrées suivant un seuil arbitraire équivalent à la moyenne de la médiane des échantillons.

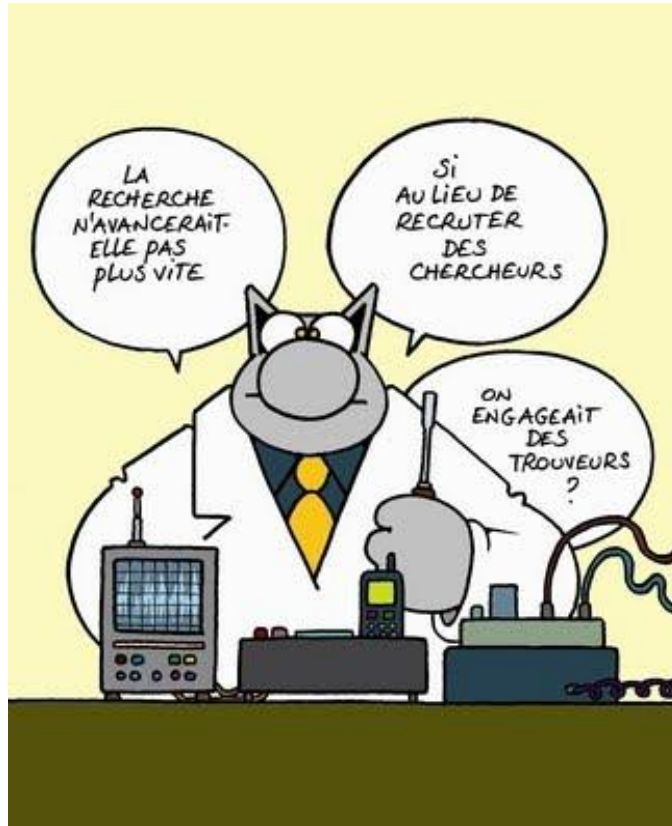
Le clustering hiérarchique permet de visualiser la classification des échantillons et déterminer des clusters d'expression différentielle. La matrice est représentée par les sondes en lignes et les échantillons en colonne. Une couleur rouge montre une surexpression de l'échantillon et une couleur verte une sous expression.

L'annotation fonctionnelle consiste à détecter dans un groupe de gènes variant ensemble un enrichissement dans une ou des fonctions biologiques. Cet enrichissement se fait par rapport à l'intégralité des gènes présents sur la puce impliqués dans cette fonction. Pour ce faire, l'équipe utilise la base de données Gene Ontology (GO) et le logiciel Gominer. Le choix des annotations intéressantes est basé sur 3 paramètres : une valeur de Fold Change supérieure ou égale à 3, un enrichissement supérieur à 1,5 et une pvalue inférieure à 0,001.

L'étude des gènes différentiellement exprimés se fait par comparaison des moyennes de deux classes différentes par un test de Student. Les gènes sont considérés comme différentiels si leur pvalue est inférieure au seuil choisit (lâche : 0,001 ; stricte : 0,0001). Les gènes identifiés comme différentiels sont ensuite associés à une fonction.

XI : Statistiques

Les valeurs statistiques sont données sous la forme de la moyenne \pm l'écart-type. Les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Softwares ; La Jolla, Californie, Etats-Unis). Le test statistique utilisé est le test de Mann-withney. Les données sont considérées comme significativement différentes d'un groupe à l'autre à partir de $P < 0,05$.



Résultats

Article 1: PGC-1-related coactivator and miRNAs mediate mitochondrial biogenesis in thyroid cancer.

Les mitochondries jouent un rôle central dans la cellule par leur implication dans l'homéostasie énergétique, le métabolisme, la signalisation cellulaire ou encore l'apoptose. Afin de répondre de façon adaptée aux demandes spécifiques de chaque type cellulaire, la morphologie, le nombre et les fonctions des mitochondries sont étroitement régulés par l'expression coordonnée des génomes mitochondriaux et nucléaires. Cette coordination est très importante pour la régulation de la fonction énergétique. En effet, les complexes de la chaîne respiratoire sont composés d'une majorité de protéines codées par l'ADN nucléaire mais surtout de 13 protéines essentielles issues de l'expression du génome mitochondrial. La coordination de ces deux génomes est assurée par trois niveaux de régulation. Premièrement par des facteurs de transcription nucléaires, tels que NRF-1, NRF-2, YY1, CREB ou ERR α , permettant l'expression de protéines à destinée mitochondriale. Ensuite, les facteurs de transcription TFAM et TFBM sont codés par l'ADN nucléaire et adressés à la mitochondrie pour permettre l'expression de son génome. L'adaptation aux stimuli environnementaux est permise par l'action de coactivateurs transcriptionnels nucléaires de la famille PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β et PRC). Là où l'expression de PGC-1 α est fortement induite dans des tissus présentant une demande énergétique importante, l'expression de PRC est ubiquitaire et induite par des signaux mitogènes.

Dans l'équipe, des études antérieures ont permis de révéler que PRC était le seul coactivateur à être surexprimé dans les tumeurs oncocytaires thyroïdiennes, caractérisées par une abondance en mitochondries fonctionnelles (Savagner *et al.*, 2003 ; Baris *et al.*, 2004 ; Raharijaona *et al.*, 2009 ; Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Plusieurs études sur les facteurs de transcription ont révélé

l'existence d'un important rétrocontrôle régulant la biogénèse et les fonctions mitochondriales (Scarpulla *et al.*, 2012). Au niveau post-transcriptionnel, les miARNs assurent la régulation des mécanismes de transduction du signal, le métabolisme, la réponse au stress et la mort cellulaire (Croce, 2008). Nous avons montré que certains miARNs étaient directement impliqués dans la régulation de l'expression de PGC-1 α et de protéines mitochondriales (Jacques *et al.*, 2013). L'expression des miARNs peut-être régulée par des récepteurs nucléaires suivant trois voies, la liaison directe sur la région promotrice du miARN, la régulation indirecte au travers de l'expression des cibles des récepteurs nucléaires, et par la régulation de la machinerie protéique assurant l'expression des miARNs (Yang et Wang, 2011).

Pour ce travail, nous avons cherché à explorer la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du réseau d'expression PRC-dépendant. Pour cela, nous avons utilisé une approche de génomique intégrative combinant des données issues des technologies de ChIP-chip et de puces à ADN. En se concentrant sur les mécanismes de phosphorylation oxydative, nous avons pu étudier les miARNs directement impliqués dans les boucles de régulation PRC-dépendantes. Nous avons mis en évidence une interaction directe de PRC avec le promoteur de plusieurs miARNs. Les douze miARNs directement régulés par PRC contrôlent les voies de signalisation intracellulaires et la fonction oxydative au niveau post-transcriptionnel. La régulation par PRC semble être centrale dans l'adaptation de la biogénèse mitochondriale et la production énergétique à la prolifération cellulaire, particulièrement au travers la voie des MAPKines dans laquelle ces miARNs sont impliqués. La voie des MAPK PRC-dépendante que nous avons montrée étroitement liée à la réponse aux variations du statut redox de la cellule était-elle dépendante de la protéine Ask1 (Raharijaona *et al.*, 2009). Cinq des douze miARNs sont spécifiquement impliqués dans la régulation de la production énergétique mitochondriale. L'inhibition de ces miARNs conduit à une altération des fonctions mitochondriales induisant un rétrocontrôle négatif de ces derniers.

Plus particulièrement, nous avons montré que miR-218 avait des effets opposés sur l'expression de PRC (répression) et PGC-1 α (induction), ce qui implique une régulation du ratio PRC/PGC-1 α . Cet impact peut être rapproché de nos précédents résultats sur la régulation des effets du ratio PRC/PGC-1 α sur l'équilibre du métabolisme oxydatif/glycolytique (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Ce miARN clairement associé à des mitochondries abondantes et fonctionnelles, peut constituer un bon marqueur pour les tumeurs présentant un grand nombre de mitochondries. Ainsi, d'autres recherches sur le rôle combiné de miR-218 et de PRC, dans le contrôle de la prolifération cellulaire, peuvent amener à de nouvelles perspectives dans la thérapie anticancéreuse.

PGC-1-related coactivator and miRNAs mediate mitochondrial biogenesis in thyroid cancer

Solenne Carat*^{1,2}, Romain Rivalin*^{3,4,5}, Delphine Guillotin^{3,4}, Daniel Baron*^{1,2}, Soazig Le Pennec^{3,4}, Landry Raihauti^{3,4}, Audrey Donnart^{1,2}, Rémi Houlgatte*^{1,2}, Frédérique Savagner*^{1,3,4,5,6}

* equally contributors

¹ INSERM, UMR915, Bâtiment IRT-UN, Nantes, F-44000, France

² Université de Nantes, Nantes, F-44000, France

³ INSERM, UMR694, Bâtiment IRIS, CHU, 4 rue Larrey, Angers, F-49033, France

⁴ Université d'Angers, Angers, F-49033, France

⁵EA 3143, Université d'Angers, F-49033, France

⁶ CHU Angers, Laboratoire de Biochimie, Angers, F-49033, France

Corresponding author:

Dr Frédérique Savagner, PharmD, PhD, Université d'Angers, 49033 Angers, France

Tel: +33 241 35 33 14

Fax: +33 241 35 40 17

E-mail: frederique.savagner@univ-angers.fr

Key words: PGC-1 related coactivator/miRNA/ oxidative phosphorylation/Feedback loop

Running title: PRC and miRNAs mediate OXPHOS process

Word counts: 5,218

Tables: 1; **Figures:** 5 ; **Supplementary Figure:** 1; **Supplementary Tables:** 2

Abstract

The PGC-1 family of transcriptional coactivators (PGC-1 α , PGC-1 β , and PRC) plays a central role in the integration of mitochondrial energy production into cellular metabolic pathways. However, the expression of these coactivators may be modulated by post-transcriptional modifications during which microRNAs (miRNAs) could interfere with the bioenergetics transcriptional pathway, especially in cancer cells undergoing a metabolic shift. To investigate this possibility, we used PRC siRNA and genome-wide cDNA and miRNA microarrays to analyze the PRC-related pathway in a cellular model of a mitochondrial-rich thyroid tumor. Using chromatin immunoprecipitation techniques, we confirmed the direct interaction of the PRC-related transcriptional complex with specific miRNA promoters. This study showed that PRC directly targeted 12 miRNAs, five of which were involved in the control of the OXPHOS process and mitochondrial biogenesis. In particular, miR-218 appeared to exert a control loop on the PRC/PGC-1 α ratio. We investigated the link between miR-218-controlled genes and the impairment of mitochondrial biogenesis by quantitative measurements of mRNA targets as well as by functional analyses in miR-218 knock-in or knock-down cellular models. The expression of miR-218 was also studied in 2 other thyroid cell lines, 40 thyroid tumors and normal tissues in relation to the expression levels of PRC and PGC-1 α . Our findings demonstrate that PRC and several miRNAs contribute to the fine regulation of the OXPHOS process.

Introduction

Metabolic adaptation involves regulation of energy homeostasis at the transcriptional and post-transcriptional levels through diverse transcription factors, coregulators and feedback control loops (Hock & Kralli 2009). Oxidative phosphorylation (OXPHOS) is central to the maintenance of energy homeostasis by coupling respiratory chain activity to ATP synthesis. It is the only cellular process under dual nuclear and mitochondrial genetic control in mammals. Thirteen essential structural subunits involved in OXPHOS are directly encoded by mitochondrial DNA whereas the other subunits are nuclear-encoded and imported into the mitochondria. Transcriptional coactivators such as the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC-1 α) and the related PGC-1 family members, i.e. PGC-1 β and PRC (PGC-1 related coactivator), interact with several transcription factors regulating the expression of OXPHOS-related genes (Wu *et al.* 1999; Jones *et al.* 2012). Whereas PGC-1 α and PGC-1 β are mainly expressed in tissues with high energy demands and induced by environmental stresses, PRC is ubiquitous and its expression is related to phases of the cell cycle (Andersson & Scarpulla 2001).

The functional properties of mitochondria in cells preferentially expressing PGC-1 α , PGC-1 β and PRC differ in terms of OXPHOS efficiency and oxidative stress defenses, suggesting that these coactivators induce similar but not identical programs (Raharijaona *et al.* 2009; St-Pierre *et al.* 2003). The differential effects may be due to selective preferences in DNA-binding transcription factors, in their interaction with the general transcriptional machinery and in their expression level. Knock-down studies demonstrated that the three coactivators of the PGC-1 family compensate each other (Lai *et al.* 2008; Uldry *et al.* 2006). PGC-1 α and PGC-1 β are essential for the developmental program that drives increased levels of mitochondrial biogenesis in tissues with extensive energy demands; in contrast, PRC ensures the basal level of mitochondrial biogenesis using non-redundant pathways as recently described in PRC-deficient mice (He *et al.* 2012). Thus, the over-expression of PRC induces OXPHOS genes whereas the knock-down of PRC decreases cytochrome oxidase activity alone

(Vercauteren *et al.* 2008). However, PRC may intervene in the fine regulation of mitochondrial biogenesis when PGC-1 α and PGC-1 β are under-expressed (Raharijaona *et al.* 2009; Vercauteren *et al.* 2009).

Several studies of transcription factors have revealed the extensive feed-forward and feedback loops controlling mitochondrial biogenesis and function (Puigserver *et al.* 1998; Scarpulla 2008; Villena *et al.* 2008; Scarpulla *et al.* 2012). The increased expression of a given transcriptional regulator often influences the expression of the other regulators either positively or negatively, complicating the analysis of the regulatory loops (Charest-Marcotte *et al.* 2010; Powelka *et al.* 2006; Vercauteren *et al.* 2006; Vercauteren *et al.* 2008). Through post-transcriptional effects, microRNAs (miRNAs) mediate the feedback regulation of such fundamental mechanisms as carcinogenesis, metabolism, response to stress, and cell death (Croce 2008). Thus, some miRNAs have been shown to be directly involved in the regulation of PGC-1 α expression and, more recently, in the direct regulation of mitochondrial-encoded proteins (Aoi *et al.* 2010; Bandiera *et al.* 2011; Yamamoto *et al.* 2012; Jacques *et al.* 2013). Since miRNAs are encoded by genes that are mainly transcribed by RNA polymerase II, the transcription may be regulated by a variety of transcription factors (Lee & Dutta 2009). The precise mechanism underlying the modulation of essential cellular functions remains to be elucidated. Nuclear receptors appear to regulate miRNA expression *via* three pathways, i.e. by direct binding to the promoter region of miRNA, by indirect regulation of miRNA expression through nuclear receptor target genes, and by the regulation of the miRNA biogenetic machinery (Yang & Wang 2011).

We have used a cellular model of oncocytic thyroid tumors in which mitochondrial biogenesis is almost exclusively PRC-dependent (Raharijaona *et al.* 2009; Savagner *et al.* 2003). We have applied an integrative genomic approach using CHIP-chip and microarray technology to investigate the transcriptional and post-transcriptional regulation of the PRC-dependent network. Focusing on the OXPHOS process, we study the miRNAs more specifically involved in the PRC-dependent regulatory loop.

Material and methods

Cell line, treatments and thyroid tissues

The human XTC.UC1 cell line was established from an oncocytic cell thyroid carcinoma (Baris *et al.* 2004). FTC133 and RO82W1 cells originated from other follicular cell-derived thyroid carcinoma presenting differences in the expression levels of PRC and PGC-1 α and the metabolic orientation (Mirebeau-Prunier *et al.* 2010). The growth medium consisted of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Germany), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL fungizone, completed with 10 mU/mL thyrotropin (TSH) for XTC.UC1 cells (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Except for the TSH and the foetal calf serum, all products were obtained from Gibco BRL (Life Technologies, Paisley, United Kingdom).

The expression of PRC in XTC.UC1 cells was knocked down using the predesigned PRC siRNA (#121729 from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); the knock-down was tested by comparison with a random negative control siRNA (scramble, #4635). This PRC siRNA, relative to two other siRNA tested, was considered relevant for at least 70% knock-down of PRC mRNA and protein expression, as previously specified after 48h of treatment (Raharijaona *et al.* 2009) and reported in Supplementary Figure 1.

Five miRNAs were knocked down in the XTC.UC1 cells using the predesigned anti-miR-218, miR-30a, miR-424, miR-15b and miR-125a (from Life technologies, Grand Island, NY, USA); the knock-down was tested by comparison with an miRNA inhibitor negative control (AM 17010). miRNA-218 was also overexpressed in these cells using the premiR miR-218 precursor (4464066 from Life technologies) and tested by comparison with prémiR negative control (AM 17110). Cells were transfected with 30 nM of anti-miR, premiR miRNA-218 or controls using SiPort neoFX reagent as recommended (AM4510). Anti-miR-218 and premiR miR-218 actions were considered relevant when

the expression of a direct validated mRNA target, such as ATP5B, was enhanced or repressed at least 2-fold at 48h post-transfection. Each anti-miR treatment was tested in triplicate on independent cell cultures.

Forty normal and tumoral thyroid tissues were quantified for mRNA and miRNA according to the latest WHO classification in 2004. These corresponded to 10 follicular adenomas (FTA), 10 oncocytic variants of follicular adenomas (OTA), 10 classic papillary thyroid carcinomas (PTC), and 10 normal thyroid tissues. Written informed consent was collected from the patients involved in the study. The project was approved by the ethical committee of the Angers University Hospital, France. Tissue samples were rendered anonymous before beginning the study.

mRNA and miRNA profiling

mRNA and miRNA were obtained from the Trizol-extracted fractions of PRC siRNA and scramble XTC.UC1 cells after 48h of serum induction. mRNA microarray analysis was based on 20,000 cDNA microarray slides prepared at the Transcriptome Core Facility of the University of Nantes. The Dataset was available on the Gene Expression Omnibus database (GEO) as previously referenced (GSE 14282, (Raharijaona *et al.* 2009)). The miRNA microarrays, manufactured by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), contained probes for 866 human and 59 human viral miRNAs. Labeling and hybridization of RNA samples were performed according to the manufacturer's protocols. Two biological replicates, each divided into three technical replicates, were tested for each condition (PRC SiRNA and scramble) and hybridized on array. GeneSpring GX 7.3.1 software (Agilent Technologies) was used to analyze miRNA microarray results referred as GSE 33843. The Agilent algorithms estimated a single intensity measure for each miRNA, referred to as the total gene signal (TGS) estimated by multiplying the total probe signal by the number of probes per gene. To compare two hybridizations, the natural logarithms of the total gene signals for all genes expressing above 10 times the background noise in both samples were regressed against each other and the standard deviation of the residuals from the regression line were noted as the root mean square deviation. Gene Ontology

analyses were performed for target genes of relevant miRNAs using the Dianapath software (Papadopoulos *et al.* 2009). Putative mRNAs targeted by differential miRNAs were analyzed by the Targetscan 5.2 software and miRNA target sites were considered highly conserved for a context score > -0.20 (Grimson *et al.* 2007).

PRC ChIP assay and ChIP-chip analyses

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on 10^6 XTC.UC1 cells/assay after 48h of 10% serum induction following the protocol provided by the manufacturer (EZ-ChIP, Upstate, Millipore, Billerica, MA, USA) after cell cross linking by 1% formaldehyde and sonication. Rabbit anti-goat IgG was used as a non-specific IP control (Cat# 55335 from MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Polyclonal antibody against PRC was produced (Eurogentec, Seraing, Belgium) against a human peptide (1520-1534) previously selected and validated on previous western blot analyses (Raharijaona *et al.* 2009). ChIP assays were tested in duplicate on two independent XTC.UC1 cell cultures at 70% of confluence. For PCR analysis prior to amplicon generation, QIAquick-purified immunoprecipitates were dissolved in 50 μ l of water. Quantitative PCR reactions on 6 μ l of suitable dilutions from the immunoprecipitated and the input DNA were performed using primers designed for genes known to be targeted by the PRC-transcription factor complex (Vercauteren *et al.* 2009). ChIP was considered positive for at least a 3-fold enrichment of gene expression from the IgG fraction.

To obtain enough ChIP DNA for application to genomic microarrays, PRC-immuno precipitated and input DNAs were amplified twice using the Sigma GenomePlex WGA2 kit (SigmaAldrich, Saint Louis, MA, USA) and applied to the Agilent Human Promoter ChIP-on-chip 244K array, containing ~17,000 60-mer probes per array (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The DNA samples for ChIP-chip analysis were labeled following the procedures described on the Transcriptome Core Facility of Nantes (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/>). The arrays were scanned at a resolution of 5- μ m on a G2505C scanner (Agilent Technologies), and the signal intensities from the IP and the input fractions were compared after normalization.

Probes on ChIP-promoter arrays were considered positive when signal intensities were significantly higher in the IP sample than in the control input sample. The selection of such positive probes was performed using an *ad hoc* statistical test adapted to non-tiling chips. Each probe was associated with a pair (x,y) of normalized log-transformed intensities, where x corresponded to the input and y to the IP sample. A threshold spline curve was then defined considering only the probes below this axis. The symmetrical image of this curve above the axis allowed the selection of positive probes. It also allowed the definition of p-values by using normalized distances between probes and the central axis. Considering replicates for each transcription factor, the final positive probes were selected using the two distinct p-values, $pVal1$ and $pVal2$, according to the criterion: $\sqrt{pVal1 \times pVal2} < 10^{-3}$ with $pVal1 < 10^{-2}$ and $pVal2 < 10^{-2}$

Quantitative mRNA and miRNA analyses

Total RNA was obtained from Trizol-extracted fractions of treated XTC.UC1 cells and thyroid tissues. RNA integrity was determined using a Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). For mRNA, reverse transcription was performed on 1 µg of RNA with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Real-time quantification was performed on a 96-well plate using the IQ SYBR Green Supermix and Chromo4 (Biorad, Hercules, CA, USA). Six genes were tested for quantitative expression: PRC/PPRC1, PGC-1 α /PPARGCA1, ERR α /ESRRA, CYCS, ATP5B and NRF-1. Data were normalized to β -globin. The sequences of primers used in this study are shown in Table 1.

For miRNA analyses, cDNA was first produced using the VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Using Express SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen), real-time PCR was carried out on a Chromo4 apparatus (Biorad) using a universal primer and forward primers specific to each miRNA according to the NCode miRNA Database (Table 1). For each sample, two independent reverse transcription reactions

were performed, and each reaction was assayed in duplicate by real-time PCR. miRNA levels were normalized with miR-26b, which we established as the most stably expressed reference gene concordantly with another study (Chang *et al.* 2010). Relative levels were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. The relative expression level of specific miRNA was represented by $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Western blot analyses

Cells were rinsed in NaCl/P_i, trypsinized and collected in centrifuge tubes. Proteins (20 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes (Hybond-P, Amersham International plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) by electroblotting. The membranes were incubated with dilutions of the following monoclonal antibodies: anti- α -tubulin (Abcam, Cambridge, UK), anti-complex-IV, subunit 2 (COX2, MS405, Mitosciences, Eugene, OR, USA) and anti-PGC-1 α (Ab77210, Abcam) overnight. Membranes were revealed and proteins were quantified as previously described (Mirebeau-Prunier *et al.* 2013)

Mitochondrial quantification and cell proliferation assay

To measure the mitochondrial content, XTC.UC1 cells were exposed at 37°C for 20 minutes to 5 µg/mL JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine from EMD, San Diego, CA, USA) and analyzed on an FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Cultured cells, untreated with dyes, were used as a negative control to determine the FACS gating. JC-1 emits red fluorescence (aggregates) when sequestered in the mitochondrial membrane of healthy cells and emits green fluorescence (monomers) when released into the cytoplasmic compartment of the cell. The total fluorescence is representative of mitochondrial mass whereas the red/green ratio represents the modification of mitochondrial functionality (Kojima *et al.* 1998).

The proliferative status and viability of the XTC.UC1 cells was estimated using (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (MTT test, Sigma-Aldrich,

Saint Louis, MO, USA) following the protocol recommended by the manufacturer. The MTT results were confirmed by cell counts using the Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Mitochondrial oxygen consumption analyses

XTC.UC1 cells were seeded in Seahorse XF-24 plates (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Five anti-miRNAs were tested against miR-125a, 218, 15b, 30a and 424 compared to a scrambled antimiR. After 48 h of treatment, the cells were changed to unbuffered DMEM (DMEM base medium supplemented with 17.5 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 31 mM NaCl, 2 mM Glutamine, pH 7.4) and incubated at 37 °C in a non-CO₂ incubator for 1 h. Three baseline measurements of oxygen consumption rate were collected on the XF 24 Seahorse apparatus using the XF cell Mito Stress kit (#101706 from Seahorse Bioscience). After Seahorse analysis, cells in the wells were lysed and the protein concentrations were measured using a protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The oxygen consumption of each well was normalized to the total protein amount (pmol/min/μg).

Statistical analyses

Data are represented as mean values \pm standard deviation (SD), with *N* representing the number of experiments. The statistical significance of the variations observed was assessed using the Mann-Whitney test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using StatView 5.0 (SAS Institute, Gary, NC, USA).

Results

PRC directly regulates the expression of 12 miRNAs

The expression profile of miRNA of XTC.UC1 cells treated with PRC siRNA was compared with that of scramble-treated cells. Among the 866 miRNAs detected, 69 were differentially expressed, 41 were down-regulated, and 28 were up-regulated (Fig. 1A). These results may represent the direct and indirect regulation of miRNA gene expression by PRC. To determine which miRNAs are directly targeted by the transcriptional complex involving PRC, we analyzed genes for promoter enrichment after PRC immunoprecipitation on XTC.UC1 DNA samples, using promoter arrays containing 15,000 gene promoters, including 116 miRNAs. Among the 69 differentially expressed miRNAs in the miRNA-array data, 56 were present in the promoter array. We consider that this high representation of differentially expressed miRNAs (81%) on the promoter array is sufficient to identify the relevant miRNA promoters to which PRC will be attached. We found that 1,249 genes were positive on promoter array after PRC enrichment ($p < 10^{-3}$, Supplementary Table 1), including 12 miRNAs representing those directly regulated by PRC (12 miRNA promoters among 56 miRNAs of the array were enriched with PRC immunoprecipitation). However, identifying PRC-targeted miRNA promoters was not informative for positive or negative expression regulation. Significant differential expression for 9 of the 12 miRNAs was validated by quantitative RT-PCR analysis of three new samples of PRC siRNA and scramble-treated cells (Fig. 1B). Finally, removing PRC resulted in the decrease of the expression of 8 miRNAs (miR-424, miR-99a, miR-100, miR-15b, miR-21, miR-218, miR-30a and miR-365) and an increase in the expression of one (miR-125a-3p).

PRC cooperates with miRNAs in cancerous and metabolic control loops

We researched the molecular pathways subject to potential alteration by the expression of the 12 PRC-regulated miRNAs mentioned above. Using the DIANA-mirPath software (Papadopoulos *et al.* 2009), we studied the combinatorial effects of multiple miRNAs in modulating a given KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway. After logarithmic transformation of the *P*-value

for each pathway, we selected those with a $-\ln(P\text{-value}) > 3$ for at least 3 of the 12 miRNAs (Fig. 2A). We found that these miRNAs were mainly involved in cancerous and metabolic pathways. All of them were involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Three of the miRNAs, i.e. miR-218, miR-424 and miR-15b, were also involved in the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. The OXPHOS process specifically requires the expression of 5 miRNAs, i.e. miR-218, miR-15b, miR-424, miR-30a and miR-125a. Interestingly, four of them were down-regulated when PRC removal, referring to Fig. 1B.

