

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 AMPK	2
1.1.1 Régulation de l'expression génique et relation structure-fonction.....	2
1.1.2 Régulation de l'activité de la kinase AMPK	6
1.1.3 Rôles dans la régulation du métabolisme énergétique	10
1.1.3.1 Reprogrammation métabolique	10
1.1.3.2 Prise du glucose.....	12
1.1.3.3 Synthèses des protéines	13
1.1.3.4 Métabolisme lipidique	14
1.1.3.5 Glycogénolyse	14
1.1.3.6 Synthèse des glycérolipides	15
1.1.3.7 Lipolyse ou adipolyse	15
1.1.3.8 Autophagie.....	16
1.1.4 AMPK coordonne la croissance cellulaire, le cytosquelette et la polarité cellulaire.....	17
1.1.4.1 Croissance et prolifération cellulaire.....	17
1.1.4.2 Polarité cellulaire et dynamique du cytosquelette.....	19
1.2 Mitochondrie	21
1.2.1 Caractérisation de la structure mitochondriale	22
1.2.1.1 La membrane externe (MOM)	22
1.2.1.2 Espace intermembranaire (IMS)	24
1.2.1.3 La membrane interne (MIM)	24
1.2.1.4 La matrice	27

1.2.2	Fonctions mitochondriales.....	29
1.2.2.1	Production d'ATP.....	29
1.2.2.2	Reprogrammation métabolique.....	32
1.2.2.3	Signalisation.....	37
1.2.3	Dynamisme mitochondrial.....	39
1.2.3.1	Fusion.....	40
1.2.3.2	Fission.....	42
1.3	Problématique.....	43
1.4	Objectifs et hypothèses de recherche.....	44
CHAPITRE II		
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		46
2.1	Culture cellulaire.....	46
2.2	Traitement des cellules.....	46
2.3	Immunofluorescence.....	47
2.3.1	Microscopie confocale.....	47
2.3.2	Microscopie optique.....	48
2.4	Essai d'ATP.....	48
2.5	Mesure du Lactate.....	48
2.6	Mesure du Potentiel Membranaire (MP) et des espèces réactives d'oxygènes (ROS).....	49
2.7	Mesure de l'activité de la caspase 3.....	49
2.8	Analyses statistiques.....	50
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		51
3.1	AMPK joue un rôle direct dans la fragmentation des mitochondries.....	51
3.2	Altération de la fonction mitochondriale par la perte d'AMPK.....	53
3.3	AMPK est requis pour la survie cellulaire.....	60
CHAPITRE IV		
DISCUSSION.....		63
CHAPITRE V		
CONCLUSION.....		70
RÉFÉRENCES.....		72

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Rôle physiologique d'AMPK	2
1.2	Organisation structurale des domaines des sous-unités du complexe AMPK	4
1.3	Structure et mutation du complexe AMPK	6
1.4	Régulation de l'activité d'AMPK	7
1.5	Activateurs d'AMPK	9
1.6	Stress et agents pharmacologiques activant AMPK	10
1.7	Fonction métabolique d'AMPK.....	12
1.8	Régulation de la biogenèse mitochondriale par AMPK.....	18
1.9	Régulation des processus biologiques par la voie LKB1/AMPK.....	19
1.10	Contrôle la polarité cellulaire	20
1.11	Ultrastructure typique d'une mitochondrie normale	21
1.12	Organisation dynamique des machines d'importation de protéines mitochondriales.....	23
1.13	Organisation des crêtes mitochondriales.....	25
1.14	Représentation schématique de la régulation de la structure des crêtes.....	26
1.15	Forme et fonctions des mitochondries	28
1.16	Représentation générale des voies métaboliques de la production d'ATP ...	30
1.17	Chaîne de transfert d'électrons dans la MIM de la mitochondrie	31
1.18	Différence de métabolisme entre les cellules quiescentes et proliférantes ...	34
1.19	La glutamine permet aux cellules en prolifération d'utiliser les intermédiaires du cycle TCA en tant que précurseurs de la biosynthèse.....	36