To study the effects of the 5 OXPHOS-related miRNAs on the expression level of PRC-dependent genes (GSE 14282, (Raharijaona *et al.* 2009)), we analyzed the correspondence between the mRNA known to be targeted by these miRNAs, using Targetscan 5.2 software, and those mRNA differentially expressed when PRC siRNA treatment was used (Fig. 2B). All 5 miRNAs were involved in the positive regulation of 39% of the PRC-dependent genes and in the negative regulation of 35% of the PRC-dependent genes (see PRC-dependant genes for from GSE 14282 in Supplementary Table 2, $p < 0.03$). Interestingly, miR-218 was particularly associated with genes positively regulated by PRC, as indicated by the green portions of the miR-218 gene expression targets in Figure 2B, whereas the other miRNAs were equally associated with genes positively and negatively regulated by PRC. We identified two miRNAs specifically related to the control of this mitochondrial energy pathway, with miR-218 and miR-30a controlling 34% and 32% respectively of the 56 PRC-dependent genes involved in the OXPHOS process (Fig. 2C).

Five miRNAs regulate the OXPHOS process by modulating the expression of PRC and PGC-1 α

We investigated the impact of inhibition for the five miRNAs predicted to be involved in the OXPHOS process. The Mito Stress Test was performed to analyze the key parameters of mitochondrial function, basal respiration, ATP turnover, proton leak and maximal respiration. Mitochondrial respiration comprises nonphosphorylating respiration, i.e. the oligomycin-insensitive

fraction, recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin and the phosphorylating respiration, i.e. the oligomycin-sensitive fraction, calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration rate from the basal respiration rate which represents the fraction used for ATP synthesis.

All the five anti-miRNAs have an impact on the global oxygen consumption (i.e. the phosphorylating + the non-phosphorylating consumption) resulting to a significant increase in total oxygen consumption with the removal of miR-218, 424, 30a and 125a, and a significant decrease with the removal of miR-15b removal (Fig. 3A). The evaluation of the oligomycin-sensitive oxygen consumption rate showed that anti-miR 424, 30a and 218 used much more oxygen for ATP synthesis than did anti-miR-125a. Thus, miRNA removal was able to reduce the capability of the respiratory chain to synthesize ATP with an effective performance for three of the five miRNAs (miR-218, 424 and 30a) or enhance its capability for one of the five miRNAs (miR-15b). Interestingly, the removal of miR-218 specifically modified the oligomycin-sensitive oxygen consumption without changing the nonphosphorylating respiratory rate.

Regarding the expression levels of the two main transcriptional coactivators involved in the regulation of mitochondrial biogenesis and function, we observed that increased mitochondrial oxygen consumption was associated with the increased expression of one or both coactivators for three of the miRNAs (miR-218, 30a and 125a) whereas an inverse relationship was found with the removal of miR-424 (Fig. 3B). When the removal of miRNA led to decreased oxygen consumption (miR-15b), there was no change in the expression of PRC or PGC-1 α . The PRC/PGC-1 α ratio was unchanged for four of the five anti-miR used (0.99 ± 0.13 for anti-miR 15b, 424, 30a and 125a) and significantly reduced for one (0.26 for anti-miR 218). For miR-218, the corresponded to both an increased expression for PGC-1 α and a decreased expression for PRC with an intriguing effect on the PRC/PGC-1 α ratio operating as a negative feedback loop on PGC-1 α expression. Targetscan analysis

of the five miRNAs for PRC and PGC-1 α revealed that none of them was predicted to target PRC, while two, i.e. miR-218 and miR-30a, were predicted to target PGC-1 α . Thus, differences in the PRC/PGC-1 α ratio may represent differences in direct miRNA regulation of PGC-1 α for some miRNAs and indirect regulation of PRC for all miRNAs.

miR-218 regulates mitochondrial biogenesis and function in thyroid cell lines and thyroid tumors

Focusing on the impact of the removal of miR-218 on the PRC/PGC-1 α ratio, we used knock-in and knock-out models for miR-218 in the XTC.UC1 cell line. After 48h of anti-miR-218 treatment, the expression of PGC-1 α (PPARGC1A), cytochrome *c* (CYCS) and ATP5B, corresponding to genes with conserved miR-218 target sites (context score > -0.20, Targetscan software) was up-regulated when miR-218 was inhibited (Fig. 4A). Exploring other regulators of mitochondrial biogenesis, we saw that the expression of PRC and ERR α (ESRRA), not known or predicted to be directly targeted by miR-218, was down-regulated when miR-218 was inhibited whereas NRF1 expression was not modified. MiR-218 removal led to changes in mitochondrial mass with both a significant decrease in JC1 fluorescence and COX2 protein level (38% of the control) whereas no difference in cell proliferation was observed (Fig. 4B).

On the contrary, the induction of miR-218 expression in XTC.UC1 cells (Fig. 4A, B), showed that PGC-1 α , CYCS and ATP5B expression was down-regulated when miR-218 was enhanced, but with a positive impact on the total mitochondrial protein level. This increased mitochondrial biogenesis was associated with a significant impact of miR-218 induction on cell proliferation measured by the MTT test (33% reduction compared to control) in accordance with direct cell counts.

Interaction between miR-218 and PGC-1 α mRNA sequences (referred to on Fig. 4C) was explored at the protein level. Our results showed that miR-218 inhibition led to a 5.2-fold increase in PGC-1 α protein (Fig. 4D), in accordance with a direct silencing effect of miR-218 on PGC-1 α expression. Analysis of two other thyroid cell lines (FTC133 and RO82W1) and 40 thyroid samples from normal

tissues (NT), papillary thyroid carcinomas (PTCs), classic (FTA) and oncocytic variants (OTA) of follicular adenomas showed that the expression of miR-218 was inversely correlated with the PRC/PPARGC1A ratio (Fig. 5A, B). In thyroid tissue, miR-218 was significantly over-expressed in mitochondrial-rich tumors (OTA, 2.8-fold) compared to NT, FTAs and PTCs. We previously showed that OTAs presented a mainly oxidative metabolism while PTCs were glycolytic thyroid tumors (Baris *et al.* 2004; Baris *et al.* 2005). The expression of miR-218 was closely related to that of PRC and ERR α whereas the expression of miR-15b was weakly associated with that of PRC. Thus, the over-expression of miR-218 in oncocytic variants could be related to the over-expression of both PRC and ERR α factors and to the under-expression of PGC-1 α and may serve as a marker of the mitochondrial energy function.

All these results suggest that miR-218 induction could regulate, both negatively and positively, the expression of genes involved in the OXPHOS process as well as that of specific transcription factors and coactivators controlling mitochondrial biogenesis leading to a global enhance of mitochondrial biogenesis (Fig. 5C).

Discussion

Close coordination between the mitochondrial and nuclear genomes is essential for an efficient OXPHOS process. Metabolic signaling through the PGC-1 pathway adjusts mitochondrial energy production to cell substrate requirements and mitochondrial biogenesis. Thus, PGC-1-driven mitochondrial biogenesis impeded cancer cell proliferation under glycolytic conditions (Wang and Moraes, 2011). Since the PGC-1 family of coactivators plays an integrative role in the cell metabolic network, the direct control of miRNA expression by these coactivators would improve the regulation of the energetic pathways involved in the metabolic switch observed in cancer cells (Scarpulla 2011). Our study demonstrates that PRC interacts directly with the promoters of several miRNAs. These 12 PRC-regulated miRNAs control intracellular signaling pathways as well as OXPHOS at the post-

transcriptional level. It has recently been suggested that combinatorial regulatory patterns of transcription factors and miRNAs participate in cooperative activities (Bueno & Malumbres 2011; Lin *et al.* 2012). Our results suggest that the PRC pathway plays a central role in integrating mitochondrial biogenesis and energy production to cell proliferation, especially through the MAPK pathway in which all the miRNAs are involved. We have previously shown that the PRC-controlled MAPK pathway was mainly related to the redox-sensitive pathway dependent on the Ask1 protein (Raharijaona *et al.* 2009). Thus, the combinatory effect of PRC-regulated miRNAs on MAPK pathway appears to be closely related to the redox status of cell. Except for miR-125a, the miRNA expression was positively regulated by PRC leading us to suspect a negative feedback loop on genes whose expression can also be directly stimulated by PRC. We observed that while the expression of miR-125a was negatively controlled by PRC, miR-125a indirectly down-regulated PRC expression. This negative feedback loop could be related to the recent reported role of miR-125a-3p in the control of cell redox status by targeting the tyrosine kinase Fyn, a pivotate regulator of cell signaling (Ninio-Many *et al.* 2013). However, miR-125a also belonged to the mitochondrial pool of miRNAs that could directly target some of the mitochondrial DNA-encoded genes of the respiratory chain complexes (Barrey *et al.* 2011), and may complicate the impact of this miRNA on the regulation of mitochondrial function.

Five of the 12 miRNAs were specifically involved in the regulation of mitochondrial energy production. Control of mitochondrial activity by miRNAs has been recently explored (Li *et al.* 2012). miRNAs were involved not only in OXPHOS control but also in the control of mitochondrial morphology, mitophagy and apoptosis. Moreover, miRNAs and components of the miRNA machinery were present in the mitochondria (Bandiera *et al.* 2011; Barrey *et al.* 2011). Two of the five miRNAs we identified, i.e. miR-15b and miR-30a, had been already shown to ensure mitochondrial integrity and the regulation of the fusion/fission process (Li *et al.* 2010; Nishi *et al.* 2010). Although miR-218 has not been shown to directly target proteins of the mitochondrial respiratory chain, it has recently involved in the inhibition of the mTOR-Akt pathway leading to changes in mitochondrial gene

expression and functions (Uesugi *et al.* 2011). We showed that inhibition of these five miRNAs could lead to either the increase or the decrease (miR-15b) of mitochondrial function in accordance with the negative feedback loop due to four of the miRNAs. However, we had previously demonstrated that PRC was able to induce mitochondrial biogenesis and function (Raharijaona *et al.* 2009). We were therefore led to suspect that the combinatory effect of PRC-regulated miRNAs, involved in mitochondrial dynamics or related to the intra-mitochondrial pool, contribute to enhance OXPHOS through complementary regulatory pathways.

Our study shows that the inhibition of miR-218 leads to a decrease in PGC-1 α while inducing the expression of PRC. Some miRNAs are associated with this metabolic shift through interference with specific genes involved in the PGC-1 α or PGC-1 β pathways (Aoi *et al.* 2010; Eichner *et al.* 2010). Mir-218 has been previously described as a tumor suppressor gene of which the re-expression is capable of reducing tumor cell growth (Venkataraman *et al.* 2013). Its tumor suppressive activity is exerted through the mTORC1 component Rictor inhibiting Akt phosphorylation in oral cancer (Uesugi *et al.* 2011). In contrast, mTOR control of the mitochondrial function through the PGC-1 α /YY1 pathway has been associated with the mTORC2 complex (Cunningham *et al.* 2007). It could be hypothesized that the disorganization of the mTORC1 complex may favor the mTORC2 complex in differentiated thyroid tumors presenting a low proliferative index. This could be related to recent evidences for a redox-sensitive mTORC2 activation (Kumari *et al.* 2012; Nayak *et al.* 2013). However, the use of Targetscan software predicted that PGC-1 α was also directly targeted by miR-218. Thus, the mTORC effect on the mitochondrial function should now also be explored through the PRC pathway.

We confirmed that miR-218 may have opposite effects on the expression of PRC and PGC-1 α in different cellular and tumor models. While both PRC and PGC-1 α are involved in the transcriptional control of OXPHOS genes, we consider that the changes in mitochondrial biogenesis we observed

were related to changes in the PRC/PGC-1 α expression ratio more than to direct miRNA effect on target genes. The impact of the PRC/PGC-1 α ratio on mitochondrial biogenesis was in accordance with our previous results concerning the regulatory effect of the PRC/PGC-1 α ratio on the metabolic oxidative/glycolytic balance (Mirebeau-Prunier *et al.* 2010). The resultant is a global induction in mitochondrial biogenesis and OXPHOS process we referred in the schematic diagram of figure 5C. These contrary effects on PGC-1 α and PRC may explain the expression profile of the PGC-1 family of coactivators previously observed in mitochondrial-rich, oncocytic thyroid tumors (Savagner *et al.* 2003; Mirebeau-Prunier *et al.* 2010). Whereas PRC is over-expressed in oncocytic tumors inducing the expression of miR-218, PGC-1 α is down-regulated when targeted by miR-218. Our results are in accordance with the down regulation of PGC-1 α observed in other epithelial tumors and associated to cancer growth (Zhang *et al.* 2007). In thyroid tumors, since the expression of miR-218 is clearly related to functional mitochondria, we suggest that this miRNA could constitute a good marker for tumors with high levels of functional mitochondria.

In conclusion, we identified 12 miRNAs with an expression directly regulated by a complex involving PRC. Focusing on the five miRNAs that specifically target genes involved in the OXPHOS process, we demonstrated their both negative and positive role in the control of the process. MiR-218 represents part of an expression control loop regulating this specific metabolic pathway by modifying the PRC/PGC-1 α ratio. To our knowledge, this is the first report of the role played by miR-218 in the control of PRC-related mitochondrial functions in tumor cells operating on an oxidative metabolism. Our results show that PRC and several miRNAs cooperate in the fine regulation of OXPHOS, confirming the close relationship between the transcriptional and post-transcriptional controls involved in critical cell metabolic activity. The further investigation of the combined role of miR-218 and PRC in the control of cell proliferation should open up new perspectives in cancer therapy.

Disclosure of potential conflicts of interest: no potential conflicts of interest are disclosed

Funding: This work was supported by grants from *L'Agence Nationale de la Recherche* (ANR – *Emergence Bio CYTHCHIP*), from *La Ligue Contre le Cancer*, and from *La Société Française d'Endocrinologie*.

Contribution of each author: conception (RH, FS), design (DB, RH, FS), execution (RR, DG, AD, LR), interpretation data (SC, DB, SLP, RH), preparing article (SC, RH, FS)

Acknowledgements

We are grateful to Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript, and to Dominique Couturier for technical help.

References

- Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Simmosis VA, Zhang L & Hatzigeorgiou AG 2010 The DIANA-mirExTra web server: from gene expression data to microRNA function 2. *PLoS.One.* 5 e9171.
- Andersson U & Scarpulla RC 2001 Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* 21 3738-3749.
- Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H & Yoshikawa T 2010 The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol.Metab* 298 E799-E806.
- Bandiera S, Ruberg S, Girard M, Cagnard N, Hanein S, Chretien D, Munnich A, Lyonnet S & Henrion-Caude A 2011 Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS.One.* 6 e20746.
- Baris O, Mirebeau-Prunier D, Savagner F, Rodien P, Ballester B, Loriod B, Granjeaud S, Guyetant S, Franc B, Houlgatte R, Reynier P & Malthiery Y 2005 Gene profiling reveals specific oncogenic mechanisms and signaling pathways in oncocytic and papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 24 4155-4161.
- Baris O, Savagner F, Nasser V, Loriod B, Granjeaud S, Guyetant S, Franc B, Rodien P, Rohmer V, Bertucci F, Birnbaum D, Malthiery Y, Reynier P & Houlgatte R 2004 Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89 994-1005.
- Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O & Gidrol X 2011 Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS.One.* 6 e20220.
- Bueno MJ & Malumbres M 2011 MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim.Biophys.Acta* 1812 592-601.
- Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ & Miller N 2010 MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC.Cancer* 10 173.
- Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, Tremblay AM, Eichner LJ, Arlow DH, Mootha VK & Giguere V 2010 The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR{alpha}/PGC-1{alpha} bioenergetic functions. *Genes Dev.* 24 537-542.
- Croce CM 2008 Oncogenes and cancer. *N.Engl.J Med.* 358 502-511.
- Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK & Puigserver P 2007 mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450 736-740.

- Eichner LJ, Perry MC, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J & Giguere V 2010 miR-378(*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1beta/ERRgamma transcriptional pathway. *Cell Metab* 12 352-361.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP & Bartel DP 2007 MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol.Cell* 27 91-105.
- He X, Sun C, Wang F, Shan A, Guo T, Gu W, Cui B & Ning G 2012 Peri-implantation lethality in mice lacking the PGC-1-related coactivator protein. *Dev.Dyn.* 241 975-983.
- Hock MB & Kralli A 2009 Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu.Rev.Physiol* 71 177-203.
- Jacques C, Guillotin D, Fontaine JF, Franc B, Mirebeau-Prunier D, Fleury A, Malthiery Y & Savagner F 2013 DNA Microarray and miRNA Analyses Reinforce the Classification of Follicular Thyroid Tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*
- Jones AW, Yao Z, Vicencio JM, Karkucinska-Wieckowska A & Szabadkai G 2012 PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion.* 12 86-99.
- Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri ES, Slapak CA, Teicher B, Kufe D & Datta R 1998 Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol.Chem.* 273 16647-16650.
- Kumari KR, Tripathi C, Singh BK, Kumar DS, Kumar B, Sanyal S, Sharma S, Mitra K, Garg V, Singh K, Sultana S, Kamal TR, Kumar RS & Bhadauria S 2012 Estrogen receptor potentiates mTORC2 signaling in breast cancer cells by upregulating superoxide anions. *Free Radic.Biol.Med.* 53 1929-1941.
- Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, Medeiros DM, Kovacs A & Kelly DP 2008 Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev.* 22 1948-1961.
- Li J, Donath S, Li Y, Qin D, Prabhakar BS & Li P 2010 miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS.Genet.* 6 e1000795.
- Li P, Jiao J, Gao G & Prabhakar BS 2012 Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J.Cell Biochem.* 113 1104-1110.
- Lin CC, Chen YJ, Chen CY, Oyang YJ, Juan HF & Huang HC 2012 Crosstalk between transcription factors and microRNAs in human protein interaction network. *BMC.Syst.Biol.* 6 18.
- Mirebeau-Prunier D, Le Pennec S, Jacques C, Fontaine JF, Gueguen N, Boutet-Bouzamondo N, Donnart A, Malthiery Y & Savagner F 2013 Estrogen-related receptor alpha modulates lactate dehydrogenase activity in thyroid tumors. *PLoS.One.* 8 e58683.

- Mirebeau-Prunier D, Le Pennec S, Jacques C, Gueguen N, Poirier J, Malthiery Y & Savagner F 2010 Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria. *FEBS J* 277 713-725.
- Nayak BK, Feliars D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, Gorin Y & Block K 2013 Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 32 3147-3155.
- Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, Chuderland D & Shalgi R 2013 microRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn. *J. Cell Sci.* 126 2867-2876.
- Nishi H, Ono K, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, Kinoshita M, Kuwabara Y, Mori RT, Hasegawa K, Kita T & Kimura T 2010 MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol. Chem.* 285 4920-4930.
- Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, Reczko M & Hatzigeorgiou AG 2009 DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics.* 25 1991-1993.
- Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloso SM, Guilherme A, Tang X, Straubhaar J, Cherniack AD, Parker MG & Czech MP 2006 Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin. Invest* 116 125-136.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92 829-839.
- Raharijaona M, Le PS, Poirier J, Mirebeau-Prunier D, Rouxel C, Jacques C, Fontaine JF, Malthiery Y, Houlgatte R & Savagner F 2009 PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocyctic thyroid tumours. *PLoS. One.* 4 e7964.
- Savagner F, Mirebeau D, Jacques C, Guyetant S, Morgan C, Franc B, Reynier P & Malthiery Y 2003 PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyctoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 779-784.
- Scarpulla RC 2008 Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 88 611-638.
- Scarpulla RC 2011 Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* 1813 1269-1278.
- Scarpulla RC, Vega RB & Kelly DP 2012 Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab* 23 459-466.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB & Spiegelman BM 2003 Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol. Chem.* 278 26597-26603.
- Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K & Inazawa J 2011 The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.* 71 5765-5778.

- Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P & Spiegelman BM 2006 Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3 333-341.
- Venkataraman S, Birks DK, Balakrishnan I, Alimova I, Harris PS, Patel PR, Handler MH, Dubuc A, Taylor MD, Foreman NK & Vibhakar R 2013 MicroRNA 218 acts as a tumor suppressor by targeting multiple cancer phenotype-associated genes in medulloblastoma. *J.Biol.Chem.* 288 1918-1928.
- Vercauteren K, Gleyzer N & Scarpulla RC 2008 PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J Biol.Chem.* 283 12102-12111.
- Vercauteren K, Gleyzer N & Scarpulla RC 2009 Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *J Biol.Chem.* 284 2307-2319.
- Vercauteren K, Pasko RA, Gleyzer N, Marino VM & Scarpulla RC 2006 PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol.Cell Biol.* 26 7409-7419.
- Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, az-Elizondo J, Arredondo C, Chiong M, Olea-Azar C, Stutzin A, Lavandero S & Quest AF 2008 Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radic.Biol.Med.* 44 1146-1160.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM 1999 Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98 115-124.
- Yamamoto H, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Yoshizaki T, Kashiwagi A & Maegawa H 2012 MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 303 E1419-E1427.
- Zhang Y, Ba Y, Liu C, Sun G, Ding L, Gao S, Hao J, Yu Z, Zhang J, Zen K, Tong Z, Xiang Y & Zhang CY 2007 PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway. *Cell Res.* 17 363-373.

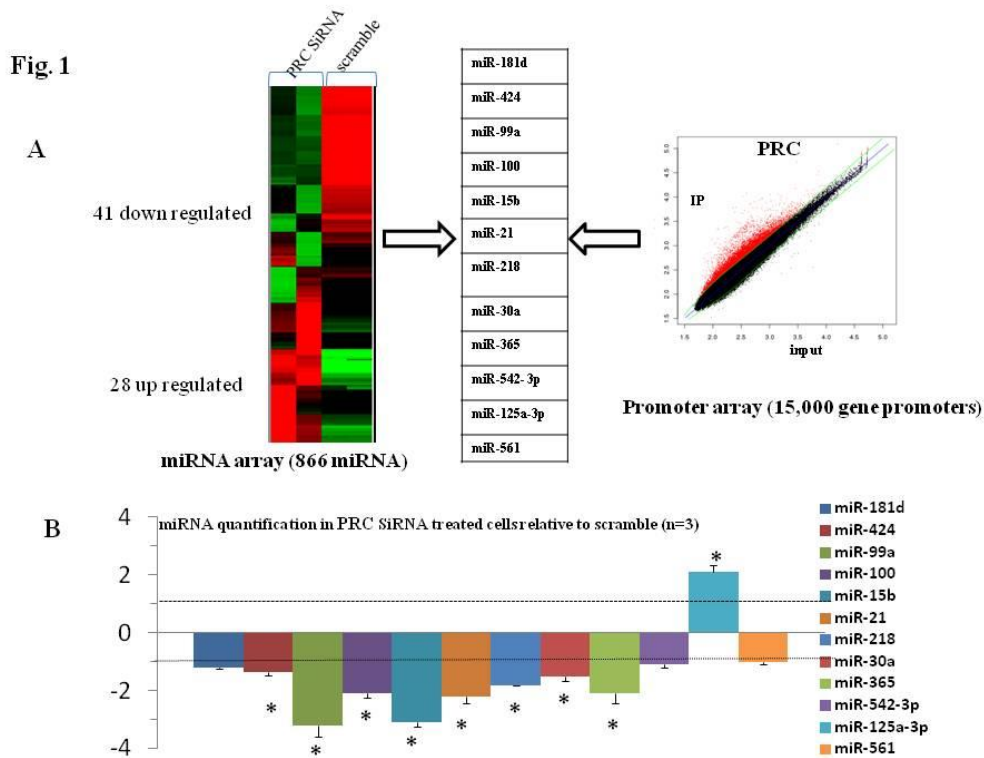


Fig. 1:

Selection of PRC-controlled differential miRNAs

1A: Differential miRNAs after treatment of the XTC.UC1 cells with PRC siRNA. Two biological replicates were used for each treatment and the mean expression of three technical replicates was determined for each biological sample. The miRNA array revealed 69 differential miRNAs (41 down-regulated and 28 up-regulated) while ChIP-chip analysis of the XTC.UC1 cells using a PRC antibody showed that 12 of the 56 miRNA promoters present on the promoter array were directly regulated by PRC.

IP: PRC immunoprecipitated fraction; input: non-immune-precipitated fraction of XTC.UC1 cells.

1B: Quantitative PCR analyses were performed on new PRC siRNA and scramble-treated XTC.UC1 cells ($N=3$) to confirm the differential expression of the selected miRNAs. $*P < 0.05$ for PRC siRNA compared to scramble controls.

Fig. 2

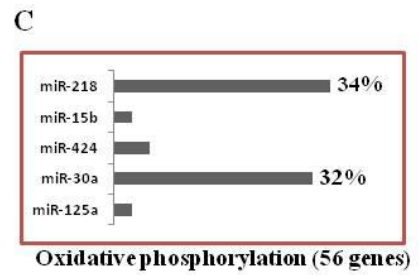
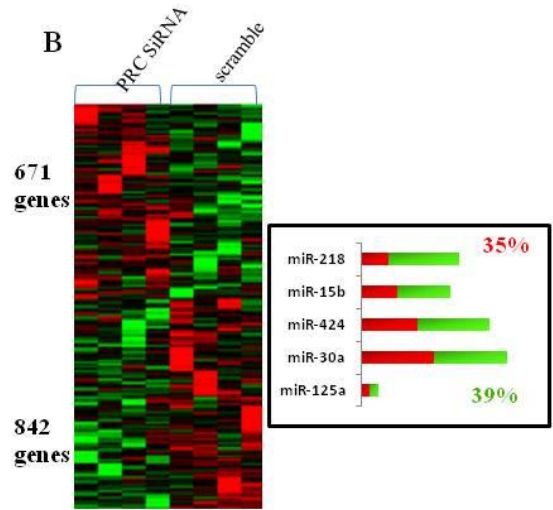
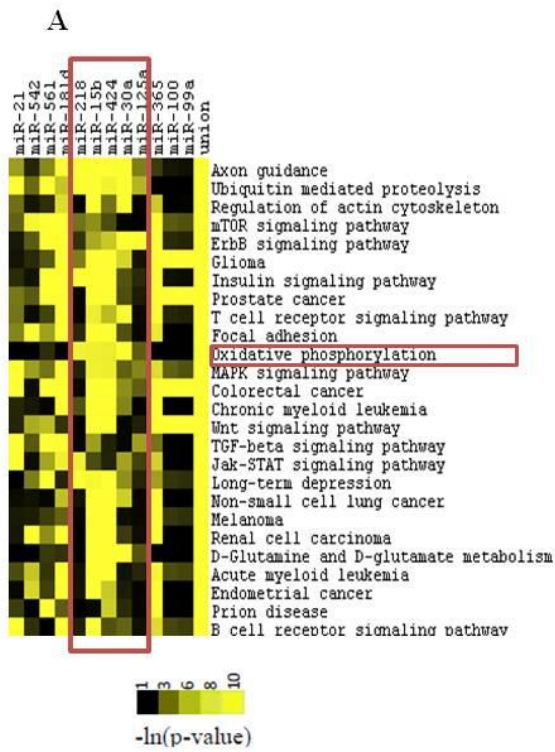
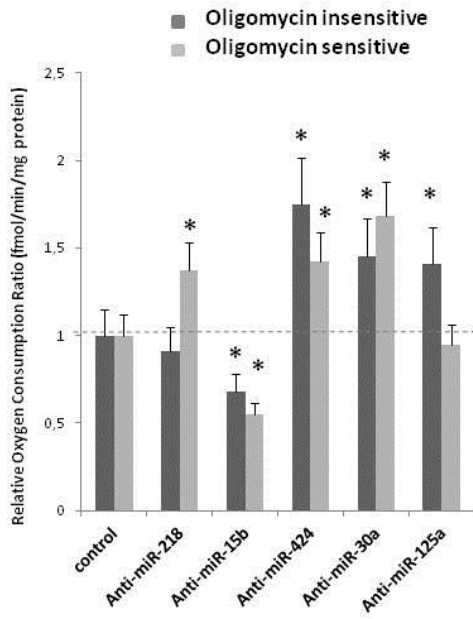


Fig. 3

A



B

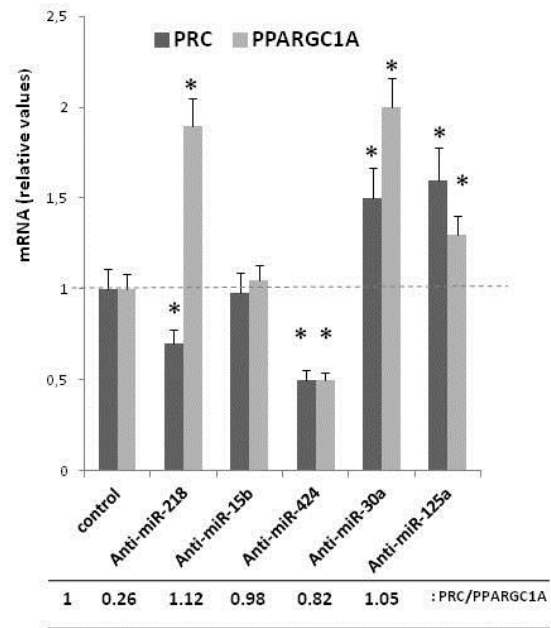


Fig. 4

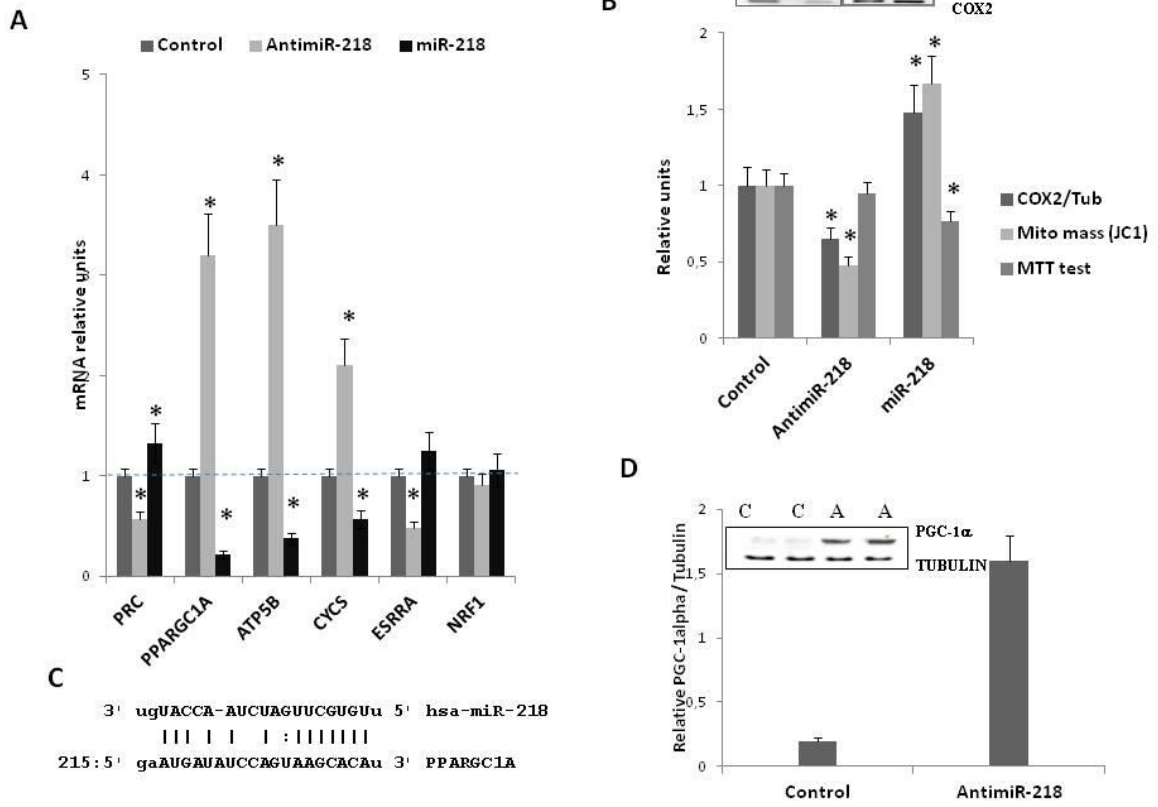


Fig. 5

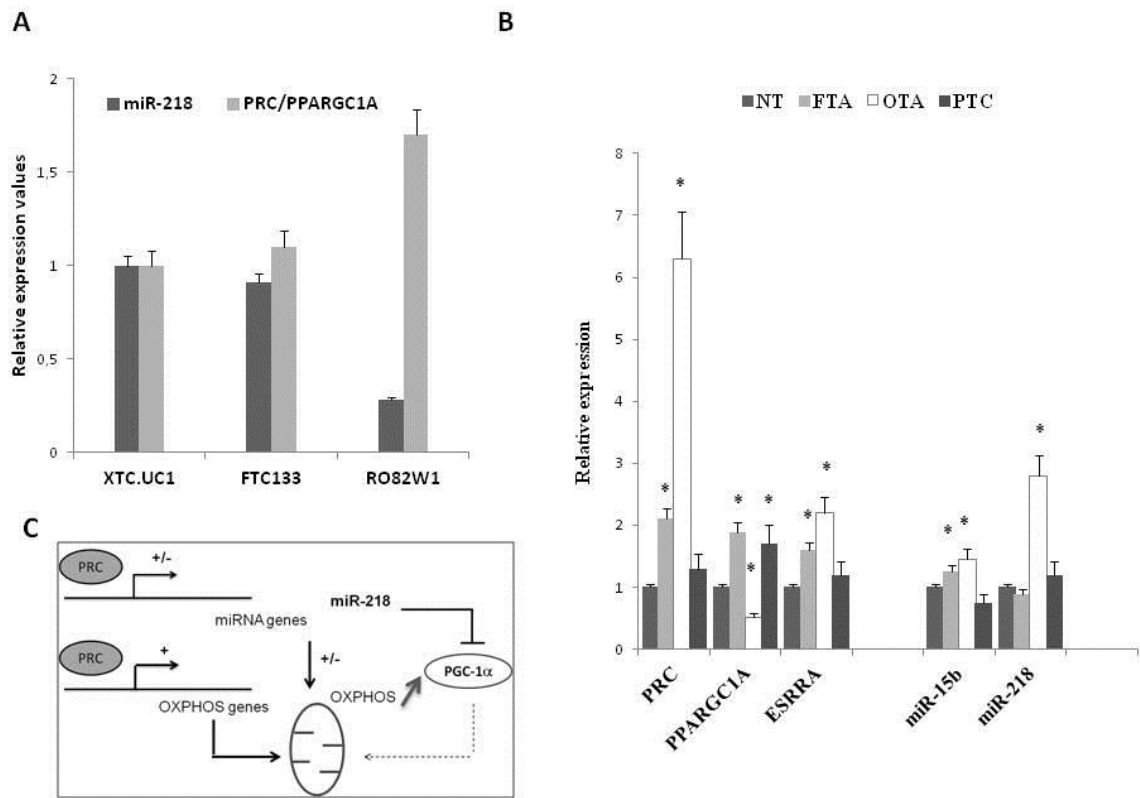


Figure legends

Fig. 2: Relevant miRNAs associated with PRC-related cellular functions

2A: Ontologies for genes targeted by each of the 12 miRNAs were grouped to identify commonly regulated functional processes. Using Diana-miRpath software, we selected pathways for a logarithmic transformation of the p-value > 3 for at least 3 of the 12 miRNAs (Papadopoulos *et al.* 2009).

2B: Correspondence between miRNAs up-regulated and down-regulated by PRC and miRNA targeting using the Diana-miRExTra web server (Alexiou *et al.* 2010). Five of the 12 differential miRNAs were associated with the control of PRC-dependent miRNAs. miR-218 was mainly associated with positive PRC-dependent gene expression whereas the other miRNAs were associated with either positive or negative PRC-dependent gene expression.

2C: PRC-dependent genes associated with the OXPHOS process (56 genes) were tested for miRNA targeting using the Diana-miRExTra software. Two miRNAs, miR-218 and miR-30a, were associated with the direct or indirect control of OXPHOS.

Fig. 3: Functional Analyses of five anti-miR (218, 15b, 424, 30a, 125a) on XTC.UC1 cells

3A: The relative oxygen consumption was measured using the mitostress kit and the Seahorse XF-24 apparatus (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The oligomycin-insensitive fraction represents nonphosphorylating respiration, recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin. Oligomycin-sensitive fraction represents the phosphorylating respiration, i.e. the fraction used for ATP synthesis.

3B: PRC and PPARGC1A gene expressions were measured by quantitative RT-PCR, normalized to β -globin mRNA copy numbers and expressed relative to the control, assigned a unit value .

Fig. 4: Anti-miR-218 action on mitochondrial biogenesis and cell proliferation in XTC.UC1 cells

4A: The genes examined by quantitative RT-PCR represented predicted targets (PGC-1 α /PPARGC1A, ATP5B and CYCS) and indirect target genes (PRC, NRF-1, ESRRA) of miR-218 involved in mitochondrial biogenesis. Data are expressed in relative units (mRNA copy numbers of a specific gene normalized to β -globin mRNA copy numbers) and expressed relative to the control, assigned a unit value.

4B: Mitochondrial biogenesis was analyzed by the flow cytometric approach (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using 5 μ g/mL JC-1. Protein expression for a complex IV subunit (COX2, 24 KDa; Mitosciences, Eugene, OR, USA) was measured by Western blot analysis and expressed relative to α -tubulin level (65 KDa; Abcam, Cambridge, UK) and control. Cell proliferation was analyzed using the MTT test (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and correlated to cell counts. A: Anti-miR-218; M: prémiR-218; C: Control.

Values are the average \pm SD for three separate determinations ($N=3$). * $P<0.05$ versus control.

4C: PPARGC1A sequence targeted by miR-218 on miR database (www.mirbase.org)

4D: Protein expression for PGC-1 α (PPARGC1A, Ab77210, Abcam) was measured by Western blot analysis after transfection with a anti-miR-218 and expressed relative to α -tubulin level (65 KDa; Abcam, Cambridge, UK) and control. A : Anti miR218; C: Control

Values are the average \pm SD for three separate determinations ($N=3$). * $P<0.05$ versus control.

Fig. 5: miR-218 expression in thyroid cell lines and thyroid tumors

5A: The gene expression of PRC, PPARGC1A and miR-218 was measured by quantitative RT-PCR in FTC133 and RO82W1 cells, normalized to β -globin mRNA copy numbers or miR-26b. PRC/PPARGC1A ratio and miR-218 were represented relative to XTC.UC1 cells.

Values are the average \pm SD for three separate determinations ($N=3$). * $P<0.05$ versus control.

5B: Selected mRNAs (PRC, PGC-1 α /PPARGC1A and ERR α /ESRRA) and miRNAs (miR-15b and miR-218) were measured by quantitative RT-PCR on 40 thyroid tissues: papillary thyroid carcinomas, oncocytic and follicular adenomas compared to normal thyroid tissues. Values are the averages \pm SD for five determinations. $N=10$ for each class of tissue. * $P<0.05$ versus normal thyroid tissue.

NT: normal thyroid tissue; FTA: follicular thyroid adenoma; OTA: oncocytic thyroid adenoma; and PTC: papillary thyroid carcinoma.

5C: Schematic diagram of the PRC/miRNA regulating pathway of mitochondrial biogenesis and function in thyroid tumor cells. OXPHOS: oxidative phosphorylation.

Article 2: The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts both microtubules and mitochondrial networks in T98G glioma cell line.

Le glioblastome est un cancer extrêmement agressif avec une médiane de survie n'excédant pas un an même avec l'utilisation de thérapies très performantes. Le manque de spécificité des traitements actuels et leurs effets secondaires plus ou moins indésirables ont conduit plusieurs équipes à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de cibler spécifiquement ces cellules tumorales. L'une de ces stratégies consiste en l'injection de substances ciblant les microtubules, les MTAs (*Microtubule-Targeting Agents*). Ces MTAs exercent leur activité anti-tumorale en altérant la polymérisation des microtubules et leur dynamique conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire et l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Dumontet et Jordan, 2010). Les protéines constitutives des filaments intermédiaires fixent la tubuline non-polymérisée au niveau de sites spécifiques, les TBS (*Tubulin Bonding Site*), sites capable de moduler la polymérisation de cette tubuline (Bocquet *et al.*, 2009).

A partir de ces données, l'équipe a développé un peptide, le NFL-TBS.40-63, dérivé de la sous-unité légère des neurofilaments incluant une séquence TBS, capable d'entrer spécifiquement dans les cellules de glioblastomes humains par endocytose et d'y induire une perturbation du réseau de microtubule ainsi que l'apoptose des cellules (Bocquet *et al.*, 2009 ; Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013). De récentes études ont confirmé l'étroite relation entre les filaments intermédiaires et des molécules responsables de la plasticité du réseau de mitochondries, comme la mitofusine ou la dynamine, dynamique nécessaire au maintien de l'intégrité de l'organite et d'assurer sa motilité (Nekrasova *et al.*, 2011; Gentil *et al.*, 2012; Caglinec *et al.*, 2013). Aussi, des défauts d'équilibre

entre fusion et fission mitochondriales ont été reliés à différentes pathologies comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth, et semblent impliqués dans d'autres maladies neurodégénératives et des cancers.

Nous avons exploré l'impact de ce peptide sur le réseau de mitochondries et les fonctions mitochondriales. A ces fins, nous avons étudié l'incorporation de ce peptide dans des cellules d'une lignée dérivées de glioblastomes humains, les T98G, et en comparant les effets sur des cellules de fibroblastes murins, les NIH-3T3. Nous avons utilisé des conditions d'incubation et de concentration que nous savions effectives sur le réseau microtubulaire (Bocquet *et al.*, 2009 ; Bergès *et al.*, 2012 ; Balzeau *et al.*, 2013 ; Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013). L'impact sur les fonctions mitochondriales a été étudié par oxygraphie sur l'appareil Seahorse permettant l'acquisition en temps réel de la consommation en oxygène des cellules suivant l'injection de différentes drogues inhibitrices spécifiques de la chaîne respiratoire pour plusieurs conditions simultanées. Des analyses de RT-qPCR ont permis de regarder l'impact au niveau de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse et la dynamique des mitochondries. Enfin une approche par Western Blot et en microscopie confocale ont permis, respectivement, de valider l'impact au niveau des complexes de la chaîne respiratoire et corrélérer la destruction du réseau de microtubule à celle du réseau mitochondrial. Enfin, nous avons approché les miARNs, car ces derniers ont été montrés comme capable d'induire une résistance des cellules cancéreuses à différents MTAs grâce à des effets anti-apoptotiques. Pour cela, nous avons regardé l'expression de plusieurs miARNs, dont miR-21 et miR-221, dont l'expression est anormale dans les cellules cancéreuses et reliés d'une manière ou d'une autre aux mitochondries (Zhang *et al.*, 2010 ; Hao *et al.*, 2012). Comme montré par Mei *et al.* en 2010, l'injection d'inhibiteurs de miR-21 améliore les effets du Paclitaxel dans les cellules du cancer mammaire. Le peptide NFL –TBS.40-63 permet, quand à lui, un meilleur adressage de ce MTA inclus dans des nanocapsules lipidiques. Aussi une meilleure compréhension de ces phénomènes de régulation post-transcriptionnelle pourrait

permettre le développement de stratégies combinatoires, avec d'une part le peptide NFL-TBS.40-63 permettant le ciblage des glioblastome par des nanoparticules lipidiques contenant du Paclitaxel, et un prétraitement à base d'antagonistes ou d'agonistes de miARNs permettant d'améliorer les effets du traitement.

The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line

Romain Rivalin^{1,2*}, Claire Lépinoux-Chambaud^{1,2*}, Joël Eyer^{1,2}, Frédérique Savagner^{1,2,3}.

¹ Université d'Angers, Angers, F-49033, France

² Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, LNBT, UPRES EA-3143, Université d'Angers, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France

³ CHU Angers, Laboratoire de Biochimie, Angers, F-49033, France

* : equally contributors

Corresponding author: Frédérique Savagner, EA3143, CHU Angers; Tel : +33 241 35 33 14
Fax : +33 241 35 40 17 ; Frederique.savagner@univ-angers.fr

Keys words: Glioblastoma/ microtubule/ OXPHOS/ miRNAs/peptide

Running title: Mitochondrial plasticity affected by MTA

Word counts:3,367

Tables: 1; **Figures:** 5

Disclosure of potential conflicts of interest: no potential conflicts of interest are disclosed

Abstract

Despite aggressive therapies, including combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy, glioblastoma remains a highly aggressive brain cancer with the worst prognosis of any central nervous system disease. We have previously identified a neurofilament-derived cell-penetrating peptide, NFL-TBS.40-63, that specifically enters by endocytosis in glioblastoma cells, where it induces microtubule destruction and inhibits cell proliferation. Here, we explore the impact of NFL-TBS.40-63 on the mitochondrial network and its functions by using global cell respiration, quantitative PCR analysis of the main actors directing mitochondrial biogenesis, western blot analysis of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) subunits and confocal microscopy. We show that the internalized peptide disturbs mitochondrial and microtubule networks, interferes with mitochondrial dynamics and induces a rapid depletion of global cell respiration. This effect may be related to reduced expression of the NRF-1 transcription factor and of specific miRNAs, which may impact mitochondrial biogenesis, in regard to default mitochondrial mobility.

INTRODUCTION

Glioblastoma is a highly aggressive brain cancer that has been designated as grade IV, according to the World Health Organization [1]. It represents an extremely invasive form of glioma and has the worst prognosis of any central nervous system disease. Despite aggressive therapies that include combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy, the median post-diagnostic survival period is approximately one year [2]. Many aspects of glioblastoma contribute to its poor prognosis, including the invasive nature of these abnormal cells [3] and the extreme heterogeneity of this cancer [4]. The lack of specificity for the current treatments and their side effects imply the need to develop new therapeutic strategies that target tumor cells [5].

Microtubule-targeting agents (MTAs) represent an important class of drugs used in the treatment of cancers. Microtubules are ubiquitous cellular polymers composed of heterodimers of α - and β -tubulin subunits [6]. They play major roles in several cellular functions, including intracellular transport, maintenance of cell architecture, cell signaling and mitosis. MTAs exert their antitumoral activity by altering microtubule polymerization and dynamics, which causes growth arrest in mitosis and subsequent cell death by apoptosis [7]. Proteins that make up the intermediate filament are able to bind free unpolymerized tubulin onto specific sites named tubulin-binding sites (TBS) and thus can affect microtubule polymerization *in vitro* and *in vivo* [8]. A peptide derived from the light neurofilament subunit (NFL) that corresponds to the sequence of TBS (NFL-TBS.40-63) can enter specifically into glioblastoma cells by endocytosis [9], where it disrupts the microtubule network and induces cell death by apoptosis [10].

Recent studies have confirmed that interactions between intermediate filaments, notably NFL or Vimentin, and key molecules responsible for the plasticity of the mitochondrial network, including Mitofusin-1 and -2 (MFN1 and 2, respectively) or Dynamin, are necessary to maintain organelle integrity and to allow mitochondrial motility [11–13]. The fission process ensures mitochondrial structural quality by removing damaged mitochondria through mitophagy and facilitating apoptosis in conditions of cellular stress [14,15]. The fusion process could be divided into transient and complete fusion [16]. Contrary to complete fusion, the transient process is essential for promoting mitochondrial metabolism and motility by interplaying with the cytoskeletal anchorage.

A close relationship has been demonstrated between the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process and mitochondrial network organization, which is controlled by the balance between fusion and fission events [17]. The failure of mitochondrial fusion–fission dynamics has been involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases and cancers [18,19]. Mitochondrial biogenesis is dependant of transcription factors such as nuclear respiratory factors and estrogen-related receptors that coordinate the synthesis of OXPHOS complex subunits encoded by the nuclear and mitochondrial genomes. The transcriptional efficiency of these factors is controlled by coactivators from the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) family, i.e., PGC-1 α , PGC-1 β and the PGC-1-related coactivator (PRC), that integrate mitochondrial biogenesis and function to various environmental signals [20]. We previously showed that the ubiquitous PRC member was able to control mitochondrial fission by modulating the Fission-1 (FIS1) expression level in cancer cells, in addition to its effect on mitochondrial biogenesis [21].

Numerous studies have highlighted selected miRNAs related to glioma pathogenesis [22]. Some of them have potential applications as novel diagnostic and prognostic indicators. Thus, the reexpression of miR-34a encoded at Chr1p36.22, a region deleted in many glioblastomas, could be associated with reduced tumor proliferation, cell migration and invasion [23]. Conversely, miR-21 has been identified as an anti-apoptotic factor and presents a significant upregulation in glioblastoma, while its inhibition induced apoptosis in glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo* [24,25]. This miRNA is involved in the down regulation of the tumor suppressor gene PTEN, in caspase 3/7 activation and confers a drug resistance to cancer cells [26]. Moreover, an overexpression of miR-221 has been linked with increased cellular proliferation and an overexpression of the *c-KIT* gene [27,28]. These miRNAs have also recently been related to a pool of miRNAs called mitomiRs, which are associated with the mitochondrial compartment [29]. Their role in the control of mitochondrial functions and cell redox status is now established [30,31].

In this study, we focused on the role for MTAs in the OXPHOS process and the dynamics of mitochondrial networks. For this purpose, we used the T98G cellular model of human glioblastoma, in which we have previously demonstrated the incorporation and cytoskeleton effect for 10 μ M NFL-TBS.40-63 peptide [8–10,32].

MATERIAL AND METHODS

Cell lines and peptide design

Human T98G glioblastoma cells and mouse NIH-3T3 embryonic fibroblast cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). They were grown in T75 flasks at 37 °C under

5% CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium with 1 g/l glucose, which was supplemented with 5% Lglutamine, 10% fetal calf serum (both from Lonza, Walkersville, MD, USA) and 5% (penicillin/streptomycin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). A biotinylated peptide corresponding to NFL (NFL-TBS.40-63: YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS) and a similarly labelled scrambled peptide (NFL-SCR: SLGSPSSSVRASYSRRSYVYSSS) were synthesized (with more than 95% purity) by MilleGen (Toulouse, France) and dissolved in water at 1 mM concentration. They were used at final concentrations of 2, 5 and 10 μM for 6 h at 37 °C to evaluate their cellular effects.

Quantitative mRNA and miRNA analyses

T98G cells were tested for peptide effects on independent triplicate cell cultures. Cells were harvested following a trypsin-EDTA 1× (Sigma) treatment for 5–10 min and centrifugation. Total RNA was extracted from cells pellets using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed on 1 μg of total RNA with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Real-time quantification was performed on a 96-well plate using the Power SYBR® Green Master mix and the ABI 7900 apparatus (Applied Biosystems by Life technologies, Grand Island, NY, USA). Seven genes were tested for quantitative expression: MFN2 and FIS1 for the mitochondrial fusion and fission process, PRC/PPRC1, PGC-1α/PPARGCA1, NRF-1, CYCS (Cytochrome c) and TFAM (Mitochondrial transcription factor A) for mitochondrial biogenesis and its functions. The data were normalized to β-globin, and the relative expression level of specific mRNA was calculated with the usual 2^{-ΔΔCt} method. The sequences of primers used in this study

are referenced in Table 1.

For miRNA analyses, cDNA was first produced using the VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Using Express SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen), real-time PCR was carried out on a ABI 7900 apparatus (Applied Biosystems by Life technologies) using a universal primer and forward primers specific to each miRNA, according to the NCode miRNA Database (Table 1). For each sample, three independent reverse transcription reactions were performed, and each reaction was assayed in duplicate by real-time PCR. MiRNA levels were normalized to U5 snRNA, a snoRNA (small nucleolar RNA), which has been established as the most stably expressed reference gene [33].

Western blot analyses

T98G and NIH-3T3 cells were incubated with 10 μ M of NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR. After 6 hours of treatment, the cells were rinsed in phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), trypsinized and collected in centrifuge tubes. The cells were lysed and the protein concentrations were measured using a protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 20 μ g of the proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to poly (vinylidene difluoride) membranes (Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, UK) and incubated with dilutions of the following monoclonal antibodies: anti- α -tubulin (Abcam, Cambridge, UK), anticomplex-IV, subunit IV (COX4, MS408, Mitosciences, Eugene, OR, USA) and anti-complex-II, subunit Ip (SDHB, MS203, Mitosciences). After several washes in TBS-Tween (with 0.1% Tween-20), the membranes were incubated with an appropriate chemiluminescent-labelled, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson

ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA). The blots were developed using the enhanced chemiluminescence method (ECLplus, Amersham). Signal quantification was performed via non-saturating picture scanning using a Gel Doc 1000 Molecular Analyst apparatus (Biorad, Hercules, CA, USA).

Mitochondrial oxygen consumption analyses

NIH3T3 and T98G cells were seeded in Seahorse XF-24 plates (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The cells were tested with 2, 5, or 10 μM of NFL-TBS and compared to 10 μM NFL-SCR. After 6 h of treatment, the cells were changed to an unbuffered DMEM (DMEM base medium supplemented with 17.5 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 31 mM NaCl and 2 mM Glutamine, pH 7.4) and incubated at 37 °C in a non-CO₂ incubator for 1 h. Three baseline measurements of oxygen consumption rate were collected on the XF 24 Seahorse apparatus using the XF cell Mito Stress kit (#101706 from Seahorse Bioscience). After the Seahorse analysis, the cells were lysed, and the protein concentration was measured using a protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The oxygen consumption of each well was normalized according to the total protein amount (pmol/min/ μg).

Confocal microscopy

To study the molecular impact of the NFL-TBS.40-63 peptide on T98G cells, we used mitochondria (Mitotracker Deep Red FM) and microtubule markers (Alexa647-labeled antitubulin antibody, both from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The cells were seeded in 24 well plates (2 \times 10⁴ cells/well) containing coverslips. After 48 h, the cells incubated in 10 μM were biotinylated peptides (NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR) for 6 h at

37°C. After washing with the media, the cells were incubated for 15 min at 37 °C with 100 nM Mitotracker diluted in the media. After washing with PBS, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. Following three washes in PBS, the cells were incubated for 10 min in a permeabilization solution (Pipes 0.1 M, EGTA 1 mM, MgCl₂ 0.1 M, 4% PEG 8000, 0.5 % triton X-100, in PBS, pH 7.4). They were washed three times in PBS before incubation in a blocking solution (5% bovine serum albumin) for 15 min. The glioma cells were then incubated overnight with mouse anti- α tubulin antibody (Sigma) 1/500. Tubulin and peptides were labelled with Alexa 647 nm anti-mouse antibody and streptavidin Alexa 488 nm (Life Technologies) 1/200 for 1 h. Before adding 3 μ M 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 5 min, the cells were washed three times with PBS. Finally, the cells were washed twice in PBS and the coverslips were mounted with an anti-fading mounting medium (Prolong, Life Technologies). The stained cells were observed with a confocal Nikon A1RSI instrument and the images were analyzed using Nikon NIS-element software.

Statistical analyses

All experiments were repeated at least three times. The data are represented as mean values \pm standard deviation (SD), with N representing the number of experiments. The statistical significance of the variations observed was assessed using the Mann-Whitney test. The differences were considered significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using Prism3.00 (GraphPad software, San Diego, CA).