1.20	Modèle schématique des voies de signalisation de l'apoptose impliquant les protéines pro-apoptotiques Bcl-2	38
1.21	Représentation schématique du dynamisme mitochondrial	41
3.1	Visualisation de la morphologie de mitochondries de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) isolés de souris sauvages (WT)	52
3.2	Effet de l'activation et de l'inhibition d'AMPK sur la dynamique mitochondriale	53
3.3	L'élongation mitochondriale pendant le starvation est AMPK-indépendant	54
3.4	Effet de l'activation d'AMPK sur la fonction mitochondriale par un agent pharmacologique spécifique A769662.....	55
3.5	Altération de la fonction mitochondriale par la perte d'AMPK	56
3.6	Altération de la fonction mitochondriale dans des conditions de stress métaboliques	59
3.7	AMPK est nécessaire au maintien de la fonction mitochondriale	60
3.8	Effet de d'AMPK sur la sensibilité des cellules à l'apoptose	61
3.9	AMPK prévient l'apoptose.....	62
4.1	Aperçu de la régulation énergétique mitochondriale sous l'effet de l'activation d'AMPK.....	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	Acide aminé
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine-diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribonucleoside
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AMPC	AMP cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Arf5	ADP-ribolysation factor 5
ARN	Acide ribonucléique
Asp	Aspartate
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATG1	Autophagy-related protein 1 homolog
ATG12-9	Autophagy-related protein 12
ATP	Adénosine-triphosphate
ATPIF1	ATPase inhibitory factor 1
α -KG	α -cétoglutarate
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer protein
Bax	Bcl-2-associated X protein
BC	Biotin carboxylase

Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein, apoptosis regulator
Bcl-XL	Bcl-2-extra large protein
Beclin-1	ATG6, Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein
Bid	BH3 (Bcl-2 homology 3) interacting domain death agonist
Bnip3	BCL2 Interacting Protein 3
BRSK	Brain-selective serine/threonine-protein kinase
β -oxydation	Beta oxydation
CAC	Citric acid cycle
CAMKK2	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2
Ca ²⁺	Calcium
CBM	Carbohydrate-biding module
CBS	Cystathionine- β -synthase
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CLIP-170	Cytoplasmic linker protein of 170 kDa
Complexe I	NADH-ubiquinone oxydoréductase
Complexe II	Succinate déshydrogénase
Complexe III	Cytochrome c reductase
Complexe IV	Cytochrome c oxidase
Complexe V	F1F0-ATP synthase, ATP synthase
CREBP	cAMP-response element-binding protein
CT	Carboxyl transférase
DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycérol O-acyltransférase
DRP1	Dynamain related protein 1

EEF2	Eukaryotic elongation factor 2
EEF2K	EEF-2-kinase
EIF4	Eukaryotic initiation factor 4
ETC	Electron transport chain
4E-BP1	Eukaryotic initiation factor (eIF) 4E binding protein 1
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FADP	Flavin adenine dinucleotide phosphate
FAO	Fatty acid oxydation
FAS	Apoptosis-inducing Fas receptor
Fis1	Mitochondrial fission 1 protein
FOXO	Forhead box transcription factor
GBF1	Golgi-specific nucleotide exchange factor 1
GDH	Glutamate deshydrogenase
Glc, Glu	Glucose
Gln	Glutamine
GLUT	Glucose transporter
GP	Glycogen phosphorylase
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GS	Glycogen synthase
HDACs	Histone deacetylases
HMGCR	HMGCoA, Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
HSL	Hormone-sensitive lipase
Hsp	Heat shock protein
HuR	Hu family of RNA-binding proteins
IMS	Espace intermembranaire (Inter membrane space)

KLC2	Kinesin Light Chain 2
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDH	Lactate déshydrogénase
LKB1	Liver kinase B1
MAG	Monoacylglycerol
MAO	Monoamine oxydase
MAP	Microtubule-associated protein
MARKs	Microtubule-associated protein (MAP)-microtubule affinity regulating kinases
MAVS	Mitochondria anti-viral signaling protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MDH	Malate deshydrogenase
ME	Malic enzyme
MEF2	Myocyte-specific enhancer factor 2
Mff	Mitochondrial fission factor
Mfn	Mitofusine
MGL	Monoglyceride lipase
MICOS	Mitochondrial contact site and cristae junction organizing system
MIC60	Mitofilin
MIM	Membrane interne mitochondriale (Mitochondria inner membrane)
MLC	Myosin light chain
MOM	Membrane externe mitochondriale (Mitochondria outer membrane)
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPP	Mitochondrial processing peptidase
mtGPAT	Mitochondria GPAT
mtTFA	Mitochondrial DNA transcription factor A)

mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NEM	N-éthylmaléimide
NRF	Nuclear respiratory factor
OAA	Oxaloacetic acid, oxaloacétate
OPA1	Optic atrophie type 1
OXA	Oxidase assembly
OXPHOS	Oxydative phosphorylation
PAM	Presequence translocase-associated motor
PDG	Phosphate-dependent glutaminase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PFKB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PKM2	Pyruvate kinase M2
PP	Protein phosphatase
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
PRKAA	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha
PRKAB	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta
PRKAG	Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma
pThr172	Phospho-Thr172