RESULTS

The NFL-TBS.40-63 peptide regulates the number of mitochondria and their function in human glioblastoma T98G cell line

We investigated the impact of a 6 hour-incubation in various NFL-TBS.40-63 peptide concentrations (2 to 10 μM) on mitochondrial respiratory function and biogenesis from T98G cells and NIH3T3 control cells [8,9]. A mitostress test was performed to investigate the main parameters of the OXPHOS process, including basal respiration rate, ATP turnover, proton leak and maximal oxygen consumption rate. Mitochondrial respiration is divided into two fractions. The oligomycin insensitive fraction corresponds to non-phosphorylating respiration and is recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin. The oligomycin-sensitive fraction represents the phosphorylating respiration and is the fraction used for ATP synthesis, which is calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration rate from the basal respiration rate. The NFL-TBS.40-63 peptide significantly affected both oligomycin-sensitive and insensitive fractions at 10 μM (Fig. 1A). The global oxygen consumption rate was reduced at all concentrations, with specific and significant decreases in the oligomycin-insensitive fractions of approximately 20% at the 2 μM and 5 μM concentrations. Conversely, for the NIH3T3 cells, none of the two oligomycin fractions were affected by the peptide concentration. The impact of 10 μM NFL-TBS.40-63 treatment on mitochondrial biogenesis was investigated at the protein level using Western blot analysis (Fig. 1B). Our results show a significant reduction in SDHB (complex II subunit) by 30% and of COX4 (complex IV subunit) by 20%, respectively, in T98G cells, when compared to the scrambled peptide. In NIH3T3 cells, no such reduction was observed, in accordance with our previous results for

non-permeant NIH3T3 cells for this peptide [8]. These results indicate a primary impact of the peptide on mitochondrial networks at a low concentration (2 μ M), which had no detectable effect on the microtubule network. However, at 10 μ M of peptides, both networks were affected.

The NFL-TBS.40-63 peptide rapidly affects the regulatory factors of the mitochondrial biogenesis in the T98G cell line

The expression of five essential genes that control mitochondrial biogenesis and function—PRC (PPRC1) and PGC-1 α (PPARGC1A) coactivators, NRF-1 transcription factor, mitochondrial transcription factor TFAM and a component of respiratory chain (CYCS)—were investigated in T98G cells. We observed that reduced mitochondrial oxygen consumption at 10 μ M NFLTBS. 40-63 was associated with a significantly reduced expression of NRF-1 and its target gene CYCS by 20% and 50%, respectively (Fig. 2). However, no significant changes in the expression levels of PRC, PGC-1 α or TFAM could be observed after 6 hours of NFL-TBS.40-63 treatment. These results indicate that NFL-TBS.40-63 peptide has a rapid impact on the transcriptional machinery regulating the mitochondrial biogenesis. This regulation is independent of the expression level for PRC and PGC-1 α and could be related to the post-transcriptional regulation of NRF-1 expression.

The NFL-TBS.40-63 peptide alters microtubules and mitochondrial organization at 10 μ M Concentration

Previously, we have shown that T98G human glioblastoma cells internalized the NFL-TBS.40-63 peptide at a 10 μ M concentration, which induces the disruption of their

microtubule network [8]. Consequently, tubulin is aggregated around the nucleus, while cells lose their extensions and become spherical. Using markers of both mitochondrial and microtubule networks, in association with a marked peptide, confocal microscopy showed that the peptide entered in T98G and accumulated in a polarized manner (Fig. 3A). This was related with a reduction in microtubule and mitochondrial density where the peptide accumulated. It was also convincing for dividing cells where the basis of the mitotic spindle was enriched with peptide and mitochondria but completely devoid of microtubule (Fig. 3B). The NFL-TBS.40-63 peptide was also able to surround microtubule tips and should limit filipodia formation (Fig. 3C), in accordance with our previous results showing the reduction of cell motility at a low peptide concentration [10]. We observed that the peptide was able to interact with both the microtubules and the mitochondria to modify the architecture of their networks (Fig. 4). Thus, the mitochondria were structured independently of the microtubule network. In addition, the peptide was able to organize according to long peptide sequences on which the mitochondrial network could be deployed.

THE NFL-TBS.40-63 peptide reduces mitochondrial dynamics and post-transcriptional Regulation

We explored the impact of NFL-TBS.40-63 on the mitochondrial fission–fusion balance using the master regulator of mitochondrial dynamics, MFN2, which is responsible for mitochondrial multiplication and FIS1, which is involved in mitochondrial fission (Fig. 5A). Here, we showed that, even if both factors presented a significant decrease in expression level, the FIS1/MFN2 ratio, which refers to the balance between dynamic events, was conserved. This conserved modelling balance could be associated with differences in

mitochondrial motility resulting from abnormal cytoskeletal anchorage.

We have also analyzed the expression of relevant miRNAs associated with mitochondria, drug resistance, or both and found that a 6-hour treatment with 10 μ M of NFL-TBS.40-63 peptide induced a significant change in expression for four miRNA: miR-96, miR-218, miR-21 and miR-221 (Fig. 5B). Two of these miRNA (miR-21 and miR-221) were found to be overexpressed in many cancer cells, including glioblastoma, as they had anti-apoptotic and anti-mitophagic effects.

DISCUSSION

A close interaction between mitochondria and the cytoskeleton is essential to ensure the proper distribution of mitochondria within a cell. Recent studies have highlighted interactions between intermediate filaments, notably NFL or Vimentin and the key molecules necessary for the maintenance of organelle integrity and mitochondrial motility [11–13]. The NFL-TBS.40-63 peptide is able to alter microtubule formation when it is internalized by T98G glioblastoma cells and inhibits their proliferation [8]. In this study, we have evaluated the effect of NFL-TBS.40-63 peptide internalization on mitochondrial biogenesis and function. Our observations revealed a negative impact on T98G cell respiration after 6 hours of NFLTBS.40-63 peptide treatment (2 to 10 μ M). This action on mitochondrial function at lower concentrations than those necessary to disturb the cytoskeleton could be related to a primary modification of the mitochondrial motility. It has been shown that peptides derived from the N-terminal domain of intermediate filaments, like desmin, vimentin and keratin, can

interact with the unpolymerized tubulin [8]. A recent study demonstrated that the N-terminal domain of vimentine (residues 41–94) can also directly bind mitochondria and serve as an adaptor between actin microfilaments and mitochondria [13]. We suggest that the primary action of NFL-TBS.40-63 leads to sequential organization of the peptide, which disturbs the cytoskeleton and reorganizes the mitochondrial network. This should be related to the conserved FIS1/MFN2 ratio we observed at higher peptide concentrations. At a 10 μ M peptide treatment, we also revealed a colocalization of NFL-TBS.40-63 with mitochondria and a specific accumulation at the microtubules' extremities, which may limit membrane ruffling, as previously reported [34,35]. This study revealed that NFL-TBS.40-63 provokes a redistribution of mitochondria throughout the cytoplasm. Mitochondria were able to reorganize along the peptide from end to end, in order to form a polarized but less dense network and reduce cell respiration. Mitochondria and autophagy are linked to homeostatic elements that act in response to changes in the cellular environment, such as energy, nutrients and stress. Thus, defects in plasticity could simultaneously impair autophagy, which may result in increased risk for various human diseases [36,37]. The peptide treatment induces an inhibition of FIS1 and MFN2 gene expression. As has been shown, deregulation of mitochondrial fusion or fission is associated with alterations in the organization of the mitochondrial network and with the inhibition of energy metabolism [38]. Alterations in energetic metabolism cause defects in respiratory chain subunits and may lead to mitochondrial network fragmentation [39]. Western blotting analyses indicated that decreases in the OXPHOS process were also related to a decrease in mitochondrial biogenesis when using 10 μ M of NFLTBS.40-63 peptide. This rapid reduction of mitochondria after 6 hours of peptide treatment may be related to the induction of mitophagy.

Thus, the PGC-1 α /PRC pathway, which is related to the transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis, was not affected after 6 hours of treatment, while NRF-1 and CYCS were repressed; this suggests a lack of extra-cellular signal regulation or a delayed PGC-adaptive response to energy depletion. Moreover, this could suggest a rapid regulation of mitophagy/biogenesis balance through post-transcriptional pathways, as recently reported [40,41].

We found that the expression of two relevant miRNAs—miR-21 and miR-221—was altered by a 6-hour treatment with the NFL-TBS.40-63 peptide, compared to the scrambled control. These miRNAs are referred to as oncomirs, as they have anti-apoptotic and proliferative effects [25,26,28,42]. In human tumors, miR-21 down-regulates the expression of PTEN, which is involved in mitophagy through its negative regulation of PINK1 (PTEN-induced kinase 1) [43]. Up-regulation of miR-221 has also been correlated with down-regulation of one of its targets, NAIP (NLR-family, apoptosis inhibitory protein), which is involved in neurodegeneration and apoptosis regulation [44]. On the contrary, over-expression of miR-218 and miR-96 were associated with apoptosis induction through targeting the PINK1/NF-KB pathway and FOXO1, respectively [45,46]. The inverse functions of these three miRNAs on apoptosis or mitophagy should be considered, depending on their half-time. Thus, miR-21 is considered to be one of the most long-lived miRNAs [47].

In conclusion, we showed that a 6-hour treatment with 10 μ M of NFL-TBS.40-63 peptide induces a direct reduction in the global respiration of cells that have internalized the peptide. This effect can be related to a reduction of the main transcription factor involved in mitochondrial biogenesis and in the OXPHOS process. The treatment is efficient in reducing the expression of miRNAs that are involved in glioblastoma pathogenesis and MTA

resistance. To our knowledge, this is the first report showing the role played by this peptide in the regulation of global respiration for glioblastoma cells. Our results show that disrupting a microtubule network affects the mitochondrial network distribution, thus confirming the close relationship between these two networks.

Funding: This work was supported by grants from CIMATH-2 (*ciblage moléculaire et applications thérapeutiques*) Region Pays de la Loire, Ligue Contre le Cancer and L'INSERM.

Acknowledgements: We are grateful to Philippe Hulin for technical help.

References

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
3. Monticone M, Daga A, Candiani S, Romeo F, Mirisola V, et al. (2012) Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* 12: 358.
4. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109: 93-108.
5. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10: 459-466.
6. Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69: 277-302.
7. Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9: 790-803.

8. Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, et al. (2009) Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 29: 11043-11054.
9. Lepinoux-Chambaud C, Eyer J (2013) The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* 454: 738-747.
10. Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J (2012) A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther* 20: 1367-1377.
11. Cagalinec M, Safiulina D, Liiv M, Liiv J, Choubey V, et al. (2013) Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *J Cell Sci* 126: 2187-2197.
12. Gentil BJ, Minotti S, Beange M, Baloh RH, Julien JP, et al. (2012) Normal role of the low molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *FASEB J* 26: 1194-1203.
13. Nekrasova OE, Mendez MG, Chernouvanenko IS, Tyurin-Kuzmin PA, Kuczmarski ER, et al. (2011) Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell* 22: 2282-2289.
14. Gomes LC, Di BG, Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are separated from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13: 589-598.
15. Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22: 1577-1590.

16. Liu X, Weaver D, Shirihai O, Hajnoczky G (2009) Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* 28: 3074-3089.
17. Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118:5411-5419.
18. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC (2009) Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 19: 50-56.
19. Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872-884.
20. Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88: 611-638.
21. Raharijaona M, Le Pennec S, Poirier J, Mirebeau-Prunier D, Rouxel C, et al. (2009) PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours. *PLoS One* 4: e7964.
22. Tivnan A, McDonald KL (2013) Current Progress for the Use of miRNAs in glioblastome Treatment. *Mol Neurobiol* 48: 757-768.
23. Li WB, Ma MW, Dong LJ, Wang F, Chen LX, et al. (2011) MicroRNA-34a targets notch1 and inhibits cell proliferation in glioblastoma multiforme. *Cancer Biol Ther* 12: 477-483.

24. Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, et al. (2007) MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* 67: 8994-9000.
25. Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan XB, Han L, et al. (2010) MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer* 10: 27.
26. Costa PM, Cardoso AL, Nobrega C, Pereira de Almeida LF, Bruce JN, et al. (2013) MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. *Hum Mol Genet* 22: 904-918.
27. Hao J, Zhang C, Zhang A, Wang K, Jia Z, et al. (2012) miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncol Rep* 27: 1504-1510.
28. Kim HJ, Kim YH, Lee DS, Chung JK, Kim S (2008) In vivo imaging of functional targeting of miR-221 in papillary thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 49: 1686-1693.
29. Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, et al. (2011) Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One* 6: e20220.
30. Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, Chuderland D, Shalgi R (2013) microRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn. *J Cell Sci* 126: 2867-2876.
31. Tomasetti M, Neuzil J, Dong L (2013) MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: Role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta*

32. Balzeau J, Pinier M, Berges R, Saulnier P, Benoit JP, et al. (2013) The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 34: 3381-3389.
33. Galiveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z (2010) Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA* 16: 450-461.
34. Rinnerthaler G, Geiger B, Small JV (1988) Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol* 106: 747-760.
35. Schober JM, Komarova YA, Chaga OY, Akhmanova A, Borisov GG (2007) Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J Cell Sci* 120: 1235-1244.
36. Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, et al. (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J Biol Chem* 287: 10631-10638.
37. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17: 87-97.
38. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, et al. (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405-1415.
39. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, et al. (2006) Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1172-

C1182.

40. Kubli DA, Gustafsson AB (2012) Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111: 1208-1221.
41. Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS (2012) Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem* 113: 1104-1110.
42. Karsy M, Arslan E, Moy F (2012) Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer* 3: 3-15.
43. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, et al. (2010) MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 411: 846-852.
44. Lukiw WJ, Cui JG, Li YY, Culicchia F (2009) Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* 91: 27-32.
45. Xia H, Yan Y, Hu M, Wang Y, Wang Y, et al. (2013) MiR-218 sensitizes glioma cells to apoptosis and inhibits tumorigenicity by regulating ECOP-mediated suppression of κ B activity. *Neuro Oncol* 15: 413-422.
46. Guo Y, Liu H, Zhang H, Shang C, Song Y (2012) miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol Lett* 4: 561-565.

47. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, et al. (2011) Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* 39:5692-5703.

Table 1: Primers used for mRNA and miRNA quantification

PRC/PPR C1	For: 5'-CACTGGTTGACCCTGTTCT-3' Rev: 5'-GTGTTTCAGGGCTTCTCTGC-3'	miR- 125a-3p	5'-GGTGAGGTTCTTGGGAGCC-3'
CYCS	For: 5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3' Rev: 5'-TCCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'	miR- 181b	5'-ATTCATTGTTGTCGGTGGGT-3'
PGC- 1 α /PPAR GCA1	For: 5'-ACTCAAGTGGTGCACTGACC-3' Rev: 5'-CTGGGTACTGAGACCACTGC-3'	miR-107	5'-GTCGTGAGCAGCATTGTACAG-3'
NRF-1	For: 5'-GGAGTGATGTCCGCACAGAA-3' Rev: 5'-CGCTGTTAAGCGCCATAGTG-3'	miR-30a	5'-TGAAACATCCTCGACTGGAAG-3'
TFAM	For: 5'-CCGAGGTGGTTTTTCATCTGT-3' Rev: 5'-CAGGAAGTCCCTCCAACGC -3'	miR- 146b	5'-TGAGAACTGAATTCCATAGGCT-3'
FIS1	For: 5'- GGAGGAACAGCGGGATTACGT-3' Rev: 5'- CTTCATGGCCTTGTC AATGAGC-3'	miR-96	5'-TTTGGCACTAGCACATTTTTGCT-3'
MFN2	For: 5'- GAAGAACAGGTTCTGGACGTC-3' Rev: 5'- CCTCATGGCCATCTGTGCCC-3'	miR-221	5'-ACCTGGCATAACAATGTAGATT-3'
β -Globin	For: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' Rev: 5'-ACACA ACTGTGTTCACTAG-3'	miR-885	5'-AGGCAGCGGGGTGTAGTGGATA-3'
		miR-218	5'-CGTTGTGCTTGATCTAACCATGT-3'
U5snRNA	5'-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-3'	miR-100	5'-GCCCAAGCTTGTATCTATAGGTATG-3'
miR-21	5'-CGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'	miR-31	5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3'

Figure legends

Figure 1: Action of the NFL-TBS.40-63 peptide on mitochondrial number and functions in T98G cells and NIH 3T3 control cells.

1A: The relative oxygen consumption was measured using a mitostress kit and a Seahorse XF-24 apparatus (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The oligomycin-insensitive fraction represents non-phosphorylating respiration, which was recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin. The oligomycin-sensitive fraction represents the phosphorylating respiration, i.e., the fraction used for ATP synthesis.

1B: The protein expressions of mitochondrial subunit IV of complex IV (**COX4**, MS408, Mitosciences) and subunit Ip of complex II (**SDHB**, MS203, Mitosciences) were measured by Western blot analysis after a 6-hour exposure to NFL-TBS.40-63 peptide and normalized to the α -tubulin level (65 KDa; Abcam, Cambridge, UK). The protein expression for the peptide-treated samples was expressed relative to that of the scramble-treated samples. S: Scramble; P: NFL-TBS.40-63 peptide

The values represent the average \pm SD for three separate determinations ($N = 3$). *: $P < 0.05$ versus control.

Figure 2: Quantitative PCR analysis of the genes involved in the control of mitochondrial biogenesis.

PPRC (PPRC1) and PGC-1 α (PPARGC1A) coactivators, NRF-1 transcription factor, mitochondrial transcription factor TFAM and a component of the respiratory chain, Cytochrome c (CYCS), were measured in T98G cells treated by 10 μ M of NFL-TBS.40-63 peptide. The data are expressed in relative units (mRNA expression of a specific gene normalized to β -globin mRNA expression) and expressed relative to the control, which was assigned a unit value. The values are the average \pm SD for three separate determinations ($N = 3$). *: $P < 0.05$ versus control.

Figure 3: Effects of 10 μ M of NFL-TBS.40-63 peptide on mitochondrial and microtubule networks in human T98G glioblastoma cells.

3A: NFL peptide accumulates within the cell in a polarized manner, limiting the density of the microtubules and mitochondrial networks.

3B: NFL peptide accumulates at the basis of the mitotic spindle and excludes the microtubule network.

3C: The peptide surrounds the microtubules' tips and limits filopodia formation. Microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- α -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labelled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino phénylindole (DAPI; blue) and mitochondria with a mitotracker (Deep Red FM). The cells were examined with a Nikon A1RSI confocal microscope and the images were analyzed with Nikon NIS-element software. The *red bars* are the measuring scale.

Figure 4: The NFL-TBS.40-63 peptide reorganizes mitochondrial networks in human T98G glioblastoma cells.

The white arrow indicates a mitochondrial network (bottom left) superposed with a microtubule network (bottom right). The yellow arrow indicates a mitochondrial network (bottom left) superposed with long peptide sequences (top right). The microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- α -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labelled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino phénylindole (DAPI; blue) and the mitochondria with a mitotracker (Deep Red FM). The cells were examined with a Nikon A1RSI confocal microscope and the images were analyzed with Nikon NIS-element software. The *red bars* are the measuring scale.

Figure 5: Quantitative PCR analysis of mitochondrial fission/fusion actors and relevant differentially-expressed miRNA in human T98G glioblastoma cells.

5A: Quantitative PCR analysis of mitochondrial fission/fusion actors (FIS1 and MFN2) in T98G cells. The data are expressed in units (mRNA expression of a specific gene normalized to β -globin mRNA expression) that are relative to the control, which was assigned a unit value.

5B: Quantitative PCR analysis of relevant differentially expressed miRNA in T98G cells. The data are expressed in units (miRNA expression relative to U5 snRNA) that are relative to the control, which was assigned a unit value.

The values are the average \pm SD for three separate determinations ($N = 3$). *: $P < 0.05$ versus control.

Figure 1

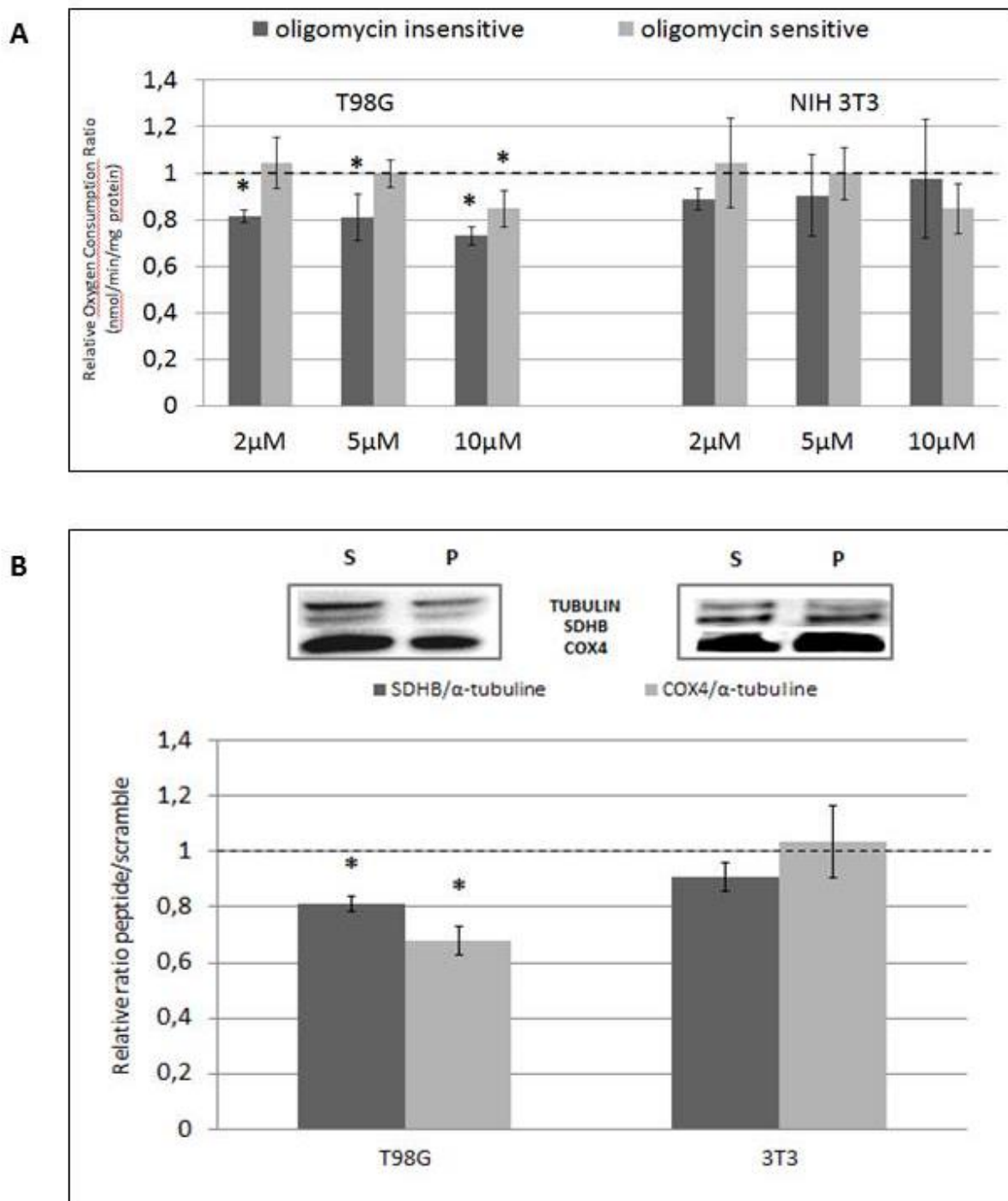


Figure 2

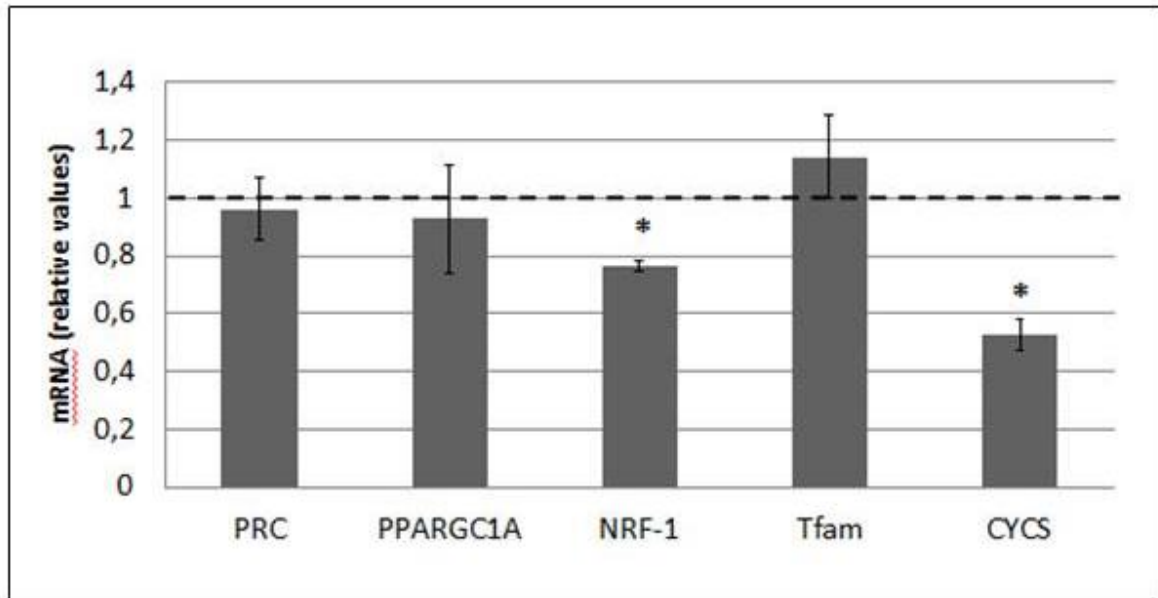
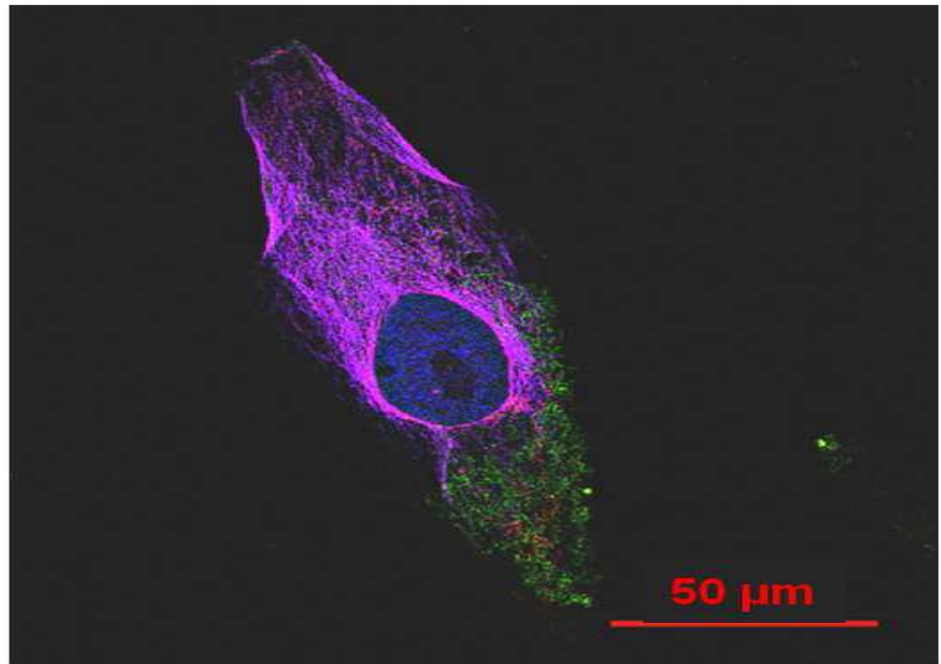
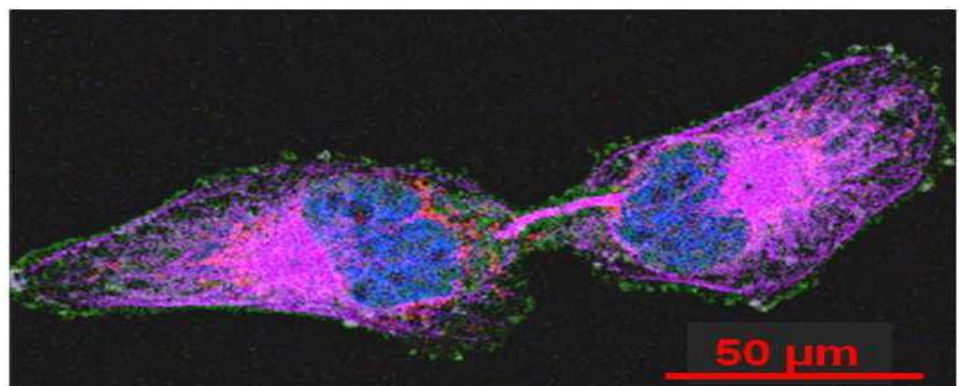