Pyr	Pyruvate
p38MAPK	P38 mitogen-activated protein kinase
p21	p21Cip1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A)
p27	p27Kip1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B)
p53	TP53, Tumor protein 53
p70S6k	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
Rab	Ras-associated binding proteins
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
ROS	Reactive oxygen species
SAM	Sorting and assembly machinery
SIRT6	Sirtuins
Srebp 1	Sterol regulatory element-binding protein 1
Succ	Succinate
TAG	Triacylglycerol
TAK1	Transforming growth factor beta (TGF- β) -activated kinase 1
TCA	Tricarboxylic acid cycle, Krebs cycle
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TFEB	Transcription factor that binds E-box sequences
Tim	Translocase of the inner membrane
TOM	Translocase of the outer membrane
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
VDAC	Voltage-dependent anion channel

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La plupart des organismes évoluent et s'adaptent sous une pression environnementale constamment variable. Cette variation pousse les cellules à reprogrammer systématiquement divers processus biologiques impliqués dans le métabolisme pour maintenir un certain équilibre à l'échelle cellulaire, appelé homéostasie [1-5]. L'homéostasie énergétique cellulaire plus particulièrement se traduit par le maintien constant de la stimulation de synthèse d'ATP (Adénosine-triphosphate), grâce à la régulation du métabolisme cellulaire c'est-à-dire un équilibre entre les voies cataboliques (oxydation des acides gras, glycolyse) et les voies anaboliques (consommatrices d'ATP comme la synthèse des protéines, de cholestérol et des acides gras) [3-9]. Une importante protéine régulatrice du métabolisme cellulaire chez les eucaryotes est l'AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK est activée lorsque le niveau intracellulaire d'Adénosine Mono-Phosphate (AMP) est élevé. Elle inhibe les voies anaboliques et favorise les voies cataboliques (Figure 1.1) [10, 11]. De même, la génération d'ATP se produit en grande partie dans des organites appelés mitochondries. Elles constituent le pilier central de la production d'ATP et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique [12].

AMPK joue un rôle central dans la régulation de divers processus cellulaires tels que la croissance, le métabolisme, la polarité et l'autophagie agissant comme un senseur métabolique [5, 9, 14-16]. Une fois activée, AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire par le contrôle de l'activité d'enzymes et l'expression de gènes impliqués dans ces processus biologiques. Par exemple: l'activation du coactivateur du facteur de transcription PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) dans la biogenèse mitochondriale ou même encore le blocage de mTORC (mammalian target of rapamycin complex) dans l'inhibition de la synthèse de protéine [9, 16-20]. Ce système senseur du métabolisme énergétique est un mécanisme de

survie cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes [16]. La perte d'activité d'AMPK provoque des conséquences graves par exemple l'incapacité de croissance [9], ou est associée à certaines pathologies comme la maladie de Parkinson [14, 21-24] ou même le cancer [25-30]. Ainsi, AMPK apparaît comme une cible thérapeutique de choix pour la prise en charge des maladies métaboliques (diabète, insulino-résistance, obésité) de pathologies cardiaques (ischémie) ou désordre énergétique (maladies neurodégénératives, cancer) [14, 16, 31-42].

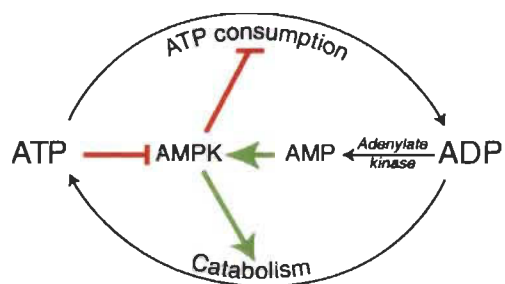


Figure 1.1 Rôle physiologique d'AMPK.

AMPK favorise le rétablissement de l'équilibre énergétique en stimulant les processus produisant de l'ATP, le catabolisme, tout en inhibant les processus consommant de l'ATP, l'anabolisme. Le catabolisme mène à l'augmentation du niveau d'énergie par la conversion de l'ADP en ATP (flèche incurvée en bas), tandis que l'anabolisme entraîne une diminution d'énergie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP (flèche courbe supérieure). Lors d'un stress cellulaire, la diminution du ratio ATP/ADP est observée et résulte d'une augmentation des niveaux d'ADP et une diminution des niveaux d'ATP. L'ADP est alors convertie en AMP par l'adénylate kinase ce qui activera l'AMPK. L'AMPK favorisera ensuite le rétablissement de l'équilibre énergétique en stimulant le catabolisme et en inhibant les processus consommant de l'ATP. Source : [13].

1.1 AMPK

1.1.1 Régulation de l'expression génique et relation structure-fonction

La séquence et la structure de l'AMPK sont hautement conservées à travers les espèces, des procaryotes aux eucaryotes [5, 9, 14, 15]. Des études génétiques sur des orthologues d'AMPK chez les espèces *Arabidosis* [43], *Saccharomyces cerevisiae* [44], *Dictyostelium* [45], *C. elegans* [46], *Drosophila* [47] et *Physcomitrella* [48] ont montré

cette homologie tant au niveau structurelle que fonctionnelle. La protéine AMPK est une sérine/thréonine kinase existant sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique alpha (α) et de deux sous-unités régulatrices beta et gamma (β et γ) [49] (Figure 1.2). Chez les mammifères, deux isoformes existent pour les sous-unités α ($\alpha 1$, $\alpha 2$) codées par les gènes PRKAA1 et PRKAA2 (protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 et 2), 2 isoformes pour la sous-unité β ($\beta 1$, $\beta 2$) codées par les gènes PRKAB1 et PRKAB2 (protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1 et 2), et trois isoformes pour la sous-unité γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$) codées par les gènes PRKAG1, PRKAG2 et PRKAG3 (protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1, 2 et 3) [50-53] (Figure 1.2). Leur localisation génétique se situe sur cinq chromosomes différents : PRKAA1 sur le chromosome 5 (5p12), PRKAA2 et PRKAB2 sur le chromosome 1 (1q31 et 1q21.1), PRKAB1 et PRKAG1 sur le chromosome 12 (12q24.1 et 12q12-14), PRKAG2 sur le chromosome 7 (7q35-36) et PRKAG3 sur le chromosome 2 (2q35) [54, 55]. AMPK est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes. L'expression génique et l'épissage des isoformes d'AMPK peuvent former 12 complexes $\alpha\beta\gamma$ différents [14, 40, 49, 52, 53, 56].

La différence d'expression et d'assemblage des différentes isoformes semble indiquer une spécificité dans la régulation métabolique dépendant du tissu [9, 14, 19, 57], mais également de sa fonction, sa localisation intracellulaire, ses activateurs et ses cibles [14, 58]. Ces variations apportent une complexité supplémentaire pour la compréhension du mode d'action et du rôle physiologique de l'AMPK [57, 59]. Par exemple, $\alpha 1$ est fortement exprimé dans les cellules du rein, des poumons et des tissus adipeux, tandis que l'isoforme $\alpha 2$ est exprimée principalement dans les cellules du cœur et des muscles squelettiques [60, 61]. De même, il a été observé une variation au niveau de la localisation subcellulaire d'AMPK selon les divers complexes auxquels il est associé dépendamment du type de l'isoforme activée [16, 62-65]. L'isoforme $\alpha 2$ contient une séquence de localisation nucléaire permettant de le déplacer entre les compartiments cytoplasmiques et nucléaires, tandis que l'isoforme $\alpha 1$ reste localisée dans les régions cytoplasmiques [66, 67]. Par exemple, dans les cellules de type carotidien 1 et les cellules épithéliales des voies respiratoires, l'activation des complexes interagissant avec la sous-unité $\alpha 1$ est

localisée dans le cytosol et peut être associée à la membrane plasmique [68, 69]. Dans les cellules bêta du pancréas, des neurones et des muscles squelettiques [70, 71], l'activation de l'isoforme $\alpha 2$ entraîne une translocation vers le noyau qui supposément facilite la modulation de l'expression génique [72, 73]. De plus, bien que la phosphorylation de divers résidus favorise la translocation nucléaire [74], la myristoylation de la sous-unité β stimule le recrutement des sous-unités α et γ d'AMPK au niveau des membranes intracellulaires par exemple les membranes mitochondriales, de l'appareil de Golgi ou des lysosomes en réponse au stress énergétique [65, 75].

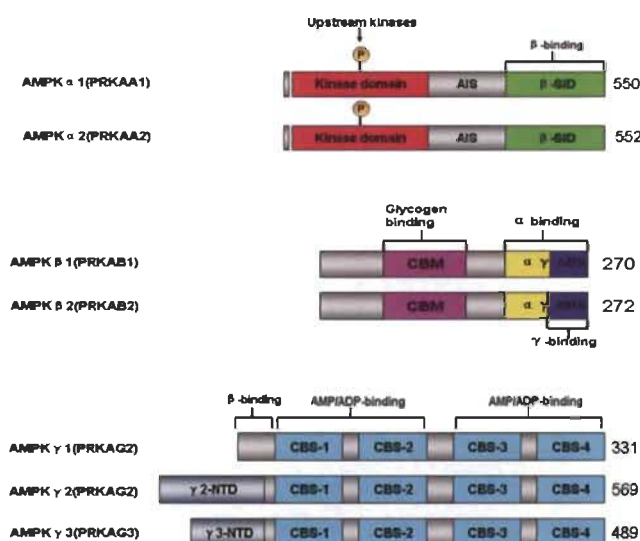


Figure 1.2 Organisation structurale des domaines des sous-unités du complexe AMPK.