Figure 3

A



B



C

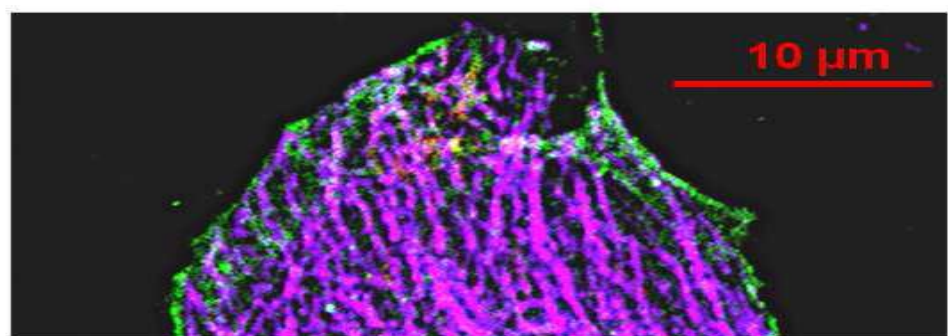


Figure 4

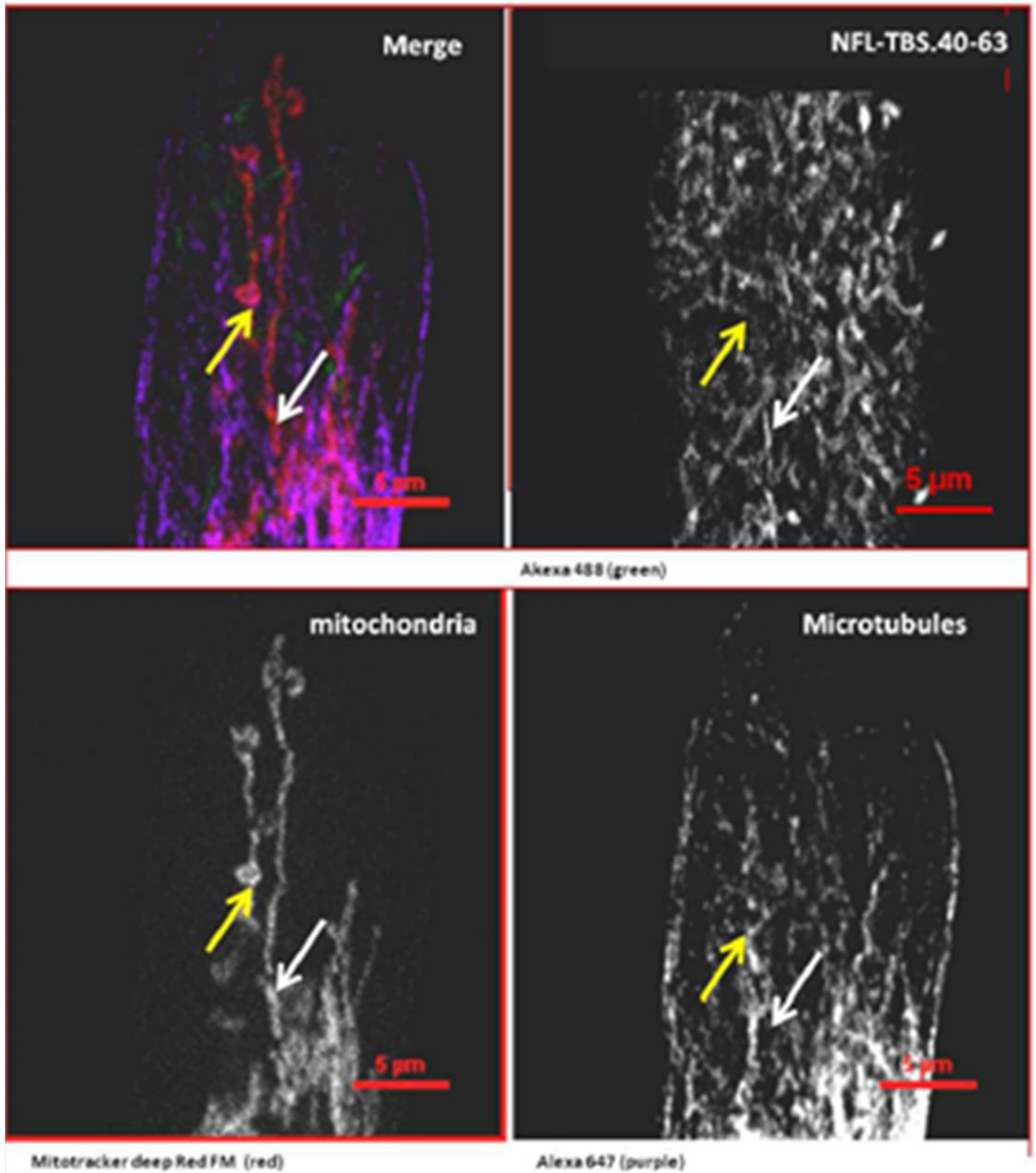
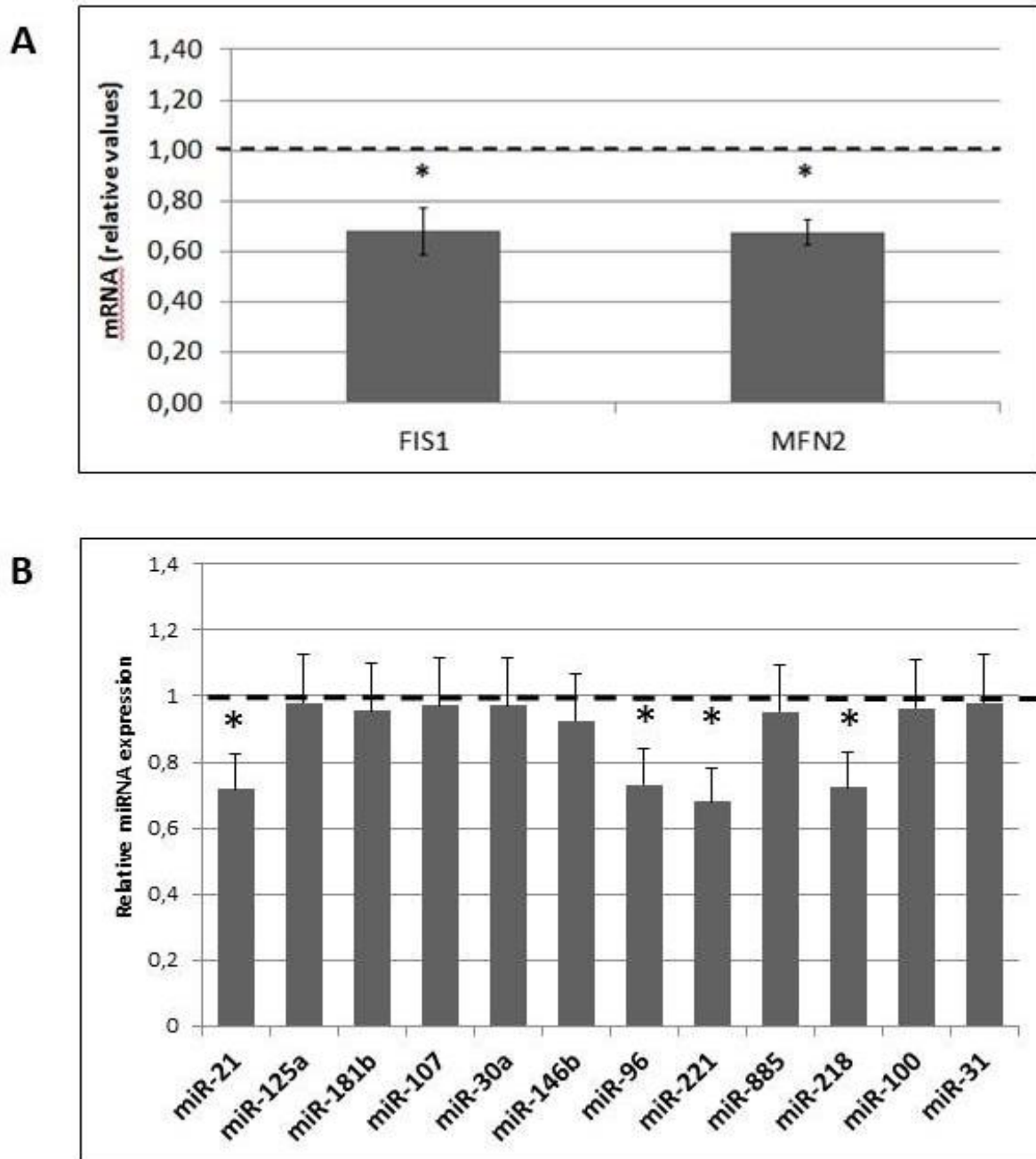


Figure 5



Résultats complémentaires

Comme nous l'avons vu précédemment, le coactivateur transcriptionnel PRC est directement impliqué dans la régulation de 12 miARNs mais également indirecte dans celle d'un membre d'un pool mitochondrial de miARNs, miR-494 (Raharijaona et al. 2009 ; Kren et al., 2009 ; Bian et al., 2010). Ce-dernier a été clairement identifié comme impliqué dans la régulation de la biogenèse et des fonctions mitochondriales (Bandiera et al., 2011) et l'identification de ses cibles potentielles a mis en évidence une boucle de rétrocontrôle impliquant PGC-1 α , NRF-1 et TFAM (Yamamoto et al., 2012). Nous avons cherché à comparer ses effets à ceux des 12 miARNs précités ainsi qu'à autre miARN, identifié comme appartenant au pool de mitomiRs, miR-365 (Barrey et al., 2011) mais actuellement uniquement montré comme un régulateur de l'apoptose via une régulation négative de l'expression de BCL-2 (Singh et Saini, 2012). Pour cela, nous avons utilisé le modèle cellulaire XTC.UC1, pour sa richesse en mitochondries fonctionnelles assurant un métabolisme oxydatif quasi-exclusif sous le contrôle de PRC. Ces cellules ont été cultivées 48 avant extraction de l'ARNm, ou 72 heures, pour l'oxygraphie, en présence d'un antimir dirigé contre le miARN à éteindre.

Le screening fonctionnel par oxygraphie (figure R1) nous révèle que comparativement aux résultats obtenus pour les 12 miARNs directement régulés par PRC, l'inhibition de miR-494 induit une augmentation globale de la respiration cellulaire contrairement à l'inhibition de miR-365 dont l'impact sur la respiration semble négligeable. Dans le cas de miR-494, l'effet se situe au niveau des fractions oligo-insensibles, donc la fraction de la consommation en oxygène qui n'est pas liée à la synthèse d'ATP, et oligo-sensibles, c'est-à-dire la fraction de la consommation en oxygène couplée à la synthèse d'ATP. MiR-365, par son absence d'effet lors du screening fonctionnel n'a pas été conservé.

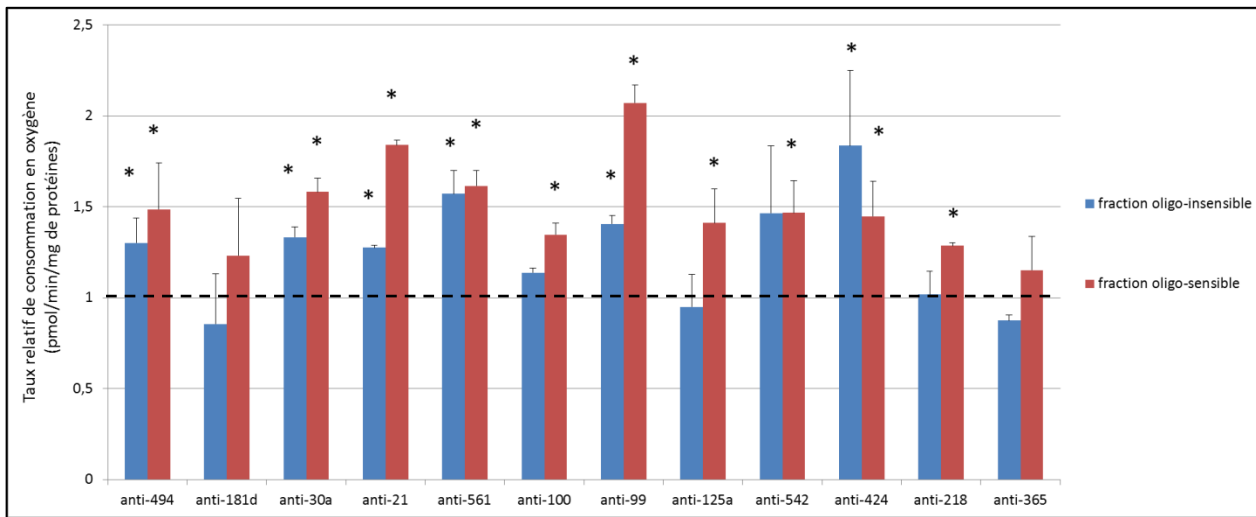


Figure R1 : Analyse fonctionnelle de 12 miARNs dans des cellules XTC.UC1

La consommation cellulaire en oxygène est mesurée en utilisant le kit mitostress et l'appareil XF-24 de Seahorse. La fraction oligo-insensible représente la respiration non-phosphorylante mesurée après inhibition de l'ATP synthase par l'oligomycine. La fraction oligo-sensible représente quant à elle la respiration phosphorylante utilisée pour la synthèse d'ATP.

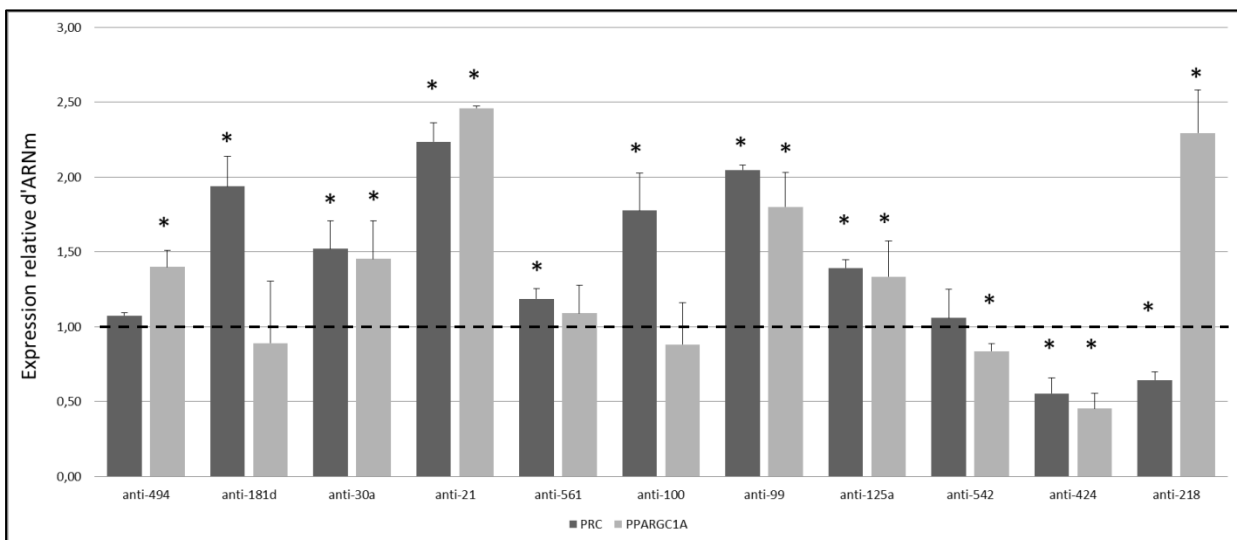


Figure R2 : Analyse de l'impact de 11 miARNs sur l'expression de PRC et PGC-1α (PPARGC1A)

L'expression relative de PRC et de PGC-1α a été mesurée en RT-qPCR et normalisée sur l'expression de la β-globine selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$ et rapportée sur le contrôle.

Précédemment, nous avons montré et confirmé que le ratio PRC/PGC-1 α exerce un rôle sur la biogenèse mitochondriale et sur l'équilibre métabolique oxydatif/glycolytique (Mirebeau-Prunier et al., 2010). Nous avons donc cherché à définir les modifications du ratio liés à l'inhibition de miR-494. Pour cela, nous avons dosé, par RT-qPCR, l'expression de PRC et de PGC-1 α (PPARGC1A). Il en résulte que miR-494 ne semble pas influencer l'expression de PRC, par contre pour PGC-1 α , les résultats sont en accord avec la prédiction de cibles par le logiciel TargetScan. PGC-1 α est désigné comme une cible possible de miR-494, ce qui correspond à l'augmentation observée de l'expression de ce coactivateur (figure R2). PRC et PGC-1 α sont tous deux impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la fonction OXPHOS, et les changements observés sur la respiration sont reliés à une modification du ratio PRC/PGC-1 α , 0.76 pour anti-494 au lieu de 1, plutôt qu'à un effet direct du miARN sur ces gènes cibles (tfam par exemple).

Vu les résultats obtenus et la confirmation de l'implication de miR-494 dans la régulation du ratio PRC/PGC-1 α et son impact sur la fonction mitochondriale, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur des ARNm extraits de cellules XTC.UC1 après une incubation de 48 heures en présence d'antimiR-494. Cette étude vise à affiner notre compréhension des différentes fonctions régulées directement ou indirectement par miR-494. La comparaison entre les cellules transfectées par l'antimiR-494 et le contrôle révèle des différences significatives avec le regroupement des gènes différentiels par cluster (figure R3). Le principe est ensuite d'associer des annotations fonctionnelles aux clusters en utilisant la base de données Gene Ontology (GO). L'analyse des ontologies les plus enrichies montre que parmi les fonctions positivement affectées, et donc négativement régulées par miR-494, on trouve le système de découplage entre synthèse mitochondriale d'ATP et chaîne de transport des électrons, la chaîne de transport des électrons ou la phosphorylation oxydative (tableau R1). Ces résultats sont semblables à ceux observés dans l'étude de Bandiera et al., 2011.

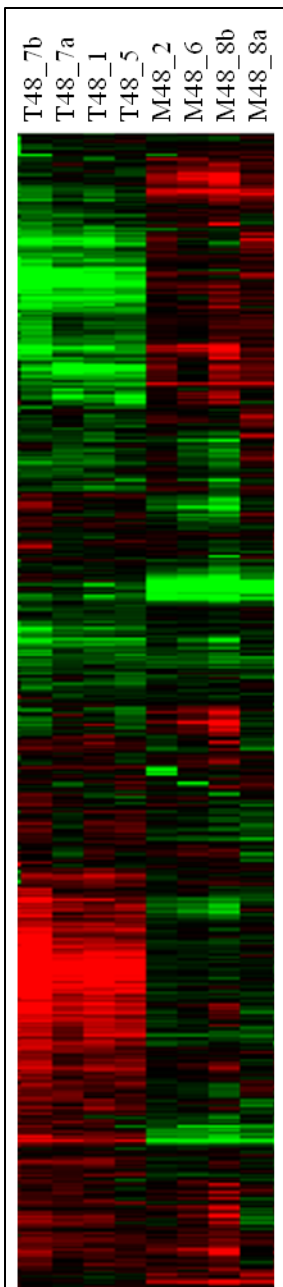


Figure R3 : Analyse par puce Agilent 4 x 44k de cellules XTC.UC1 après transfection avec un antimir-494 (M48) ou un scramble comme contrôle négatif (T48).

Les profils d'expression sont obtenus après une transfection de 48 heures. Un test de student est réalisé sur les gènes normalisés et filtrés. 2499 gènes (sur 44376) sont significatifs par rapport à la puce filtrée.

Tableau R1 : Annotations fonctionnelles suivant la base de données Gene Ontology (GO) :

Les tableaux suivants référencent les douze ontologies les plus enrichies après la transfection par l'antimir-494 et les sept ontologies moins représentées.

Term	log(Odds ratio)	pvalue	enrichissement
cytosolic ribosome (GO:0022626)	1,594	7,47E-20	4,923403206
translational elongation (GO:0000278)	1,5814	3,08E-24	4,861757509
Structural constituent of ribosome (GO:0003735)	1,3449	1,45E-28	3,837802741
ribosome (GO:0005840)	1,2859	2,47E-29	3,617922623
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775)	1,2557	6,24E-09	3,510294721
threonine-type endopeptidase activity (GO:0004298)	1,2487	2,22E-04	3,48580846
cytosolic part (GO:0044445)	1,2351	4,20E-17	3,438722376
NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137)	1,226	1,46E-07	3,407571952
NADH dehydrogenase activity (GO:0003954)	1,2226	1,46E-07	3,39600588
ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	1,2063	1,16E-08	3,341099686
oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH quinone or similar compound as receptor (GO:0016655)	1,1839	5,14E-05	3,267091044
respiratory electron transport chain (GO:0022904)	1,1332	2,79E-08	3,105578468
oxidative phosphorylation (GO:0006119)	1,1028	7,50E-11	3,012589476

guanyl-nucleotide exchange factor activity (GO:0005085)	-1,5147	3,23E-04	0,219874137
protein tyrosine kinase activity (GO:0004713)	-0,7257	1,11E-04	0,48398566
protein kinase activity (GO:0004672)	-0,6665	4,70E-05	0,513502696
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor (GO:0016773)	-0,6582	7,50E-06	0,517782505
protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)	-0,5594	8,11E-06	0,571551892
kinase activity (GO:0016301)	-0,4643	4,85E-04	0,628574954
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups (GO:0016301)	-0,4523	1,50E-04	0,636163292

En résumé, nous avons un miARN appartenant à un pool mitochondrial, dont l'expression est régulée indirectement et négativement par PRC afin de contrôler le ratio PRC/PGC-1 α et capable de diminuer certaines fonctions mitochondriales. MiR-494 participe donc, dans une certaine mesure, à l'homéostasie énergétique comme suggéré par Yamamoto et al., 2012.

Discussion, Conclusion et perspectives

Le but de mon projet était de préciser l'implication de la régulation post-transcriptionnelle, via les miARNs, et des interactions cytosquelette-mitochondries sur la biogenèse et les fonctions mitochondriales. Les membres de la famille de coactivateurs PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β et PRC) constituent un élément majeur de l'adaptation métabolique de la cellule en fonction de signaux environnementaux ou endogènes. Aussi, l'utilisation de lignées cellulaires thyroïdiennes, où le niveau d'expression de PGC-1 α est bas et celui de PRC élevé (Savagner *et al.*, 2003), permet d'étudier les facteurs de régulation contrôlés par PRC et impliqués dans la régulation de la fonction mitochondriale. L'utilisation de modèles cellulaires dérivés de lignées de glioblastomes permet d'élucider les mécanismes impliqués dans le développement de ce cancer, et de mieux comprendre les effets de l'utilisation d'un peptide dérivé de la sous-unité légère des neurofilaments, NFL-TBS.40-63, capable de déstabiliser le réseau de microtubules et d'induire rapidement la mort cellulaire sans affecter les cellules saines (Bergès *et al.*, 2009). L'apoptose étant induite par la libération de cytochrome c depuis la mitochondrie vers le cytoplasme et l'activation de caspases, il était intéressant de vérifier l'impact du peptide et la déstabilisation induite du cytosquelette sur le réseau de mitochondries et sur leurs fonctions.

De nombreuses équipes ont étudiés le coactivateur PGC-1 α , mais les propriétés et fonctions de PRC commencent à être élucidées. Aussi notre équipe a utilisé le modèle oncocytaire thyroïdien XTC.UC1 pour sa richesse en mitochondries et où l'expression de PGC-1 α est faible et indépendante de celle de PRC, même quand ce dernier est inhibé. Une étude récente de notre équipe montre que l'inhibition de PRC par siARN permet de préciser les fonctions de ce coactivateur et notamment une répression de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la biogenèse des mitochondries et leurs fonctions (Raharijaona *et al.*, 2009). Cette étude a permis de mettre également en évidence une expression altérée de plusieurs miARNs dont certains sont impliqués directement ou indirectement dans la régulation mitochondriale. A partir de ce constat, la première partie de mon

travail a été d'identifier les différents miARNs directement régulés par PRC et d'étudier l'impact de leur inhibition sur la production énergétique et sur la biogenèse. Notre étude par CHIP-chip a montré que PRC interagissait directement avec les promoteurs de douze miARNs. Ces miARNs sont référencés comme des contrôleurs des voies de signalisation intracellulaire mais également de la fonction OXPHOS à un niveau post-transcriptionnel. Tous ces miARNs sont impliqués dans la voie de signalisation des MAPK, ce qui suggère que PRC permet l'intégration de la biogenèse mitochondriale et de la production énergétique avec différentes phases du cycle cellulaire et de la prolifération. Les effets combinés des miARNs régulés par PRC sur la voie des MAPK semblent liées au statut redox de la cellule. Ces observations sont en accord avec ce que nous avons montré précédemment, à savoir que la voie des MAPK contrôlée par PRC est liée à une voie sensible au statut redox dépendant de la protéine Ask1 (Raharijaona *et al.*, 2009). La majorité des miARNs sont sous-exprimés lorsque PRC est inhibé, laissant supposer une boucle de régulation rétrograde de gènes directement régulés par PRC. *A contrario*, miR-125a est retrouvé surexprimé lorsque PRC est inhibé, et ce miARN réduit indirectement l'expression de PRC en retour sans doute lié au rôle de miR-125-3p dans le contrôle du statut redox (Ninio-Many *et al.*, 2013). Selon l'étude de Barrey *et al.*, miR-125a fait partie d'un pool de miARNs retrouvés associés à la mitochondrie, les mitomiRs. Cet état de fait laisse penser que miR-125a peut réguler directement l'expression de gènes mitochondriaux essentiels à la formation des complexes de la chaîne respiratoire (Barrey *et al.*, 2011).

Une fois les miARNs directement régulés par PRC identifiés, nous nous sommes intéressés à ceux qui étaient impliqués dans la régulation des fonctions mitochondriales. Il s'avère que cinq de ces miARNs régulent la production énergétique (miR-218 ; -15b ; 125a ; -30a ; -424) (Li *et al.*, 2012), mais également la morphologie, la mitophagie et l'apoptose. Par une étude fonctionnelle, nous avons montré que l'inhibition de quatre de ces cinq miARNs (miR-218 ; 125a ; -30a ; -424) conduisait aussi

bien à une augmentation qu'à une réduction de la fonction mitochondriale. Sachant que PRC régule à la fois la biogenèse des mitochondries et leur fonctions, on peut supposer que les miARNs régulés par PRC, ceux régulant la dynamique mitochondriale ou encore les mitomiRs, doivent contribuer à moduler la fonction OXPHOS selon une cinétique différente. Dans notre étude, l'inhibition de miR-218 conduit à une augmentation de l'expression de PRC et une inhibition de PGC-1 α . Cependant, cet effet varie selon les différents modèles cellulaires et tumoraux et du fait que PRC et PGC-1 α soient tous les deux impliqués dans la régulation de l'expression de gènes OXPHOS, nous pouvons supposer que les modifications observées de la biogenèse mitochondriale sont plutôt liées à une modification du ratio PGC-1 α /PRC que d'un effet direct des miARNs sur leurs gènes cibles. Notre équipe a déjà contribué à caractériser l'impact du ratio PGC-1 α /PRC sur la reprogrammation métabolique (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Ces effets contraires peuvent en partie expliquer les différents profils d'expression des coactivateurs de la famille PGC-1 observés pour les tumeurs oncocytaires thyroïdiennes riches en mitochondries (Savagner *et al.*, 2003). Dans ces tumeurs thyroïdiennes, l'expression de miR-218 va inhiber l'expression de PGC-1 α et conduire à une prolifération de mitochondries fonctionnelles.