AMPK est une kinase hautement conservée dont les sous-unités existent sous plusieurs isoformes. La sous-unité α possède deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ codées par les gènes PRKAA1 et PRKAA2. La sous-unité β possède 2 isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ codées par les gènes PRKAB1 et PRKAB2. La sous-unité γ possède trois isoformes $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$ codées par les gènes PRKAG1, PRKAG2 et PRKAG3. L'expression génique et l'épissage des isoformes d'AMPK peuvent former 12 complexes $\alpha\beta\gamma$ différents. Les régions des différents domaines des isoformes α , β et γ d'AMPK sont annotées par numérotation des résidus. La sous-unité α est constituée d'un domaine catalytique (kinase domain) en N-terminal, d'une séquence auto-inhibitrice (AIS) et d'un domaine en interaction avec une sous-unité β en C-terminal. La sous-unité β est constituée d'un groupe myristoyle N-terminal, un module de liaison glucidique (CBM) et d'une séquence de liaison avec les sous-unités $\alpha\gamma$ C-terminale ($\alpha\gamma$ -SBS). La sous-unité γ est constituée de quatre domaines cystathionine β -synthase (CBS). Source : [76, 77].

La sous-unité α est constituée de trois régions distinctes. Elle contient un domaine catalytique dans la région amino-terminale (N-terminale), une boucle régulatrice et un domaine d'interaction avec les sous-unités β et γ en C-terminal [14, 16] (Figure 1.2). Le domaine catalytique est le lieu où se situe le site d'activation primaire d'AMPK connu comme étant l'acide aminé Thréonine à la position 172 (Thr172) [78]. La boucle régulatrice est une zone riche en acides aminés sérine/thréonine (boucle ST) proches de la région carboxy-terminale (C-terminale). Elle constitue le domaine d'auto-inhibition qui est actif uniquement en absence d'AMP [79]. La sous-unité β contient un domaine de liaison au glycogène en N-terminal (domaine CBM, carbohydrate-binding module) dont la fonction reste encore à élucider bien qu'il soit associé à un procédé de myristoylation en N-terminal facilitant sa translocation au niveau des membranes intracellulaires [14, 80]. Elle contient également un domaine d'interaction protéine-protéine en C-terminal [16, 81, 82]. Comme mentionné plus haut, la sous-unité β sert de protéine d'amarrage qui se lie à α/γ et semble aider à déterminer également l'emplacement subcellulaire du complexe AMPK [40]. La sous-unité $\beta 1$ est modifiée post-traductionnellement par la myristoylation et la phosphorylation sur différente sérine (Ser24,25,182) la fixant aux autres sous-unités α/γ à une localisation extranucléaire précise. À l'inverse, la sous-unité $\beta 2$ est distribuée de manière plus homogène et ne se localise pas sur les sites cellulaires précis [74]. La sous-unité γ possède une répétition de quatre motifs de sites de liaisons nucléotidiques (cystathionine- β -synthase, CBS) en C-terminal, impliqués dans la liaison de l'AMP (Adénosine-monophosphate) et de l'ATP, mais également de l'ADP (adénosine-diphosphate). Chez les mammifères, trois de ces motifs sont fonctionnels (1, 3 et 4) et leurs liaisons diffèrent selon des affinités sélectives pour chacune de ses isoformes [14, 16, 59, 83]. Les domaines CBS ont une importance majeure sur la fonctionnalité d'AMPK et leur mutation peut entraîner certaines pathologies irréversibles. En effet, une mutation de la sous-unité $\gamma 3$ chez le porc entraîne une augmentation de glycogène dans le muscle squelettique ayant un effet néfaste quant à la qualité de la viande. De même, chez l'homme, des mutations de la sous-unité $\gamma 2$ sont associées à l'accumulation de glycogène dans le cœur menant au syndrome de Wolff-Parkinson-White qui est caractérisé par des troubles de conduction cardiaque [16, 84] (Figure 1.3).

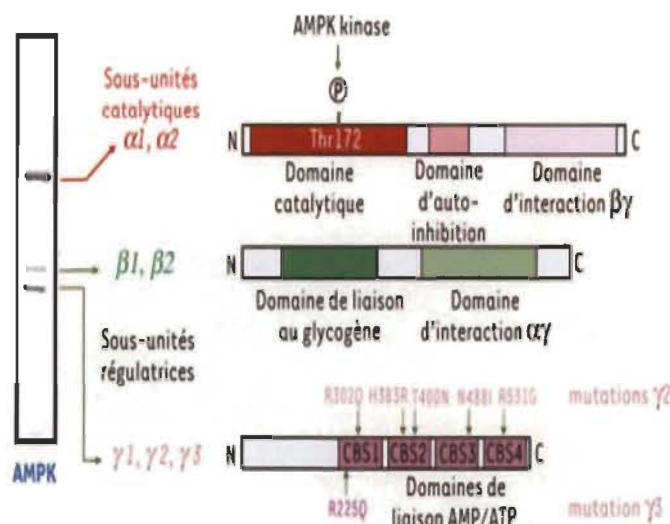


Figure 1.3 Structure et mutation du complexe AMPK.

Le profil de migration en gel d'électrophorèse dénaturant du complexe AMPK purifié à partir de foie de rat est présenté à gauche de la figure. La structure des sous-unités α , β et γ est représentée schématiquement dans la partie droite de la figure. Cinq mutations de la sous-unité $\gamma 2$ identifiées chez l'homme ont été associées à une accumulation de glycogène dans le cœur (syndrome de Wolff-Parkinson-White) et une mutation de la sous-unité $\gamma 3$ chez le porc entraînant une augmentation du glycogène au niveau musculaire. Ces mutations sont indiquées par des flèches dans la partie droite de la figure. Source : [16].

1.1.2 Régulation de l'activité de la kinase AMPK

AMPK est activée physiologiquement lors d'un stress énergétique, c'est-à-dire lorsque le niveau d'ATP est bas dû à l'absence de nutriments, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie. Son activation dépend donc du ratio ATP/AMP et ADP/AMP. L'augmentation du ratio ATP/AMP diminue considérablement l'activité d'AMPK et inversement la diminution de ce ratio augmente son activité [2, 9, 15, 16, 85-89]. La régulation de l'activité d'AMPK est complexe et implique différents paramètres en réponse aux variations des concentrations des nucléotides intracellulaires (AMP, ADP et ATP). Cette activité est contrôlée et modulée de façon allostérique en réponse à la liaison des nucléotides AMP, ADP et ATP sur les domaines CBS de la sous-unité γ (Figure 1.4) [9, 14, 16]. Ces 3 nucléotides sont les nucléotides physiologiques d'AMPK dans certaines conditions de stress cellulaires [9, 90, 91]. En effet, ils se fixent compétitivement sur

le même site de fixation formé par les domaines CBS de la sous-unité γ , menant à un changement conformationnel affectant l'activation d'AMPK [9, 86, 92-94]. Ce changement aboutit à une stimulation (AMP, ADP) ou une inhibition (ATP) d'AMPK (Figure 1.4, point 1) [16]. Ces liaisons déterminent trois fonctions principales dans la régulation de l'activité catalytique d'AMPK. Elles régulent la modulation du site de phosphorylation de la Thr172, influant ainsi sur la demi-vie du résidu Thr172 phosphorylé (pThr172) et l'augmentation de l'activité d'AMPK [14, 88]. En effet, l'activation d'AMPK nécessite la phosphorylation du résidu Thr172 de sa sous-unité α (Figure 1.4, point 2).

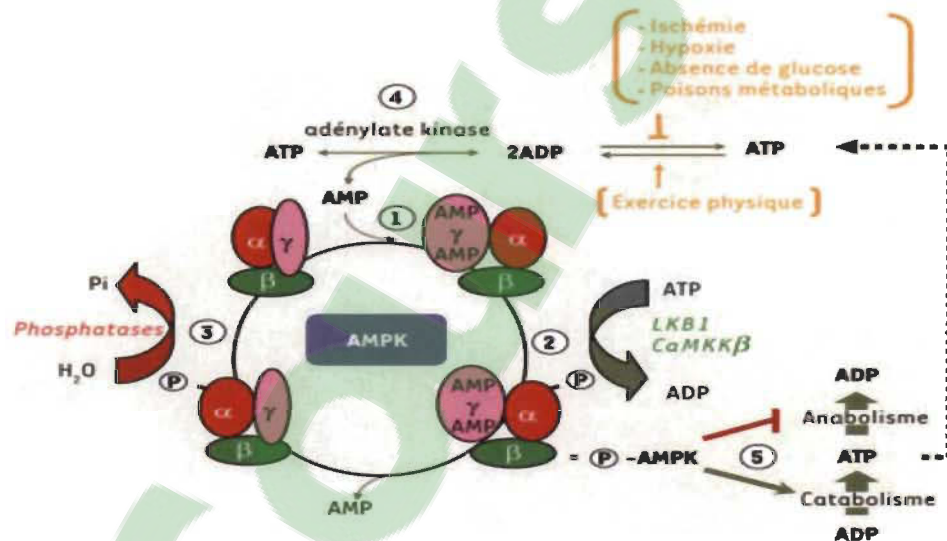


Figure 1.4 Régulation de l'activité d'AMPK.

AMP, ADP et ATP sont les principaux régulateurs de l'activité de l'AMPK (point 1). La liaison de l'AMP et l'ADP favorisent la phosphorylation de la sous-unité catalytique α par les AMPK kinases (point 2) et empêchent également sa déphosphorylation par les protéines phosphatases (point 3). Lorsque la balance énergétique cellulaire est perturbée, les rapports ATP/ADP et ATP/AMP sont alors automatiquement modifiés par l'intervention de l'adénylate kinase (point 4). Une fois activée, l'AMPK favorise les réactions métaboliques génératrices d'ATP et réduit les voies anaboliques consommatrices d'ATP (point 5). Source : [16].