Le screening fonctionnel de l'injection d'antimirs dirigés contre chacun des douze miARNs différentiellement régulés par PRC a permis d'identifier d'autres cibles thérapeutiques intéressantes pour notre étude. En dehors de miR-424, miR-30a et miR-125a qui sont déjà référencés dans le premier article. J'ai pu isoler miR-494 qui peut à l'instar de miR-218, se révéler être un bon marqueur de tumorigenèse pour le modèle thyroïdien. Ce miARN a été montré comme ciblant des facteurs pro- et anti-apoptotiques et est capable d'activer la voie de signalisation mitochondriale Akt par inactivation de PTEN, qui phosphoryle de nombreuses cibles nucléaires et mitochondriales. Ceci permet la régulation de l'apoptose, de la prolifération, du cycle cellulaire, du métabolisme

énergétique et du cytosquelette (Wang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009). Selon Olaru *et al.* en 2011, miR-494 assure une régulation négative de la transition G1/S du cycle cellulaire dans des hépatocytes humains. miR-494 a également la particularité de faire partie du pool mitochondrial, les mitomiRs. Cette appartenance a d'abord été démontrée chez le rat et la souris, avec une concentration plus importante de certains miARNs dans la mitochondrie par rapport au cytosol (Kren *et al.*, 2009 ; Bian *et al.*, 2010). Il a ensuite été démontré que ce pool de mitomiRs se retrouvait chez l'homme également (Bandiera *et al.*, 2011; Barrey *et al.*, 2011). Les auteurs émettent l'hypothèse que le transport du cytosol vers la mitochondrie puisse se faire grâce à l'association aux protéines de la famille Argonaute, et plus particulièrement Ago2 principale protéine active du complexe RISC (RNA-induced silencing complex). L'étude transcriptomique après transfection par l'antimir-494, montre que plusieurs fonctions sont altérées positivement ou négativement par l'inhibition de miR-494 dans les cellules XTC.UC1. Parmi les fonctions positivement affectées, et donc négativement régulées par miR-494, on trouve entre autres : le système de découplage entre synthèse mitochondriale d'ATP et chaîne de transport des électrons, la chaîne de transport des électrons ou la phosphorylation oxydative (tableau R1). Ces résultats sont semblables à ceux observés dans l'étude de Bandiera *et al.*, 2011. Tout récemment, une étude a montré que lors de l'effort musculaire ou de la différenciation des myoblastes en myocytes, miR-494 était sous-exprimé. L'identification de ses cibles potentielles a mis en évidence une boucle de rétrocontrôle impliquant PGC-1 α , NRF-1 et TFAM (Yamamoto *et al.*, 2012). TFAM est régulé négativement par ce miARN, mais positivement par NRF-1. MiR-494 participe donc, dans une certaine mesure, à l'homéostasie énergétique (Yamamoto *et al.*, 2012).

Au-delà de cette régulation post-transcriptionnelle, des interactions étroites avec le cytosquelette sont nécessaires pour assurer la distribution et la dynamique des mitochondries. De récentes études ont confirmé l'existence d'interaction avec les filaments intermédiaires et notamment, le principal constituant du cytosquelette neuronal, le neurofilament (Nekrasiva *et al.*,

2011 ; Gentil *et al.*, 2012 ; Cagalinec *et al.*, 2013). Notre équipe a développé un peptide capable de pénétrer spécifiquement dans les cellules de gliomes humains et d'y induire rapidement une déstructuration du réseau de microtubules avec *in fine*, la mort cellulaire par apoptose. Ce peptide, le NFL-TBS.40-63 empêche en effet la polymérisation de la tubuline, une fois pénétré par endocytose dans des cellules T98G dérivées de glioblastomes humains, sans affecter les cellules saines (Bocquet *et al.*, 2009 ; Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013). Dans cette seconde partie de mon travail, j'ai donc cherché à étudier l'impact fonctionnel de l'internalisation de ce peptide au niveau du réseau de mitochondries et leur mobilité mais également son effet au niveau de la biogenèse et des fonctions mitochondriales.

En partant du constat que la mitochondrie possède un site d'interaction avec le cytosquelette qui se trouve être également le site de polymérisation de la tubuline (Nekrasiva *et al.*, 2011), nous avons émis l'hypothèse que l'injection d'un peptide capable de bloquer la polymérisation de la tubuline au point d'entraîner la destruction du cytosquelette doit avoir des effets similaires au niveau du réseau de mitochondries. Nous avons donc travaillé avec les mêmes conditions que les premières publications (Bocquet *et al.*, 2009 ; Bergès *et al.*, 2012, Lépinoux-Chambaud, 2013), à savoir une incubation de six heures des cellules T98G en présence d'un milieu de culture contenant une concentration croissante de 2 à 10 μM de peptide NFL-TBS.40-63. Nos observations ont révélé un impact négatif sur la respiration cellulaire suite à ce traitement comparativement au Scramble et au modèle cellulaire murin de contrôle. Ce qui constitue une nouvelle confirmation de l'entrée sélective du peptide dans les cellules de glioblastomes. Une fois entré dans la cellule, il va induire en plus de la déstabilisation du cytosquelette, une diminution générale de la respiration cellulaire. Cette perte de fonction est probablement liée à une sous-expression des protéines constitutives de la chaîne respiratoire comme COX4 et SDHB, respectivement composants des complexes IV et II. L'analyse de régulateurs de la biogenèse et des fonctions mitochondriales nous indique que l'expression de NRF-1

est réduite tout comme celle de l'un des gènes dont il est le régulateur transcriptionnel, CYCS. A l'inverse, le traitement n'affecte pas l'expression des deux principaux coactivateurs impliqués dans l'adaptation métabolique, PGC-1 α et PRC, suggérant que cette action rapide sur NRF-1 n'est pas liée à un déséquilibre du ratio PRC/PGC-1 α mais certainement à une altération de la régulation post-transcriptionnelle par miARNs. Aussi, il a été montré que des altérations du métabolisme énergétique non compensées peuvent conduire à des défauts de synthèse, mise en place et fonctions des sous-unités de la chaîne respiratoire, ce qui peut conduire à une fragmentation du réseau mitochondrial par mitophagie (Benard *et al.*, 2006 ; Gomes *et al.*, 2011).

Nous avons démontré que ce peptide interagit spécifiquement avec le domaine N-terminal des filaments intermédiaires comme la desmine, la vimentine, la kératine et le GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Bocquet *et al.*, 2009). Une récente étude vient de démontrer que le domaine N-terminal de la vimentine, particulièrement les résidus 41 à 94, peut directement interagir avec la mitochondrie et sert d'adaptateur entre les microfilaments d'actine et la mitochondrie (Nekrasova *et al.*, 2011). Nous pouvons supposer que l'interaction avec le peptide entraîne une redistribution des mitochondries et de leur plasticité plus que dans des changements dans la dynamique mitochondriale. Cette hypothèse peut se confirmer avec la conservation du ratio FIS1/MNF2. Avec un traitement de 10 μ M, nous avons observé une colocalisation entre NFL-TBS.40-63 et la mitochondrie avec une redistribution simultanée des réseaux de microtubules et de mitochondries. Les agents MTAs, dont fait partie le peptide, sont capables de fixer la tubuline libre au niveau de sites spécifiques, les sites TBS (*tubulin binding site*), affectant ainsi la polymérisation des microtubules. Nous avons ainsi confirmé la colocalisation de ce peptide et des mitochondries avec une redistribution du réseau mitochondrial le long du peptide dans des cellules T98G. Ces mitochondries semblent se réorganiser bout à bout les unes par rapport aux autres, ce qui implique une réduction de la densité du réseau mitochondrial. Ce réseau moins dense et rigidifié, de par cette structure

atypique, conduit à une perte d'efficacité de l'ensemble des mitochondries, ce qui peut expliquer la réduction globale de la respiration cellulaire. Cette réorganisation semble également induire une réduction de la plasticité mitochondriale. Hors la plasticité mitochondriale et l'autophagie sont des éléments étroitement liés pour assurer l'homéostasie. Ils permettent de répondre aux changements de l'environnement cellulaire comme la demande énergétique, l'apport nutritif et le stress. Aussi, une défaillance dans la plasticité, comme semble nous l'indiquer nos résultats, peut simultanément affecter l'autophagie, ce qui résulte en une augmentation du risque de développement de nombreuses pathologies humaines (Okamoto et Kondo-Okamoto, 2012). Ce peptide correspond donc bien à une séquence contenue dans le site d'interaction du cytosquelette avec la mitochondrie. L'internalisation de NFL-TBS.40-63 dépolymérise le réseau de tubuline ce qui a pour conséquence de rompre les connexions entre le réseau de microtubules et celui de mitochondries. Ceci entraîne une agglutination des mitochondries, ce qui peut limiter la surface de contact entre la membrane mitochondriale et le cytosol et ainsi réduire la diffusion des métabolites au travers de cette dernière, voir conduire à des phénomènes de mitophagie. De plus, le peptide pénètre dans la cellule de manière polarisée et est capable de se fixer aux extrémités des microtubules. Cette liaison semble induire une destruction des filopodes, entraînant de fait une réduction des mouvements cellulaires. Il serait donc intéressant de réaliser des tests afin de mesurer l'effet réel de plusieurs concentrations du peptide sur la vitesse de déplacement de plusieurs lignées cellulaires de neurones comparativement à d'autres types cellulaires contrôles.

Le traitement induit donc une diminution rapide de l'expression de Fis-1 et Mnf-2, respectivement impliqués dans la fission et la fusion mitochondriales, processus par lesquels la cellule s'adapte aux stress. La fusion aide la cellule en situation de stress cellulaire mineur en fusionnant les composants de mitochondries partiellement endommagées afin de former un organe fonctionnel. La fission, quant à elle, doit permettre la création de nouvelles mitochondries, mais

également contribuer à la suppression de mitochondries endommagées voir faciliter l'apoptose en cas de hauts niveaux de stress cellulaire. Une perturbation de ces processus affecte le développement normal de la cellule, et est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Westermann, 2010). Cette dérégulation de la dynamique mitochondriale est également associée à des altérations dans l'organisation du réseau de mitochondries et dans l'inhibition du métabolisme énergétique (Pich *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que le traitement, a un effet sur l'expression de quelques miARNs, dont miR-21 et miR-221 comparativement au Scramble. Tous deux sont impliqués dans le développement du glioblastome avec des propriétés anti-apoptotique et d'induction de la prolifération (Kim *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Karsy *et al.*, 2012). Dans certains cancers humains, les niveaux de miR-21 sont significativement augmentés et induisent une régulation négative de l'expression de PTEN (Zhang *et al.*, 2010). Il est à noter que PTEN régule PINK1 qui est impliqué dans la voie de la mitophagie. Une surexpression de miR-221 est également corrélée avec la régulation négative de l'homologue à la survivine-1 BIRC1 (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 1*), impliquée dans la neurodégénération et la régulation de l'apoptose (Lukiw *et al.*, 2009). L'injection d'inhibiteurs de miR-21 a conduit à une sensibilisation de la cellule au Paclitaxel, qui est l'un des traitements actuels du glioblastome. Hors, l'équipe a montré que le peptide NFL-TBS.40-63 lorsqu'il est exprimé à la surface de nanocapsules lipidiques contenant du Paclitaxel permet un adressage spécifique aux cellules de glioblastomes *in vivo* (Balzeau *et al.*, 2013).

En conclusion, nous avons identifié douze miARNs directement régulés par PRC dont cinq sont impliqués dans la régulation de la fonction OXPHOS. MiR-218 ne représente qu'une fraction de la boucle de rétrocontrôle régulant cette voie métabolique par modification du ratio PRC/PGC-1 α . A ce jour, cela constitue les seuls résultats sur le rôle joué par ce miARN dans le contrôle des fonctions mitochondriales PRC-dépendantes de tumeurs au métabolisme oxydatif. Nos résultats ont montré

que PRC coopère avec plusieurs miARNs afin d'assurer une régulation efficace de la fonction OXPHOS. Ceci confirme la relation étroite que l'on peut trouver entre les voies transcriptionnelles et post-transcriptionnelles pour le contrôle des activités métaboliques d'une cellule et *a fortiori* d'un organisme. Cependant, d'autres recherches doivent être entreprises, notamment sur le rôle combiné de miR-218 et PRC dans le contrôle de la prolifération ainsi que préciser l'implication de miR-494 dans cette fameuse boucle de rétrocontrôle. Ces études permettraient d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la thérapie anti-cancéreuse ou du moins dans le cadre diagnostique et pronostique de tumeurs ayant des mitochondries fonctionnelles. Outre les applications thérapeutiques, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle et comment les miARNs fonctionnent de concert. Pour ceci, nous pourrions combiner la répression de plusieurs miARNs simultanément et de mesurer l'impact au niveau post-transcriptionnel et fonctionnel. Une autre approche a été avancée récemment, à savoir étudier la demi-vie des miARNs afin d'en étudier la stabilité au cours du temps. Les premiers résultats semblent indiquer que ces-derniers représentent des molécules stables. Il serait donc intéressant d'étudier la demi-vie des miARNs d'intérêt identifiés dans notre modèle d'oncocytose thyroïdienne. Plusieurs techniques pour évaluer ces demi-vies ont été évoquées, l'inhibition transcriptionnelle de l'ARN polyA par α -amanitine et le marquage à la 4-thio-uridine (4sU) suivi d'une quantification par puces à miARN. Nous avons également démontré, l'étroite interconnexion entre le cytosquelette et la mitochondrie avec un effet très rapide de la destruction du cytosquelette sur la respiration cellulaire par le peptide NFL-TBS.40-63. La cellule ne peut activer ces mécanismes de compensation ce qui conduit à l'induction de la mort de la cellule par apoptose. Les interactions avec le cytosquelette sont donc importantes pour le maintien d'une fonction OXPHOS adaptée. Cependant, d'autres expériences doivent être réalisées afin de clairement élucider les mécanismes de régulation post-

transcriptionnelle par miARNs et impliqués dans le contrôle de l'autophagie et la mitophagie. Aussi, des études transcriptomiques, par puces à ARNm et à miARNs après traitements des cellules par différentes concentrations de peptide, sont en cours de préparation. Nous pouvons également regarder l'état de phosphorylation des protéines, ce qui constituera un autre mode de régulation post-transcriptionnelle que nous n'avons pour l'instant pas approché. Si nous poussons nos recherches, il sera possible d'utiliser nos connaissances sur la régulation post-transcriptionnelle par les miARNs de l'activité mitochondriale et la prolifération cellulaire combinées aux avancées effectuées par l'équipe sur le ciblage spécifique des cellules de glioblastomes par des nanocapsules contenant du Paclitaxel en évitant au maximum les cellules saines, ce qui constituerait une avancée dans le traitement de ce cancer dont la médiane de survie après dépistage n'excède pas les deux ans.

Références bibliographiques

Amchenkova AA; Bakeeva LE; Chentsov YS; Skulachev VP; Zorov DB. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 107, 481-495. 1988.

Ameres SL; Martinez J; Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell.* 130, 101-112. 2007.

Anand S; Majeti BK; Acevedo LM; Murphy EA; Mukthavaram R; Schepke L; Huang M; Shields DJ; Lindquist JN; Lapinski PE; King PD; Weis SM; Cheresh DA. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med.* 16, 909-914. 2010.

Andersson U; Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 21, 3738-3749. 2001.

Anesti V; Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 692-699. 2006.

Aoi W; Naito Y; Mizushima K; Takamami Y; Kawai Y; Ichikawa H; Yoshikawa T. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298, 799-806. 2010.

Arany Z; Lebrasseur N; Morris C; Smith E; Yang W; Ma Y; Chin S; Spiegelman BM. The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab.* 5, 35-46. 2007.

Aroor AR; Mandavia C; Ren J; Sowers JR; Pulakat L. Mitochondria and Oxidative Stress in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Cardiorenal Med.* 2, 87-109. 2012.

Asa SL. The pathology of thyroid cancer. *Cancer Treat Res.* 2004, 23-67. 2004.

Asangani IA; Rasheed SA; Nikolova DA; Leupold JH; Colburn NH; Post S; Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 27, 2128-2136. 2008.

Aschrafi A; Schwechter AD; Mameza MG; Natera-Naranjo O; Gioio AE; Kaplan BB. MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *J Neurosci.* 28, 12581-12590. 2008.

Azuma-Mukai A; Oguri H; Mituyama T; Qian ZR; Asai K; Siomi H; Siomi MC. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 7964-7969. 2008.

Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* 3, 120. 2012.

Balzeau J; Pinier M; Berges R; Saulnier P; Benoit JP; Eyer J. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials.* 34, 3381-3389. 2013.

Bandiera S; Rüberg S; Girard M; Cagnard N; Hanein S; Chrétien D; Munnich A; Lyonnet S; Henrion-Caude A. Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One.* 6, e20746. 2011.

Bandiera S; Matégot R; Girard M; Demongeot J; Henrion-Caude A. MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria. *Free Radic Biol Med.* S0891-5849(13)00294-3. 2013.

Bandrés E; Cubedo E; Agirre X; Malumbres R; Zárata R; Ramirez N; Abajo A; Navarro A; Moreno I; Monzó M; García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer.* 5, 29. 2006.

Bao S; Ouyang G; Huang Z; Ma C; Liu M; Shao R; Anderson RM; Rich JN; Wang XF. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* 5, 329-339. 2004.

Baris O; Savagner F; Nasser V; Loriod B; Granjeaud S; Guyetant S; Franc B; Rodien P; Rohmer V; Bertucci F; Birnbaum D; Malthiery Y; Reynier P; Houlgatte R. Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 994-1005. 2004.

Barrey E; Saint-Auret G; Bonnamy B; Damas D; Boyer O; Gidrol X. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One.* 6, e20220. 2011.

Basu A; Lenka N; Mullick J; Avadhani NG. Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during myogenesis. Role of a YY-1 factor-binding negative enhancer. *J Biol Chem.* 272, 5899-5908. 1997.

Batista PJ; Ruby JG; Claycomb JM; Chiang R; Fahlgren N; Kasschau KD; Chaves DA; Gu W; Vasale JJ; Duan S; Conte D Jr; Luo S; Schroth GP; Carrington JC; Bartel DP; Mello CC. PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*. *Mol Cell.* 31, 67-78. 2008.

Baysal BE. Mitochondrial complex II and genomic imprinting in inheritance of paraganglioma tumors. *Biochim Biophys Acta.* 1827, 573-577. 2013.

Behm-Ansmant I; Rehwinkel J; Doerks T; Stark A; Bork P; Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885-1898. 2006.

Benard G; Faustin B; Passerieux E; Galinier A; Rocher C; Bellance N; Delage JP; Casteilla L; Letellier T; Rossignol R. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291, 1172-1182. 2006.

Benetti R; Gonzalo S; Jaco I; Muñoz P; Gonzalez S; Schoeftner S; Murchison E; Andl T; Chen T; Klatt P; Li E; Serrano M; Millar S; Hannon G; Blasco MA. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol.* 15, 268-279. 2008.

Berges R; Balzeau J; Takahashi M; Prevost C; Eyer J. Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit. *PLoS One.* 7, e49436. 2012.

Bian Z; Li LM; Tang R; Hou DX; Chen X; Zhang CY; Zen K. Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. *Cell Res.* 20, 1076-1078. 2010.

Blackwood EM; Kretzner L; Eisenman RN. Myc and Max function as a nucleoprotein complex. *Curr Opin Genet Dev.* 2, 227-235. 1992.

Blakely EL; Mitchell AL; Fisher N; Meunier B; Nijtmans LG; Schaefer AM; Jackson MJ; Turnbull DM; Taylor RW. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J.* 272, 3583-3592. 2005.

Block ML. NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 9 Suppl 2, 8. 2008.

Bocquet A; Berges R; Frank R; Robert P; Peterson AC; Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci.* 29, 11043-11054. 2009.

Bohnsack MT; Regener K; Schwappach B; Saffrich R; Paraskeva E; Hartmann E; Görlich D. Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J.* 21, 6205-6215. 2002.

Bommer GT; Gerin I; Feng Y; Kaczorowski AJ; Kuick R; Love RE; Zhai Y; Giordano TJ; Qin ZS; Moore BB; MacDougald OA; Cho KR; Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol.* 17, 1298-1307. 2007.

Boominathan L. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One.* 5, e10615. 2010.

Borchert GM; Lanier W; Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 1097-1101. 2006.

Boyerinas B; Park SM; Murmann AE; Gwin K; Montag AG; Zillhardt M; Hua YJ; Lengyel E; Peter ME. Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1. *Int J Cancer.* 130, 1787-1797. 2012.

Bracken CP; Gregory PA; Khew-Goodall Y; Goodall GJ. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci.* 66, 1682-1699. 2009.

Brahimi-Horn C; Berra E; Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol.* 11, 32-36. 2001.

Buchan JR; Parker R. Molecular biology. The two faces of miRNA. *Science.* 318, 1877-1878. 2007.

Budman DR. Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Invest.* 15, 475-490. 1997.

Bueno MJ; Pérez de Castro I; Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle.* 7, 3143-3148. 2008.

Burkart EM; Sambandam N; Han X; Gross RW; Courtois M; Gierasch CM; Shoghi K; Welch MJ; Kelly DP. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest.* 117, 3930-3939. 2007.

Busaidy NL; Cabanillas ME. Differentiated thyroid cancer: management of patients with radioiodine nonresponsive disease. *J Thyroid Res.* 618985. 2012.

Bustamante E; Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 3735-3739. 1977.

Bustamante E; Morris HP; Pedersen PL. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256, 8699-8704. 1981.

Cagalinec M; Safiulina D; Liiv M; Liiv J; Choubey V; Wareski P; Veksler V; Kaasik A. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *J Cell Sci.* 126, 2187-2197. 2013.

Cairns RA; Harris IS; Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 11, 85-95. 2011.

Calin GA; Dumitru CD; Shimizu M; Bichi R; Zupo S; Noch E; Aldler H; Rattan S; Keating M; Rai K; Rassenti L; Kipps T; Negrini M; Bullrich F; Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 15524-15529. 2002.

Calin GA; Sevignani C; Dumitru CD; Hyslop T; Noch E; Yendamuri S; Shimizu M; Rattan S; Bullrich F; Negrini M; Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2999-3004. 2004.

Calin GA; Sevignani C; Dumitru CD; Hyslop T; Noch E; Yendamuri S; Shimizu M; Rattan S; Bullrich F; Negrini M; Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2999-3004. 2005.

Calin GA; Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 6, 857-866. 2006.

Calin GA.; Pekarsky Y; Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20, 425-437. 2007.

Calvo SE; Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 11, 25-44. 2010.

Cam H; Balciunaite E; Blais A; Spektor A; Scarpulla RC; Young R; Kluger Y; Dynlacht BD. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell.* 16, 399-411. 2004.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 120, 513-522. 2005.

Candé C.; Vahsen N; Métivier D; Tourrière H; Chebli K; Garrido C; Tazi J; Kroemer G. Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J Cell Sci.* 117, 4461-4468. 2004.

Cannon B; Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004, 277-359. 2004.

Cao W; Daniel KW; Robidoux J; Puigserver P; Medvedev AV; Bai X; Floering LM; Spiegelman BM; Collins S. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol.* 24, 3057-3067. 2004.

Carrer M; Liu N; Grueter CE; Williams AH; Frisard MI; Hulver MW; Bassel-Duby R; Olson EN. Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 15330-15335. 2012.

Chambers AF; Groom AC; MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2, 563-572. 2002.

Chan JA; Krichevsky AM; Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65, 6029-6033. 2005.

Chang KH; Mestdagh P; Vandesompele J; Kerin MJ; Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 10, 173. 2010.

- Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med.* 353, 1768-1771. 2005.
- Chen H; Chen Q; Fang M; Mi Y. microRNA-181b targets MLK2 in HL-60 cells. *Sci China Life Sci.* 53, 101-106. 2010.
- Chen K; Song F; Calin GA; Wei Q; Hao X; Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis.* 29, 1306-1311. 2008.
- Chen L; Zhan J; Han L; Zhang A; Zhan C; Zheng Y; Jiang T; Jiang C; Kang C. Downregulation of miR-221/222 sensitizes glioma cells to temozolomide by regulating apoptosis independently of p53 status. *Oncology Reports.* 27, 854-860. 2012
- Chendrimada TP; Gregory RI; Kumaraswamy E; Norman J; Cooch N; Nishikura K; Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436, 740-744. 2005.
- Cheng AM; Byrom MW; Shelton J; Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 33, 1290-1297. 2005.
- Chiou GY; Cherng JY; Hsu HS; Wang ML; Tsai CM; Lu KH; Chien Y; Hung SC; Chen YW; Wong CI; Tseng LM; Huang PI; Yu CC; Hsu WH; Chiou SH. Cationic polyurethanes-short branch PEI-mediated delivery of Mir145 inhibited epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cancer stem-like properties and in lung adenocarcinoma. *J Control Release.* 159, 240-250. 2012.
- Ciafrè SA; Galardi S; Mangiola A; Ferracin M; Liu CG; Sabatino G; Negrini M; Maira G; Croce CM; Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 334, 1351-1358. 2005.
- Cimmino A; Calin G; Fabbri; Iorio M; Ferracin; Shimizu; Wojcik S; Aqeilan R; Zupo; Dono; Rassenti; Alder; Volinia; Liu C; Kipps T; Negrini; Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 13944-13949. 2005.
- Cochrane DR; Howe EN; Spoelstra NS; Richer JK. Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers. *J Oncol.* 2010:821717. 2010.
- Costa PM, Cardoso AL, No'breaga C, Pereira de Almeida LF, Bruce JN, Peter Canoll, Pedrosa de Lima MC. MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. *Human Molecular Genetics.* 22, 904-918. 2013.
- Costinean S; Zanesi N; Pekarsky Y; Tili E; Volinia S; Heerema N; Croce CM. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 7024-7029. 2006.

Cotney J; Shadel GS. Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *J Mol Evol.* 63, 707-717. 2006.

Craig VJ; Cogliatti SB; Imig J; Renner C; Neuenschwander S; Rehrauer H; Schlapbach R; Dirnhofer S; Tzankov A; Müller A. Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FoxP1. *Blood.* 117, 6227-6236. 2011.

Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 358, 502-511. 2008.

Cunningham JT; , R. J.; Arlow DH; Vazquez F; Mootha VK; Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature.* 450, 736-740. 2007.

Dairaghi DJ; Shadel GS; Clayton DA. Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol.* 249, 11-28. 1995.

Dairaghi DJ; Shadel GS; Clayton DA. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta.* 1271, 127-134. 1995.

Dang L; Jin S; Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* 16, 387-397. 2010.

Das S; Ferlito M; Kent OA; Fox-Talbot K; Wang R; Liu D; Raghavachari N; Yang Y; Wheelan SJ; Murphy E; Steenbergen C. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circ Res.* 110, 1596-1603. 2012.

de la Chapelle A; Jazdzewski K. MicroRNAs in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 96, 3326-3336. 2011.

Dettmer M; Vogetseder A; Durso MB; Moch H; Komminoth P; Perren A; Nikiforov YE; Nikiforova MN. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 98, 1-7. 2013.

Dhar SS; Ongwijitwat S; Wong-Riley MT. Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J Biol Chem.* 283, 3120-3129. 2008.

Donohoe ME; Zhang X; McGinnis L; Biggers J; Li E; Shi Y. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol.* 19, 7237-7244. 1999.

Döhner H; Stilgenbauer S; Benner A; Leupolt E; Kröber A; Bullinger L; Döhner K; Bentz M; Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343, 1910-1916. 2000.

Dudkina NV; Eubel H; Keegstra W; Boekema EJ; Braun HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3225-3229. 2005.

Dudkina NV; Sunderhaus S; Boekema EJ; Braun HP. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr.* 40, 419-424. 2008.

Dudkina NV; Kouril R; Peters K; Braun HP; Boekema EJ. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta.* 1797, 664-670. 2010.

Dudkina NV; Kouril R; Peters K; Braun HP; Boekema EJ. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta.* 2010 1797, 664-670. 2010.

Dumontet C; Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol.* 17, 1061-1070. 1999.

Dumontet C; Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 790-803. 2010.

Eis PS; Tam W; Sun L; Chadburn A; Li Z; Gomez MF; Lund E; Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3627-3632. 2005.

Elliott RL; Globe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 23, 2078-2093. 2005.

Ender C; Krek A; Friedländer MR; Beitzinger M; Weinmann L; Chen W; Pfeffer S; Rajewsky N; Meister G. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell.* 32, 519-528. 2008.

Ernoul-Lange M; Bénard M; Kress M; Weil D. P-bodies and mitochondria: which place in RNA interference? *Biochimie.* 94, 1572-1577. 2012.

Erol A. Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med Hypotheses.* 65, 525-529. 2005.

Esterbauer H; Oberkofler H; Krempler F; Patsch W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics.* 62, 98-102. 1999.

Eubel H; Jänsch L; Braun HP. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 133, 274-286. 2003.

Eubel H; Heinemeyer J; Sunderhaus S; Braun HP. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem.* 42, 937-942. 2004.

Eulalio A; Huntzinger E; Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 132, 9-14. 2008.

Evans MJ; Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev*. 4, 1023-1034. 1990.

Evans MJ, S. R. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*. 264, 14361-14368. 1989.

Evans RM; Barish GD; Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 10, 355-361. 2004.

Evans SC; Kourtidis A; Markham TS; Miller J; Conklin DS; Torres AS. MicroRNA target detection and analysis for genes related to breast cancer using MDLcompress. *EURASIP J Bioinform Syst Biol*. 43670. 2007.

Fabbri M; Garzon R; Cimmino A; Liu Z; Zanesi N; Callegari E; Liu S; Alder H; Costinean S; Fernandez-Cymering C; Volinia S; Guler G; Morrison CD; Chan KK; Marcucci G; Calin GA; Huebner K; Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 15805-15810. 2007.

Falkenberg M; Gaspari M; Rantanen A; Trifunovic A; Larsson NG; Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*. 31, 289-294. 2002.

Falkenberg M; Larsson NG; Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 76, 679-699. 2007.

Feng B; Wang R; Chen LB. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. *Cancer Lett*. 317, 184-191. 2012.

Feng F; Wang H; Fu H; Wu S; Ye Z; Chen S; Li J. Dedifferentiation of differentiated thyroid carcinoma cell line FTC-133 is enhanced by 131I pretreatment. *Nucl Med Biol*. 38, 1053-1058. 2011.

Fernández-Vizarra E; Tiranti V; Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta*. 1793, 200-211. 2009.

Filipowicz W; Bhattacharyya SN; Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 9, 102-114. 2008.

Fire A; Xu S; Montgomery MK; Kostas SA; Driver SE; Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 806-811. 1998.

Fontana L; Fiori ME; Albini S; Cifaldi L; Giovinazzi S; Forloni M; Boldrini R; Donfrancesco A; Federici V; Giacomini P; Peschle C; Fruci D. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*. 3, e2236. 2008.

Förstemann K; Horwich MD; Wee L; Tomari Y; Zamore PD. Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell*. 130, 287-297. 2007.

Frank S; Gaume B; Bergmann-Leitner ES; Leitner WW; Robert EG; Catez F; Smith CL; Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 1, 515-525. 2001.

Frankel LB; Christoffersen NR; Jacobsen A; Lindow M; Krogh A; Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 283, 1026-1033. 2008.

Freyssenet D; Irrcher I; Connor MK; Di Carlo M; Hood DA. Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286, 1053-1061. 2004.

Gao P; Tchernyshyov I; Chang TC; Lee YS; Kita K; Ochi T; Zeller KI; De Marzo AM; Van Eyk JE; Mendell JT; Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 458, 762-765. 2009.

Gao P; Sun L; He X; Cao Y; Zhang H. MicroRNAs and the Warburg Effect: new players in an old arena. *Curr Gene Ther*. 12, 285-291. 2012.

Garcion E; Lamprecht A; Heurtault B; Paillard A; Aubert-Pouessel A; Denizot B; Menei P; Benoît JP. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther*. 5, 1710-1722. 2006.

Garzon R; Volinia S; Liu CG; Fernandez-Cymering C; Palumbo T; Pichiorri F; Fabbri M; Coombes K; Alder H; Nakamura T; Flomenberg N; Marcucci G; Calin GA; Kornblau SM; Kantarjian H; Bloomfield CD; Andreeff M; Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 111, 3183-3189. 2008.

Gentil BJ; Minotti S; Beange M; Baloh RH; Julien JP; Durham HD. Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *FASEB J*. 26, 1194-1203. 2012.

George GP; Mittal RD. MicroRNAs: Potential biomarkers in cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2010, 4-14. 2010.

Gerhart-Hines Z; Rodgers JT; Bare O; Lerin C; Kim SH; Mostoslavsky R; Alt FW; Wu Z; Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J*. 26, 1913-1923. 2007.

Gerhart-Hines Z; Rodgers JT; Bare O; Lerin C; Kim SH; Mostoslavsky R; Alt FW; Wu Z; Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J.* 26, 1913-1923. 2013.

Giguère V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev.* 29, 677-696. 2008.

Gleyzer N; Vercauteren K; Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 25, 1354-1366. 2005.

Gleyzer N; Scarpulla RC. Activation of a PGC-1-related coactivator (PRC)-dependent inflammatory stress program linked to apoptosis and premature senescence. *J Biol Chem.* 288, 8004-8015. 2013.

Glinsky GV. An SNP-guided microRNA map of fifteen common human disorders identifies a consensus disease phenocode aiming at principal components of the nuclear import pathway. *Cell Cycle.* 7, 2570-2583. 2008.

Godlewski J; Nowicki MO; Bronisz A; Williams S; Otsuki A; Nuovo G; Raychaudhury A; Newton HB; Chiocca EA; Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 68, 9125-9130. 2008.

Gordan JD; Thompson CB; Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 12, 108-113. 2007.

Gottesman S. Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches. *Genes Dev.* 16, 2829-2842. 2002.

Gottlieb E; Tomlinson IP. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer.* 5, 857-866. 2005.

Gottwein E; Cai X; Cullen BR. A novel assay for viral microRNA function identifies a single nucleotide polymorphism that affects Drosha processing. *J Virol.* 80, 5321-5326. 2006.

Grace SC. Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria. *Life Sci.* 47, 1875-1886. 1990.

Gramantieri L; Fornari F; Callegari E; Sabbioni S; Lanza G; Croce CM; Bolondi L; Negrini M. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med.* 12, 2189-2204. 2008.

Gregory RI; Yan KP; Amuthan G; Chendrimada T; Doratotaj B; Cooch N; Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432, 235-240. 2004.

Greschik H; Wurtz JM; Sanglier S; Bourguet W; van Dorsselaer A; Moras D; Renaud JP. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell.* 9, 303-313. 2002.

Guan Y; Mizoguchi M; Yoshimoto K; Hata N; Shono T; Suzuki SO; Araki Y; Kuga D; Nakamizo A; Amano T; Ma X; Hayashi K; Sasaki T. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 16, 4289-4297. 2010.

Gwak HS; Kim TH; Jo GH; Kim YJ; Kwak HJ; Kim JH; Yin J; Yoo H; Lee SH; Park JB. Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. *PLoS One.* 7, e47449. 2012.

Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol.* 30, 269-297. 1966.

Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol.* 37, 345-369. 1968.

Hackenbrock CR; Rehn TG; Weinbach EC; Lemasters JJ. Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. *J Cell Biol.* 51, 123-137. 1971.

Hackenbrock CR; Chazotte B; Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr.* 18, 331-368. 1986.

Han J; Lee Y; Yeom KH; Kim YK; Jin H; Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016-3027. 2004.

Han J; Lee Y; Yeom KH; Nam JW; Heo I; Rhee JK; Sohn SY; Cho Y; Zhang BT; Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 125, 887-901. 2006.

Han J; Pedersen JS; Kwon SC; Belair CD; Kim YK; Yeom KH; Yang WY; Haussler D; Blelloch R; Kim VN. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell.* 136, 75-84. 2009.

Hanahan D; Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70. 2000.

Hanahan D, W. RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70. 2000.

Hao HX; Khalimonchuk O; Schraders M; Dephoure N; Bayley JP; Kunst H; Devilee P; Cremers CW; Schiffman JD; Bentz BG; Gygi SP; Winge DR; Kremer H; Rutter J. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science.* 325, 1139-1142. 2009.

Hatzivassiliou G; Zhao F; Bauer DE; Andreadis C; Shaw AN; Dhanak D; Hingorani SR; Tuveson DA; Thompson CB. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 8, 311-321. 2005.

He L; Thomson JM; Hemann MT; Hernando-Monge E; Mu D; Goodson S; Powers S; Cordon-Cardo C; Lowe SW; Hannon GJ; Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435, 828-833. 2005.

He H; Jazdzewski K; Li W; Liyanarachchi S; Nagy R; Volinia S; Calin GA; Liu CG; Franssila K; Suster S; Kloos RT; Croce CM; de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 19075-19080. 2005.

He X; He L; Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res*. 67, 11099-11101. 2007.

Henry JC; Azevedo-Pouly AC; Schmittgen TD. MicroRNA replacement therapy for cancer. *Pharm Res*. 28, 3030-3042. 2011.

Herrmann JM; Riemer J. The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 13, 1341-1358. 2010.

Herzig S; Long F; Jhala US; Hedrick S; Quinn R; Bauer A; Rudolph D; Schutz G; Yoon C; Puigserver P; Spiegelman B; Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 413, 179-183. 2001.

Heurtault B; Saulnier P; Pech B; Proust JE; Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res*. 19, 875-880. 2002.

Hirayama A; Kami K; Sugimoto M; Sugawara M; Toki N; Onozuka H; Kinoshita T; Saito N; Ochiai A; Tomita M; Esumi H; Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res*. 69, 4918-4925. 2009.

Hock MB; Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol*. 71, 177-203. 2009.

Hon LS; Zhang Z. The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol*. 8, R166. 2007.

Hotto AM; Schmitz RJ; Fei Z; Ecker JR; Stern DB. Unexpected Diversity of Chloroplast Noncoding RNAs as Revealed by Deep Sequencing of the Arabidopsis Transcriptome. *G3 (Bethesda)*. 1, 559-570. 2011.

Hörling T; Zielke A; Siperstein AE; Clark OH; Duh QY. Transforming growth factor-beta 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 79, 806-813. 1994.

Hu W; Zhang C; Wu R; Sun Y; Levine A; Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 7455-7460. 2010.

Hua Z; Lv Q; Ye W; Wong CK; Cai G; Gu D; Ji Y; Zhao C; Wang J; Yang BB; Zhang Y. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One.* 1, e116. 2006.

Huang L; Mollet S; Souquere S; Le Roy F; Ernoult-Lange M; Pierron G; Dautry F; Weil D. Mitochondria associate with P-bodies and modulate microRNA-mediated RNA interference. *J Biol Chem.* 286, 24219-24230. 2011.

Huss JM; Kopp RP; Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem.* 277, 40265-40274. 2002.

Huynh C; Segura MF; Gazieli-Sovran A; Menendez S; Darvishian F; Chiriboga L; Levin B; Meruelo D; Osman I; Zavadil J; Marcusson EG; Hernando E. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene.* 30, 1481-1488. 2011.

Iliopoulos D; Jaeger SA; Hirsch HA; Bulyk ML; Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.* 39, 493-506. 2010.

Iorio MV; Ferracin M; Liu CG; Veronese A; Spizzo R; Sabbioni S; Magri E; Pedriali M; Fabbri M; Campiglio M; Ménard S; Palazzo JP; Rosenberg A; Musiani P; Volinia S; Nenci I; Calin GA; Querzoli P; Negrini M; Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65, 7065-7070. 2005.

Iorio MV; Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J.* 18, 215-222. 2011.

Ishikawa K; Koshikawa N; Takenaga K; Nakada K; Hayashi J. Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion.* 2008 8, 339-344. 2008.

Iwasaki S; Kawamata T; Tomari Y. *Drosophila argonaute1* and *argonaute2* employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell.* 34, 58-67. 2009.

Jacques C; Guillotin D; Fontaine JF; Franc B; Mirebeau-Prunier D; Fleury A; Malthiery Y; Savagner F. DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 98, 981-989. 2013.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 307, 58-62. 2005.

Jazdzewski K; Murray EL; Franssila K; Jarzab B; Schoenberg DR; de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 7269-7274. 2008.

Jazdzewski K; Liyanarachchi S; Swierniak M; Pachucki J; Ringel MD; Jarzab B; de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 1502-1505. 2009.

Jäger S; Handschin C; St-Pierre J; Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 12017-12022. 2007.

Jeon TI; Park JW; Ahn J; Jung CH; Ha TY. Fisetin protects against hepatosteatosis in mice by inhibiting miR-378. *Mol Nutr Food Res.* 2013.

Jeong H; Kim YR; Kim KN; Choe JG; Chung JK; Kim MK. Effect of all-trans retinoic acid on sodium/iodide symporter expression, radioiodine uptake and gene expression profiles in a human anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Nucl Med Biol.* 33, 875-882. 2006.

Johnson CD; Esquela-Kerscher A; Stefani G; Byrom M; Kelnar K; Ovcharenko D; Wilson M; Wang X; Shelton J; Shingara J; Chin L; Brown D; Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67, 7713-7722. 2007.

Johnson RF; Perkins ND. Nuclear factor- κ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends Biochem Sci.* 37, 317-324. 2012.

Johnson SM; Grosshans H; Shingara J; Byrom M; Jarvis R; Cheng A; Labourier E; Reinert KL; Brown D; Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 120, 635-647. 2005.

Jonas SK; Benedetto C; Flatman A; Hammond RH; Micheletti L; Riley C; Riley PA; Spargo DJ; Zonca M; Slater TF. Increased activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in purified cell suspensions and single cells from the uterine cervix in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 66, 185-191. 1992.

Jornayvaz FR; Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47, 69-84. 2010.

Kallen J; Schlaeppi JM; Bitsch F; Filipuzzi I; Schilb A; Riou V; Graham A; Strauss A; Geiser M; Fournier B. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem.* 279, 49330-49337. 2004.

Kanakkanthara A; Northcote PT; Miller JH. β II-tubulin and β III-tubulin mediate sensitivity to peloruside A and laulimalide, but not paclitaxel or vinblastine, in human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 11, 393-404. 2012.

Kanakkanthara A; Miller JH. MicroRNAs: novel mediators of resistance to microtubule-targeting agents. *Cancer Treat Rev.* 39, 161-170. 2013.

Kanakkanthara A; Teesdale-Spittle PH; Miller JH. Cytoskeletal Alterations that Confer Resistance to Anti-tubulin Chemotherapeutics. *Anticancer Agents Med Chem.* 13, 147-158. 2013.

Karsy M, Arslan E, Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer.* 3, 3-15. 2012.

Kasinski AL.; Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 11, 849-864. 2011.

Kastl L; Brown I; Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 131, 445-454. 2012.

Katsetos CD; Dráberová E; Smejkalová B; Reddy G; Bertrand L; de Chadarevian JP; Legido A; Nissanov J; Baas PW; Dráber P. Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells. *Neurochem Res.* 32, 1387-1398. 2007.

Kawamura Y; Saito K; Kin T; Ono Y; Asai K; Sunohara T; Okada TN; Siomi MC; Siomi H. Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature.* 453, 793-797. 2008.

Kawauchi K; Araki K; Tobiume K; Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 10, 611-618. 2008.

Kertesz M; Iovino N; Unnerstall U; Gaul U; Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet.* 39, 1278-1284. 2007.

Ketting RF; Fischer SE; Bernstein E; Sijen T; Hannon GJ; Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659. 2001.

Kim D; Song J; Kim S; Park HM; Chun CH; Sonn J; Jin EJ. MicroRNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/Rac1 cross-talk in chondroblasts. *J Biol Chem.* 287, 12509-12501. 2012.

Kim DH; Saetrom P; Snøve O Jr; Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 16230-16235. 2008.

Kim HJ; Cui XS; Kim EJ; Kim WJ; Kim NH. New porcine microRNA genes found by homology search. *Genome*. 49, 1283-1286. 2006.

Kim HJ, Kim YH, Lee DS, Chung JK, Kim S. In vivo imaging of functional targeting of miR-221 in papillary thyroid carcinoma. *J Nucl Med*. 49, 1686-1693. 2008.

Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004, 156-159. 2004.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 376-385. 2005.

Kim VN; Han J; Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 129-139. 2009.

Kim YK; Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 26, 775-783. 2007.

King A; Selak MA; Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 25, 4675-4682. 2006.

Kita K; Takamiya S. Electron-transfer complexes in *Ascaris* mitochondria. *Adv Parasitol*. 51, 95-131. 2013.

Kluiver J; Poppema S; de Jong D; Blokzijl T; Harms G; Jacobs S; Kroesen BJ; van den Berg A. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. 207, 243-249. 2005.

Kondoh H; Leonart ME; Gil J; Wang J; Degan P; Peters G; Martinez D; Carnero A; Beach D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res*. 65, 177-185. 2005.

Kops GJ. The kinetochore and spindle checkpoint in mammals. *Front Biosci*. 13, 3606-3620. 2008.

Kozomara A; Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 39, 152-157. 2011.

Kraft CS; LeMoine CM; Lyons CN; Michaud D; Mueller CR; Moyes CD. Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290, 1119-1127. 2006.

Kren BT; Wong PY; Sarver A; Zhang X; Zeng Y; Steer CJ. MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol*. 6, 65-72. 2009.

Kressler D; Schreiber SN; Knutti D; Kralli A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 277, 13918-13925. 2002.

Kuehbacher A; Urbich C; Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 29, 12-15. 2008.

Kumar MS; Lu J; Mercer KL; Golub TR; Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 39, 673-677. 2007.

Lal A; Kim HH; Abdelmohsen K; Kuwano Y; Pullmann R Jr; Srikantan S; Subrahmanyam R; Martindale JL; Yang X; Ahmed F; Navarro F; Dykxhoorn D; Lieberman J; Gorospe M. p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS One.* 3, e1864. 2008.

Lammers T; Hennink WE; Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer.* 99, 392-397. 2008.

Lawrie CH. MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy? *J Cell Mol Med.* 12, 1432-1444. 2008.

Le A; Cooper CR; Gouw AM; Dinavahi R; Maitra A; Deck LM; Royer RE; Vander Jagt DL; Semenza GL; Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 2037-2042. 2010.

Lee DY; Deng Z; Wang CH; Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 20350-20355. 2007.

Lee RC; Feinbaum RL; Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843-854. 1993.

Lee RC; Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294, 862-864. 2001.

Lee Y; Jeon K; Lee JT; Kim S; Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663-4670. 2002.

Lee Y; Ahn C; Han J; Choi H; Kim J; Yim J; Lee J; Provost P; Rådmark O; Kim S; Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425, 415-429. 2003.

Lee Y; Kim M; Han J; Yeom KH; Lee S; Baek SH; Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051-4060. 2004.

Lee Y; Hur I; Park SY; Kim YK; Suh MR; Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522-532. 2006.

Lee YS; Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025-1030. 2007.

Lee YS; Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 4, 199-227. 2009.

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.* 106, 847-856. 2000.

Leone V; D'Angelo D; Rubio I; de Freitas PM; Federico A; Colamaio M; Pallante P; Medeiros-Neto G; Fusco A. MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha. *J Clin Endocrinol Metab.* 96, 1388-1398. 2011.

Levine AJ; Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science.* 330, 1340-1344. 2010.

Lewis BP; Burge CB; Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120, 15-20. 2005.

Lépinoux-Chambaud C; Eyer J. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm.* S0378-5173(13)00292-5. 2013.

Li J; Donath S; Li Y; Qin D; Prabhakar BS; Li P. miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet.* 6, e1000795. 2010.

Li QJ; Chau J; Ebert PJ; Sylvester G; Min H; Liu G; Braich R; Manoharan M; Soutschek J; Skare P; Klein LO; Davis MM; Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell.* 129, 147-161. 2007.

Li SC; Pan CY; Lin WC. Bioinformatic discovery of microRNA precursors from human ESTs and introns. *BMC Genomics.* 7, 164. 2006.

Li Y; Guessous F; Zhang Y; Dipierro C; Kefas B; Johnson E; Marcinkiewicz L; Jiang J; Yang Y; Schmittgen TD; Lopes B; Schiff D; Purow B; Abounader R. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.* 69, 7569-7576. 2009.

Lin J; Puigserver P; Donovan J; Tarr P; Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 277, 1645-1648. 2002.

Lin J; Tarr PT; Yang R; Rhee J; Puigserver P; Newgard CB; Spiegelman BM. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30843-8. Epub 2003 Jun 13. 278, 30843-30848. 2003.

Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 29, 343-351. 2008.

Liu J; Carmell MA; Rivas FV; Marsden CG; Thomson JM; Song JJ; Hammond SM; Joshua-Tor L; Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305, 1437-1441. 2004.

Liu X, Weaver D, Shirihai O, Hajnóczky G. Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J*. 28, 3074-3089. 2009.

Louis DN; Ohgaki H; Wiestler OD; Cavenee WK; Burger PC; Jouvet A; Scheithauer BW; Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 114, 97-109. 2007.

Lu C; Tej SS; Luo S; Haudenschild CD; Meyers BC; Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*. 309, 1567-1569. 2005.

Lu J; Getz G; Miska EA; Alvarez-Saavedra E; Lamb J; Peck D; Sweet-Cordero A; Ebert BL; Mak RH; Ferrando AA; Downing JR; Jacks T; Horvitz HR; Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435, 834-838. 2005.

Lukiw WJ, Cui JG, Li YY, Culicchia F. Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol*. 91, 27-32. 2009.

Lund E; Güttinger S; Calado A; Dahlberg JE; Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303, 95-98. 2004.

Ma L; Teruya-Feldstein J; Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 449, 682-688. 2007.

Ma L; Reinhardt F; Pan E; Soutschek J; Bhat B; Marcusson EG; Teruya-Feldstein J; Bell GW; Weinberg RA. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*. 28, 341-347. 2010.

Ma X; Kalakonda S; Srinivasula SM; Reddy SP; Platanius LC; Kalvakolanu DV. GRIM-19 associates with the serine protease HtrA2 for promoting cell death. *Oncogene*. 26, 4842-4849. 2007.

MacRae IJ; Ma E; Zhou M; Robinson CV; Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 512-517. 2008.

Maniatakis E; Mourelatos Z. Human mitochondrial tRNA^{Met} is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA*. 11, 849-852. 2005.

Mason PJ; Bautista JM; Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 21, 267-283. 2007.

Mayr C; Hemann MT; Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 315, 1576-1579. 2007.

Mazure NM; Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology*. 22, 177-180. 2010.

Máximo V; Sores P; Rocha AS; Sobrinho-Simões M. The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxyphil cell change. *Ultrastruct Pathol*. 22, 271-273. 1998.

Máximo V; Botelho T; Capela J; Soares P; Lima J; Taveira A; Amaro T; Barbosa AP; Preto A; Harach HR; Williams D; Sobrinho-Simões M. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. *Br J Cancer*. 92, 1892-1898. 2005.

McCulloch V; Seidel-Rogol BL; Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*. 22, 1116-1125. 2002.

McCulloch V; Shadel GS. Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol*. 23, 5816-5824. 2003.

Mei M; Ren Y; Zhou X; Yuan XB; Han L; Wang GX; Jia Z; Pu PY; Kang CS; Yao Z. Downregulation of miR-21 enhances chemotherapeutic effect of taxol in breast carcinoma cells. *Technol Cancer Res Treat*. 9, 77-86. 2010.

Meirhaeghe A; Crowley V; Lenaghan C; Lelliott C; Green K; Stewart A; Hart K; Schinner S; Sethi JK; Yeo G; Brand MD; Cortright RN; O'Rahilly S; Montague C; Vidal-Puig AJ. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J*. 373, 155-165. 2003.

Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*. 133, 217-222. 2008.

Menei P; Capelle L; Guyotat J; Fuentes S; Assaker R; Bataille B; François P; Dorwling-Carter D; Paquis P; Bauchet L; Parker F; Sabatier J; Faisant N; Benoit JP. Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of malignant glioma: a randomized phase II trial. *Neurosurgery*. 56, 242-248. 2005.

Meng F; Henson R; Wehbe-Janek H; Ghoshal K; Jacob ST; Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 133, 647-658. 2007.

Mercer TR; Neph S; Dinger ME; Crawford J; Smith MA; Shearwood AM; Haugen E; Bracken CP; Rackham O; Stamatoyannopoulos JA; Filipovska A; Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell*. 146, 645-658. 2011.

Metallo CM; Gameiro PA; Bell EL; Mattaini KR; Yang J; Hiller K; Jewell CM; Johnson ZR; Irvine DJ; Guarente L; Kelleher JK; Vander Heiden MG; Iliopoulos O; Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 481, 380-384. 2012.

Metzler M; Wilda M; Busch K; Viehmann S; Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 39, 167-169. 2004.

Mirebeau-Prunier D; Le Pennec S; Jacques C; Gueguen N; Poirier J; Malthiery Y; Savagner F. Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria. *FEBS J*. 277, 713-725. 2010.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191, 144-148. 1961.

Mizoguchi M; Guan Y; Yoshimoto K; Hata N; Amano T; Nakamizo A; Sasaki T. MicroRNAs in Human Malignant Gliomas. *J Oncol*. 2012:732874. 2012.

Mizoguchi M; Guan Y; Yoshimoto K; Hata N; Amano T; Nakamizo A; Sasaki T. Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. *Front Oncol*. 3. 2013.

Monsalve M; Wu Z; Adelmant G; Puigserver P; Fan M; Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*. 6, 307-316. 2000.

Mootha VK; Handschin C; Arlow D; Xie X; St Pierre J; Sihag S; Yang W; Altshuler D; Puigserver P; Patterson N; Willy PJ; Schulman IG; Heyman RA; Lander ES; Spiegelman BM. ERR α and GABPA/B specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 6570-6575. 2004.

Mott JL; Kobayashi S; Bronk SF; Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 26, 6133-6140. 2007.

Mukherjee S; Basu S; Home P; Dhar G; Adhya S. Necessary and sufficient factors for the import of transfer RNA into the kinetoplast mitochondrion. *EMBO Rep*. 8, 589-595. 2007.

Murakami T; Shimomura Y; Yoshimura A; Sokabe M; Fujitsuka N. Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1381, 113-122. 1998.

Muthu MS; Kulkarni SA; Xiong J; Feng SS. Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *Int J Pharm.* 421, 332-340. 2011.

Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, Chuderland D, Shalgi R. microRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn. *J. Cell Sci.* 126, 2867-2876. 2013.

Nekrasova OE; Mendez MG; Chernouvanenko IS; Tyurin-Kuzmin PA; Kuczmarski ER; Gelfand VI; Goldman RD; Minin AA. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 22, 2282-2389. 2011.

Nikiforova MN; Tseng GC; Steward D; Diorio D; Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 1600-1608. 2008.

Nikiforova MN; Chiosea SI; Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 20, 85-91. 2009.

Nykänen A; Haley B; Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* 107, 309-321. 2001.

O'Donnell KA; Wentzel EA; Zeller KI; Dang CV; Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 435, 839-843. 2005.

O'Malley BW; Kumar R. Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res.* 69, 8217-8222. 2009.