La liaison de l'AMP ou l'ADP change la conformation d'AMPK pour permettre la phosphorylation du résidu Thr172 entraînant ainsi son activation. Cette liaison permet

également d'augmenter la durée de demi-vie de pThr172 en la protégeant de la déphosphorylation. En effet, sans cette protection, la Thr172 se retrouve très rapidement déphosphorylée par les phosphatases 2A et 2C (PP2A, PP2C) (Figure 1.4, point 3). En plus de promouvoir et protéger la phosphorylation de la Thr172, cette liaison augmente massivement l'activité catalytique d'AMPK [14, 49, 85, 95, 96]. À l'inverse, la liaison de l'ATP sur les domaines CBS baisse l'activité catalytique d'AMPK puisqu'elle permet aux phosphatases de pouvoir déphosphoryler la Thr172 de la sous-unité α [14, 96].

Trois protéines kinases sont capables de phosphoryler la Thr172 et d'activer AMPK. La kinase hépatique B1 suppresseuse de tumeur (LKB1), la kinase calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) et la kinase TGF- β activée (TAK1) (Figure 1.5) [89, 90, 97-101]. LKB1 fut la première kinase identifiée comme activateur d'AMPK et constitutivement active [98, 102]. LKB1 est un gène suppresseur de tumeur dont la mutation est associée à différentes pathologies comme le syndrome de Peutz Jeghers, le cancer du cerveau ou même de la langue [9, 103]. La phosphorylation d'AMPK par LKB1 est modulée dépendamment de la liaison de l'AMP sur AMPK. En fait, la liaison de l'AMP au complexe AMPK modifie la structure d'AMPK, rendant accessible le résidu Thr172 et qui est donc phosphorylé par LKB1. Ce ratio module l'accessibilité du résidu Thr172, mais n'influence pas nécessairement l'activité de LKB1 [14, 16, 102]. En plus de réguler la phosphorylation de AMPK α 1 et AMPK α 2, LKB1 phosphoryle et active une douzaine d'autres kinases de sous familles d'AMPK [104].

La CAMKK2 (CAMKK β) active AMPK en réponse à un flux de calcium (Figure 1.5). Bien que sa séquence protéique soit proche de celle de LKB1, le mécanisme impliqué n'est pas encore bien éclairci, notamment dans les phénomènes physiopathologiques [14, 16, 90, 97, 106, 107]. Des études récentes faites sur l'ablation de LKB1 dans différents tissus suggèrent que celui-ci dirige majoritairement l'activation d'AMPK, mais que CAMKK2 semble être plutôt particulièrement impliqué dans les neurones et lymphocytes T [108, 109]. Pour finir, la protéine TAK1 (TGF β -activated kinase 1), activée par des mitogènes (MAPKKK, mitogen-activated protein kinase kinase

kinase), phosphoryle le résidu Thr172 d'AMPK (Figure 1.5). Cependant, le contexte dans lequel il pourrait réguler AMPK et son interaction avec LKB1 nécessite des études plus approfondies [50, 110, 111].

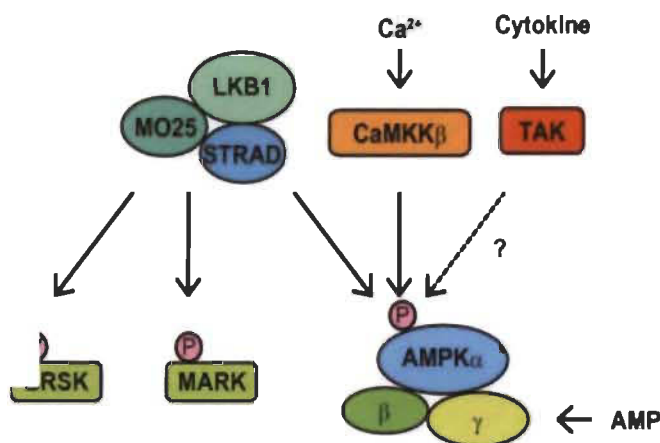


Figure 1.5 Activateurs d'AMPK.

La protéine kinase AMPK, la kinase métabolique est phosphorylée par trois protéines : LKB1, CAMKK2 et TAK1. Sa phosphorylation est nécessaire pour la rendre fonctionnelle sans quoi elle serait inactive. Source : [105].