Obad S; dos Santos CO; Petri A; Heidenblad M; Broom O; Ruse C; Fu C; Lindow M; Stenvang J; Straarup EM; Hansen HF; Koch T; Pappin D; Hannon GJ; Kauppinen S. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet.* 43, 371-378. 2011.

Ohh M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. *Neoplasia.* 8, 623-629. 2006.

Ojuka EO; Jones TE; Han DH; Chen M; Holloszy JO. Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* 17, 675-681. 2003.

Okamoto K, Kondo-Okamoto N. Mitochondria and autophagy: Critical interplay between the two homeostats. *BBA* 1820, 595-600. 2012.

Ongwijitwat S; Liang HL; Graboyes EM; Wong-Riley MT. Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. *Gene.* 374, 39-49. 2006.

Osthus RC; Shim H; Kim S; Li Q; Reddy R; Mukherjee M; Xu Y; Wonsey D; Lee LA; Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 275, 21797-21800. 2000.

Ota A; Tagawa H; Karnan S; Tsuzuki S; Karpas A; Kira S; Yoshida Y; Seto M. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* 2004 May 1;64(9):3087-95. 64, 3087-3095. 2004.

Pallante P; Visone R; Ferracin M; Ferraro A; Berlingieri MT; Troncone G; Chiappetta G; Liu CG; Santoro M; Negrini M; Croce CM; Fusco A. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 13, 497-508. 2006.

Pan S; Ryu SY; Sheu SS. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. *Sci China Life Sci.* 54, 763-769. 2011.

Papa S; Martino PL; Capitano G; Gaballo A; De Rasio D; Signorile A; Petruzzella V. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol.* 942, 3-37. 2012.

Park IK; Qian D; Kiel M; Becker MW; Pihalja M; Weissman IL; Morrison SJ; Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature.* 423, 302-305. 2003.

Parsons DW; Jones S; Zhang X; Lin JC; Leary RJ; Angenendt P; Mankoo P; Carter H; Siu IM; Gallia GL; Olivi A; McLendon R; Rasheed BA; Keir S; Nikolskaya T; Nikolsky Y; Busam DA; Tekleab H; Diaz LA Jr; Hartigan J; Smith DR; Strausberg RL; Marie SK; Shinjo SM; Yan H; Riggins GJ; Bigner DD; Karchin R; Papadopoulos N; Parmigiani G; Vogelstein B; Velculescu VE; Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 321, 1807-1812. 2008.

Pecot CV; Calin GA; Coleman RL; Lopez-Berestein G; Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer.* 11, 59-67. 2011.

Pedersen-Bjergaard J; Pedersen M; Roulston D; Philip P. Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood.* 86, 3542-3552. 1995.

Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978, 190-274. 1978.

Pereira DM; Rodrigues PM; Borralho PM; Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today.* 18, 282-289. 2013.

Petrelli A; Perra A; Schernhuber K; Cargnelutti M; Salvi A; Migliore C; Ghiso E; Benetti A; Barlati S; Ledda-Columbano GM; Portolani N; De Petro G; Columbano A; Giordano S. Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. *Oncogene.* 31, 4517-4526. 2012.

Petrocca F; Visone R; Onelli MR; Shah MH; Nicoloso MS; de Martino I; Iliopoulos D; Pilozzi E; Liu CG; Negrini M; Cavazzini L; Volinia S; Alder H; Ruco LP; Baldassarre G; Croce CM; Vecchione A. E2F1-

regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. 13, 272-286. 2008.

Pickering MT; Stadler BM; Kowalik TF. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. *Oncogene*. 28, 140-145. 2009.

Pilkis SJ; El-Maghrabi MR; Pilkis J; Claus TH; Cumming DA. Fructose 2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *J Biol Chem*. 256, 3171-3174. 1981.

Pollard PJ; Ratcliffe PJ. Cancer. Puzzling patterns of predisposition. *Science*. 324, 192-194. 2009.

Poulikakos PI; Zhang C; Bollag G; Shokat KM; Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 464, 427-430. 2010.

Pratt AJ; MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*. 284, 17897-17901. 2009.

Puigserver P; Wu Z; Park CW; Graves R; Wright M; Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998 92, 829-839. 1998.

Raharijaona M, Le PS, Poirier J, Mirebeau-Prunier D, Rouxel C, Jacques C, Fontaine JF, Malthiery Y, Houlgatte R & Savagner F 2009 PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours. *PLoS.One*. 4 e7964.

Rais B; Comin B; Puigjaner J; Brandes JL; Creppy E; Saboureau D; Ennamany R; Lee WN; Boros LG; Cascante M. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett*. 456, 113-118. 1999.

Rantanen A; Gaspari M; Falkenberg M; Gustafsson CM; Larsson NG. Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm Genome*. 14, 1-6. 2003.

Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan XB, Han L, Wang GX, Jia ZF, Xu P, Pu PY, Kang CS. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC cancer* 10, 27. 2010.

Riganti C; Gazzano E; Polimeni M; Aldieri E; Ghigo D. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med*. 53, 421-436. 2012.

Ringel MD. Molecular markers of aggressiveness of thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 16, 361-366. 2009.

Risteovski S; O'Leary DA; Thornell AP; Owen MJ; Kola I; Hertzog PJ. The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol*. 24, 5844-5849. 2004.

Rivas FV; Tolia NH; Song JJ; Aragon JP; Liu J; Hannon GJ; Joshua-Tor L. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* 12, 340-349. 2005.

Roberti M; Polosa PL; Bruni F; Manzari C; Deceglie S; Gadaleta MN; Cantatore P. The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 1787, 303-311. 2009.

Rodriguez A; Vigorito E; Clare S; Warren MV; Couttet P; Soond DR; van Dongen S; Grocock RJ; Das PP; Miska EA; Vetrie D; Okkenhaug K; Enright AJ; Dougan G; Turner M; Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611. 2007.

Rossing M; Borup R; Henao R; Winther O; Vikesaa J; Niazi O; Godballe C; Krogdahl A; Glud M; Hjort-Sorensen C; Kiss K; Bennedbaek FN; Nielsen FC. Down-regulation of microRNAs controlling tumourigenic factors in follicular thyroid carcinoma. *J Mol Endocrinol.* 48, 11-23. 2012.

Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med.* 48, 353-374. 1997.

Rubio MA; Rinehart JJ; Krett B; Duvezin-Caubet S; Reichert AS; Söll D; Alfonzo JD. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 9186-9191. 2008.

Rubio MA; Hopper AK. Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2, 802-817. 2011.

Rui W; Bing F; Hai-Zhu S; Wei D; Long-Bang C. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). *J Cell Mol Med.* 14, 206-214. 2010.

Rusan NM; Fagerstrom CJ; Yvon AM; Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell.* 12, 971-980. 2001.

Rustin P; Munnich A; Rötig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet.* 10, 289-291. 2002.

Sakai C; Tomitsuka E; Esumi H; Harada S; Kita K. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1820, 643-651. 2012.

Salminen A; Kaarniranta K; Kauppinen A; Ojala J; Haapasalo A; Soininen H; Hiltunen M. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog Neurobiol.* 106-107, 33-54. 2013.

Sampson VB; Rong NH; Han J; Yang Q; Aris V; Soteropoulos P; Petrelli NJ; Dunn SP; Krueger LJ. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67, 9762-9770. 2007.

Sano E; Shono S; Tashiro K; Konishi H; Yamauchi E; Taniguchi H. Novel tyrosine phosphorylated and cardiolipin-binding protein CLPABP functions as mitochondrial RNA granule. *Biochim Biophys Acta.* 1783, 1036-1047. 2008.

Saunders MA; Liang H; Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 3300-3305. 2007.

Savagner F; Chevrollier A; Loiseau D; Morgan C; Reynier P; Clark O; Stepien G; Malthiery Y. Mitochondrial activity in XTC.UC1 cells derived from thyroid oncocyoma. *Thyroid.* 11, 327-333. 2001.

Savagner F; Franc B; Guyetant S; Rodien P; Reynier P; Malthiery Y. Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 4920-4925. 2001.

Savagner F; Mirebeau D; Jacques C; Guyetant S; Morgan C; Franc B; Reynier P; Malthiery Y. PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 310, 779-784. 2003.

Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene.* 286, 81-89. 2002.

Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *J Cell Biochem.* 97, 673-683. 2006.

Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 97, 673-683. 2006.

Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 88, 611-638. 2008.

Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 1269-1278. 2011.

Schäfer E; Seelert H; Reifschneider NH; Krause F; Dencher NA; Vonck J. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 281, 15370-15375. 2006.

Schägger H; Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783. 2000.

Schofield CJ; Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 343-354. 2004.

Schreiber SN; Emter R; Hock MB; Knutti D; Cardenas J; Podvinec M; Oakeley EJ; Kralli A. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 6472-6477. 2004.

Schwarz DS; Hutvagner G; Du T; Xu Z; Aronin N; Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 115, 199-208. 2003.

Schweppe RE; Klopper JP; Korch C; Pugazhenti U; Benezra M; Knauf JA; Fagin JA; Marlow LA; Copland JA; Smallridge RC; Haugen BR. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 4331-4341. 2008.

Seidel-Rogol BL; McCulloch V; Shadel GS. Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat Genet.* 33, 24. 2003.

Seitz H; Ghildiyal M; Zamore PD. Argonaute loading improves the 5' precision of both MicroRNAs and their miRNA* strands in flies. *Curr Biol.* 18, 147-151. 2008.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 33, 207-214. 2012.

Sethupathy P; Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet.* 24, 489-497. 2008.

Sevignani C; Calin GA; Nnadi SC; Shimizu M; Davuluri RV; Hyslop T; Demant P; Croce CM; Siracusa LD. MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 8017-8022. 2007.

Shadel GS; Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 66, 409-435. 1997.

Shutt TE; Shadel GS. A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease. *Environ Mol Mutagen.* 51, 360-379. 2010.

Si ML; Zhu S; Wu H; Lu Z; Wu F; Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 26, 2799-2803. 2007.

Sieber F; Duchêne AM; Maréchal-Drouard L. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol.* 287, 145-190. 2011.

Singh PK; Mehla K; Hollingsworth MA; Johnson KR. Regulation of Aerobic Glycolysis by microRNAs in Cancer. *Mol Cell Pharmacol.* 3, 125-134. 2011.

Singh R; Saini N. Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis-a combined computational and experimental approach. *J Cell Sci.* 125, 1568-1578. 2012.

Soga T; Ohashi Y; Ueno Y; Naraoka H; Tomita M; Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2, 488-494. 2003.

Soga T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 104, 275-281. 2012.

Soriano A; Jubierre L; Almazán-Moga A; Molist C; Roma J; de Toledo JS; Gallego S; Segura MF. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol Res.* s1043-6618, 55-58. 2013.

Sripada L; Tomar D; Singh R. Mitochondria: one of the destinations of miRNAs. *Mitochondrion.* 12, 593-599. 2012.

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, 26597-26603. 2003.

Stahlhut Espinosa CE, S. FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med.* 79, 131-140. 2006.

Steinberg GR; Watt MJ; Febbraio MA. Cytokine Regulation of AMPK signalling. *Front Biosci.* 14, 1902-1916. 2009.

Stewart L; Glenn GM; Stratton P; Goldstein AM; Merino MJ; Tucker MA; Linehan WM; Toro JR. Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch Dermatol.* 144, 1584-1592. 2008.

Stiburek L; Hansikova H; Tesarova M; Cerna L; Zeman J. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res.*2006;55 Suppl 2:S27-41. 55 Suppl 2, 27-41. 2006.

Stratton MR; Campbell PJ; Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 458, 719-724. 2009.

Stupp R; Hegi ME; Mason WP; van den Bent MJ; Taphoorn MJ; Janzer RC; Ludwin SK; Allgeier A; Fisher B; Belanger K; Hau P; Brandes AA; Gijtenbeek J; Marosi C; Vecht CJ; Mokhtari K; Wesseling P; Villa S; Eisenhauer E; Gorlia T; Weller M; Lacombe D; Cairncross JG; Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459-466. 2009.

Sun LL; Jiang BG; Li WT; Zou JJ; Shi YQ; Liu ZM. MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. *Diabetes Res Clin Pract.* 91, 94-100. 2011.

Szabadkai G; Simoni AM; Rizzuto R. Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 278, 15153-15161. 2003.

Takamizawa J; Konishi H; Yanagisawa K; Tomida S; Osada H; Endoh H; Harano T; Yatabe Y; Nagino M; Nimura Y; Mitsudomi T; Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64, 3753-3756. 2004.

Takeshita F; Patrawala L; Osaki M; Takahashi RU; Yamamoto Y; Kosaka N; Kawamata M; Kelnar K; Bader AG; Brown D; Ochiya T. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther.* 18, 181-187. 2010.

Tam W; Hughes SH; Hayward WS; Besmer P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukemia virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol.* 76, 4275-4286. 2002.

Tatsuta T; Langer T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* 27, 306-314. 2008.

Tavazoie SF; Alarcón C; Oskarsson T; Padua D; Wang Q; Bos PD; Gerald WL; Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 451, 147-152. 2008.

Tetzlaff MT; Liu A; Xu X; Master SR; Baldwin DA; Tobias JW; Livolsi VA; Baloch ZW. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol.* 18, 163-173. 2007.

Tétrault N; De Guire V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin Biochem.* 46, 842-845. 2013.

Thai TH; Calado DP; Casola S; Ansel KM; Xiao C; Xue Y; Murphy A; Frendewey D; Valenzuela D; Kutok JL; Schmidt-Suppran M; Rajewsky N; Yancopoulos G; Rao A; Rajewsky K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604-608. 2007.

Tian WN; Braunstein LD; Apse K; Pang J; Rose M; Tian X; Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol.* 276, 1121-1131. 1999.

Tivnan A, McDonald KL. Current Progress for the Use of miRNAs in Glioblastoma Treatment. *Mol Neurobiol* The final publication is available at link.springer.com. 2013.

Tivnan A; Orr WS; Gubala V; Nooney R; Williams DE; McDonagh C; Prenter S; Harvey H; Domingo-Fernández R; Bray IM; Piskareva O; Ng CY; Lode HN; Davidoff AM; Stallings RL. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS One.* 7, e38129. 2012.

Tolia NH; Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol.* 3, 36-43. 2007.

Tomasetti M, Neuzil J, Dong L. MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: Role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta*. S0304-4165 (13) 00377-2. 2013.

Tomitsuka E; Goto Y; Taniwaki M; Kita K. Direct evidence for expression of type II flavoprotein subunit in human complex II (succinate-ubiquinone reductase). *Biochem Biophys Res Commun*. 311, 774-779. 2003.

Tomitsuka E; Kita K; Esumi H. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 85, 258-265. 2009.

Tomitsuka E; Kita K; Esumi H. The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Ann N Y Acad Sci*. 1201, 44-49. 2010.

Tsang WP; Kwok TT. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis*. 13, 1215-1222. 2008.

Ugalde C; Janssen RJ; van den Heuvel LP; Smeitink JA; Nijtmans LG. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet*. 13, 659-667. 2004.

Vagin VV; Sigova A; Li C; Seitz H; Gvozdev V; Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. 313, 320-324. 2006.

Valadi H; Ekström K; Bossios A; Sjöstrand M; Lee JJ; Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9, 654-659. 2007.

Valastyan S; Weinberg RA. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules. *J Cell Sci*. 124, 999-1006. 2011.

van Berkel TJ; de Jonge HR; Koster JF; Hülsmann WC. Kinetic evidence for the presence of two forms of M2-type pyruvate kinase in rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 60, 398-405. 1974.

van Staveren WC; Solís DY; Hébrant A; Detours V; Dumont JE; Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta*. 1795, 92-103. 2009.

Vander Heiden MG; Cantley LC; Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324, 1029-1033. 2009.

Vaupel P; Kallinowski F; Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49, 6449-6465. 1989.

Vaupel P; Thews O; Kelleher DK; Konecny MA. O₂ extraction is a key parameter determining the oxygenation status of malignant tumors and normal tissues. *Int J Oncol.* 2003 Apr;22(4):795-8. 22, 795-798. 2003.

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, 1868-1876. 2000.

Ventura A; Young AG; Winslow MM; Lintault L; Meissner A; Erkland SJ; Newman J; Bronson RT; Crowley D; Stone JR; Jaenisch R; Sharp PA; Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 132, 875-886. 2008.

Vercauteren K; Pasko RA; Gleyzer N; Marino VM; Scarpulla RC. PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol Cell Biol.* 26, 7409-7419. 2006.

Vercauteren K; Gleyzer N; Scarpulla RC. PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J Biol Chem.* 283, 12102-12111. 2008.

Vercauteren K; Gleyzer N; Scarpulla RC. Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *J Biol Chem.* 284, 2307-2319. 2009.

Villena JA; Kralli A. ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab.* 19, 269-276. 2008.

Virbasius JV; Virbasius CA; Scarpulla RC. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* 7, 380-392. 1993.

Visone R; Russo L; Pa; ante P; De; artino I; Fe; aro A; Le; e V; Bo; one E; e; occa F; Al; r H; Cr; e CM ; F; co A. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer.* 14, 791-798. 2007.

Volinia S; Calin GA; Liu CG; Ambs S; Cimmino A; Petrocca F; Visone R; Iorio M; Roldo C; Ferracin M; Prueitt RL; Yanaihara N; Lanza G; Scarpa A; Vecchione A; Negrini M; Harris CC; Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 2257-2261. 2006.

Vousden KH; Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 9, 691-700. 2009.

Wang G; Chen HW; Oktay Y; Zhang J; Allen EL; Smith GM; Fan KC; Hong JS; French SW; McCaffery JM; Lightowlers RN; Morse HC 3rd; Koehler CM; Teitell MA. PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*. 142, 456-467. 2010.

Wang JX; Jiao JQ; Li Q; Long B; Wang K; Liu JP; Li YR; Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 17, 71-78. 2011.

Wang X; Cao L; Wang Y; Wang X; Liu N; You Y. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett*. 3, 955-960. 2012.

Wang Y; Medvid R; Melton C; Jaenisch R; Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 39, 380-385. 2007.

Wang Y; Juranek S; Li H; Sheng G; Tuschl T; Patel DJ. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*. 456, 921-926. 2008.

Warburg O; Posener K; Negelein E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift* 152, 319-344. 1924.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 124, 269-270. 1956.

Ward PS; Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 21, 297-308. 2012.

Warthmann N; Das S; Lanz C; Weigel D. Comparative analysis of the MIR319a microRNA locus in Arabidopsis and related Brassicaceae. *Mol Biol Evol*. 25, 892-902. 2008.

Weber F; Teresi RE; Broelsch CE; Frilling A; Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 91, 3584-3591. 2006.

Weiler J; Hunziker J; Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther*. 13, 496-502. 2006.

Weinberg JM; Venkatachalam MA; Roeser NF; Saikumar P; Dong Z; Senter RA; Nissim I. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279, 927-943. 2013.

White R; Morganstein D; Christian M; Seth A; Herzog B; Parker MG. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett*. 582, 39-45. 2008.

Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 27, 5904-5912. 2008.

Wiesener MS; Jürgensen JS; Rosenberger C; Scholze CK; Hörstrup JH; Warnecke C; Mandriota S; Bechmann I; Frei UA; Pugh CW; Ratcliffe PJ; Bachmann S; Maxwell PH; Eckardt KU. Widespread

hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 17, 271-273. 2003.

Windebank AJ. Chemotherapeutic neuropathy. *Curr Opin Neurol.* 12, 565-571. 1999.

Woodrum DT; Gauger PG. Role of 131I in the treatment of well differentiated thyroid cancer. *J Surg Oncol.* 89, 114-121. 2005.

Wu Z; Puigserver P; Andersson U; Zhang C; Adelmant G; Mootha V; Troy A; Cinti S; Lowell B; Scarpulla RC; Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98, 115-124. 1999.

Würdinger T; Tannous BA; Saydam O; Skog J; Grau S; Soutschek J; Weissleder R; Breakefield XO; Krichevsky AM. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell.* 14, 382-393. 2008.

Xi Y; Formentini A; Chien M; Weir DB; Russo JJ; Ju J; Kornmann M; Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights.* 2, 113-121. 2006.

Xiao C; Srinivasan L; Calado DP; Patterson HC; Zhang B; Wang J; Henderson JM; Kutok JL; Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol.* 9, 405-414. 2008.

Yamamoto H; Morino K; Nishio Y; Ugi S; Yoshizaki T; Kashiwagi A; Maegawa H. MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303, 1419-1427. 2012.

Yan H; Parsons DW; Jin G; McLendon R; Rasheed BA; Yuan W; Kos I; Batinic-Haberle I; Jones S; Riggins GJ; Friedman H; Friedman A; Reardon D; Herndon J; Kinzler KW; Velculescu VE; Vogelstein B; Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 360, 765-773. 2009.

Yanaihara N; Caplen N; Bowman E; Seike M; Kumamoto K; Yi M; Stephens RM; Okamoto A; Yokota J; Tanaka T; Calin GA; Liu CG; Croce CM; Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 9, 189-198. 2006.

Yang JS; Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell.* 43, 892-903. 2011.

Ye J; Mancuso A; Tong X; Ward PS; Fan J; Rabinowitz JD; Thompson CB. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 6904-6909. 2012.

Yeung SJ; Pan J; Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 65, 3981-3999. 2008.

Yuan YR; Pei Y; Ma JB; Kuryavyi V; Zhadina M; Meister G; Chen HY; Dauter Z; Tuschl T; Patel DJ. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*. 19, 405-419. 2005.

Zeng Y; Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 32, 4776-4785. 2004.

Zhang B; Pan X; Cobb GP; Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 302, 1-12. 2007.

Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta*. 411, 846-852. 2010.

Zhang L; Huang J; Yang N; Greshock J; Megraw MS; Giannakakis A; Liang S; Naylor TL; Barchetti A; Ward MR; Yao G; Medina; O'brien-Jenkins; Katsaros; Hatzigeorgiou; Gimotty; Weber; Coukos. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 9136-3141. 2006.

Zhang S; Wan Y; Pan T; Gu X; Qian C; Sun G; Sun L; Xiang Y; Wang Z; Shi L. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma U251 stem cells to chemotherapeutic drug temozolomide. *J Mol Neurosci*. 47, 346-356. 2012.

Zhang Y; Chao T; Li R; Liu W; Chen Y; Yan X; Gong Y; Yin B; Liu W; Qiang B; Zhao J; Yuan J; Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med (Berl)*. 87, 43-51. 2009a.

Zhang Y; Huypens P; Adamson AW; Chang JS; Henagan TM; Boudreau A; Lenard NR; Burk D; Klein J; Perwitz N; Shin J; Fasshauer M; Kralli A; Gettys TW. Alternative mRNA Splicing Produces a Novel Biologically Active Short Isoform of PGC-1 α . *J. Biol. Chem*. 284, 32813-32826. 2009.

Zhang Y; Roccaro AM; Rombaoa C; Flores L; Obad S; Fernandes SM; Sacco A; Liu Y; Ngo H; Quang P; Azab AK; Azab F; Maiso P; Reagan M; Brown JR; Thai TH; Kauppinen S; Ghobrial IM. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood*. 120, 1678-1686. 2012.

Zhu S; Si ML; Wu H; Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 282, 14328-14336. 2007.

Zhu S; Wu H; Wu F; Nie D; Sheng S; Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 18, 350-359. 2008.

Zou Z; Wu L; Ding H; Wang Y; Zhang Y; Chen X; Chen X; Zhang CY; Zhang Q; Zen K. MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *J Biol Chem*. 287, 4148-4156. 2012.

Zielke A; Tezelman S; Jossart GH; Wong M; Siperstein AE; Duh QY; Clark OH. Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hürthle cell origin. *Thyroid*. 8, 475-783. 1998.

Annexes

***Annexe 1 : Protocole détaillé de l'utilisation du Bioanalyseur 2100
avec des puces DNA 7500 :***

http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/IMG/pdf/appareils-P3.2_Agilent_ADN_7500.pdf

***Annexe 2 : Protocole détaillé de l'utilisation du Bioanalyseur 2100
avec des puces RNA 6000 Pico :***

http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/IMG/pdf/Prot_Mat_Bioanalyseur-ARN-Pico_V4.pdf

***Annexe 3 : Protocole Agilent de marquage, d'hybridation et de lecture
de sur puces Agilent d'expression 4*44k:***

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90051_Two-Color_Tecan.pdf

Thèse de Doctorat

Romain RIVALIN

Intégration de la régulation post-transcriptionnelle et des interactions avec le cytosquelette dans les voies de contrôle du métabolisme mitochondrial.

Integration of post-transcriptional regulation and interaction with the cytoskeleton in the control pathways of mitochondrial metabolism.

Résumé

La mitochondrie fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire, grâce au mécanisme de phosphorylation oxydative. Cette fonction nécessite une expression coordonnée des génomes nucléaires et mitochondriaux assurée par la famille de coactivateurs transcriptionnels PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1), sensibles aux signaux endogènes et/ou environnementaux. Une régulation plus fine de la phosphorylation oxydative par des miRNAs est maintenant soupçonnée. Afin de préciser ces différents modes de régulation dans des modèles cellulaires de carcinomes thyroïdiens, nous avons exploré la voie PRC-dépendante (PGC-related coactivator) et les miRNAs spécifiquement exprimés dans ces modèles présentant une richesse en mitochondries et des niveaux de PRC et de PGC-1 α différents. Ce travail a permis de mettre en évidence miR-218 comme marqueur clé de régulation de la fonction mitochondriale. Au-delà de la régulation de l'expression génique, une fourniture énergétique adéquate nécessite également une répartition optimale des mitochondries au sein de la cellule, grâce à d'étroites connexions entre le cytosquelette et la mitochondrie. Des peptides issus de la sous-unité légère des neurofilaments, dont le NFL-TBS.40-63, sont capables d'entrer spécifiquement dans les cellules de glioblastomes humains et d'y déstabiliser le réseau microtubulaire, conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Pour étudier l'impact de ce peptide sur le réseau de mitochondries et leurs fonctions, nous avons traité le modèle cellulaire de glioblastomes humains T98G, par différentes concentrations de NFL-TBS.40-63. Ce travail révèle une perturbation du réseau de mitochondries et une diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules exposées. L'ensemble de ces travaux doit permettre le développement de traitements ciblés de la fonction mitochondriale.

Mots clés

Biogenèse mitochondriale, fonction OXPHOS, PGC-1 Related Coactivator, Cell-penetrating peptide NFL-TBS.40-63, Glioblastome, Cytosquelette.

Abstract

Mitochondrion provides energy for cell metabolism through the mechanism of oxidative phosphorylation. This function requires a coordinated expression of nuclear and mitochondrial genomes provided by the family of transcriptional coactivators PGC -1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator -1), responding to endogenous and/or environmental signals. A fine regulation of the oxidative phosphorylation by miRNAs is now suspected. To specify these regulatory pathways in cellular models of human follicular thyroid carcinomas, we have explored the PRC-related (PGC-related coactivator) pathway and specific microRNAs, in models presenting various mitochondrial abundance and differences in PRC and PGC-1 α expression levels. We have highlighted the role of miR-218 as a key regulatory factor of mitochondrial functions. An adequate energy supply also requires close connections between cytoskeleton and mitochondria to ensure an optimal distribution of mitochondria within the cell. Peptides derived from the light neurofilament subunit, as NFL - TBS.40 -63, are able to specifically enter into human glioblastoma cells and destabilize the microtubule network, leading to cell death by apoptosis. To study the impact of this peptide on mitochondrial network and oxidative phosphorylation, we have treated the T98G human glioblastoma cells by different concentrations of NFL- TBS.40 -63. Our work showed disturbance in mitochondrial network and reduction in mitochondrial respiration rate in the treated cells. All these results should allow the development of therapy targeting the mitochondrial function.

Key Words

Mitochondrial Biogenesis, OXPHOS function, PGC-1 Related Coactivator, Cell-penetrating peptide NFL-TBS.40-63, Glioblastoma, Cytoskeleton.