En plus de plusieurs types de stress physiologiques tel qu'abordé dans la section, AMPK est la cible d'agent pharmacologique (Figure 1.6). Certains analogues biguanides, par exemple la metformine ou la phenformine qui sont des activateurs d'AMPK, sont utilisés pour combattre certaines pathologies comme dans le cas du traitement du diabète de type 2 [16]. Deux autres agonistes sont utilisés également pour activer AMPK, le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) et l'A769662. AICAR est un analogue d'AMP, qui en mimant son rôle, se fixe à la sous-unité γ d'AMPK au niveau des sites CBS [31]. A769662 est un agent pharmacologique spécifique qui active AMPK en se liant au niveau de l'interface de la liaison des sous-unités α et β [41, 42, 112].

1.1.3 Rôles dans la régulation du métabolisme énergétique

Une fois activée, AMPK peut influencer divers effecteurs impliqués dans plusieurs processus cellulaires comprenant le métabolisme des lipides, le métabolisme des glucides, la signalisation cellulaire, le substrat de récepteur de l'insuline-1, le transport d'ions, la transcription et le transducteur de l'activité de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) [68, 113-122]. En effet, elle régule positivement les voies signalétiques qui favorisent la production d'ATP comme la prise de glucose, la glycolyse, l'oxydation des acides gras et l'autophagie. À l'inverse, elle régule négativement les processus biosynthétiques qui consomment de l'ATP comme la néoglucogenèse, la glycogénèse la synthèse lipidique et protéique (Figure 1.7) [9, 17, 19, 88, 123]. Tel que décrit ci-après, la régulation se produit par la phosphorylation directe d'un certain nombre d'enzymes impliqués dans ces processus, mais également de divers facteurs de transcription et coactivateurs contrôlant l'expression des gènes [16, 87].

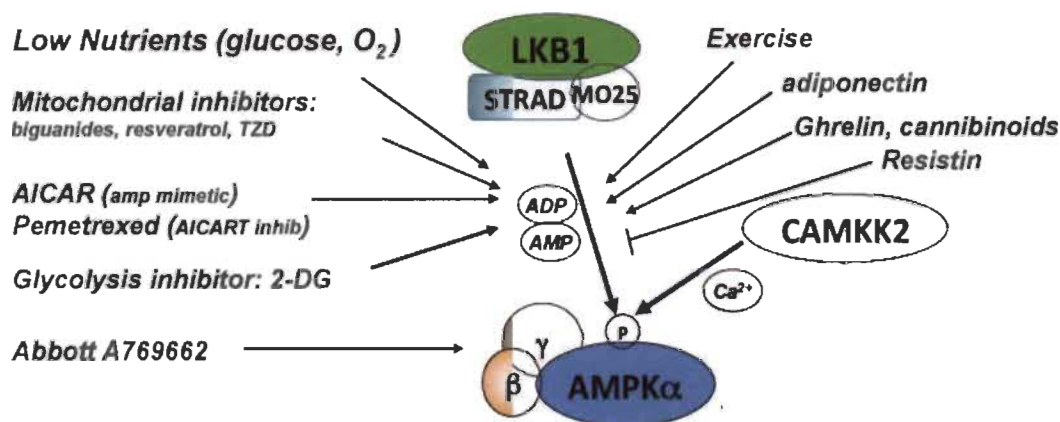


Figure 1.6 Stress et agents pharmacologiques activant AMPK.

AMPK est activé lorsque le niveau d'AMP et ADP augmente dû à une variété de stress physiologiques et/ou d'agents pharmacologiques. LKB1 active AMPK en réponse à l'augmentation d'AMP et CAMKK2 en réponse à un flux de calcium. Source : [9].

1.1.3.1 Reprogrammation métabolique

AMPK est impliquée dans la reprogrammation métabolique adaptative en conséquence de la disponibilité des nutriments. L'AMPK favorise l'absorption et le

transport de métabolites pour le catabolisme par la β -oxydation et inhibe simultanément les processus anaboliques de synthèse des acides gras, du cholestérol et des triglycérides. Très rapidement, il favorise la prise du glucose en augmentant la translocation de son transporteur de glucose GLUT (Glucose transporter), mais plus spécifiquement GLUT4 à la membrane plasmique [124]. Des études récentes ont montré également qu'AMPK peut également favoriser la prise du glucose en bloquant l'endocytose et favorisant un autre transporteur GLUT1 [125]. AMPK permet également l'augmentation de la prise de différents substrats de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) tels la glutamine et les acides gras. Les acides gras sont particulièrement prisés en période de restriction calorique [126]. Elle intervient également à long terme dans la reprogrammation métabolique en activant des régulateurs transcriptionnels tels que les facteurs de transcription FOXO (Forkhead box O) et le coactivateur PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator), qui facilitent de nombreuses fonctions incluant le métabolisme et la fonction mitochondriale [19, 127]. Elle régule également certains facteurs de transcriptions et coactivateurs, des acetyltransférases, des histones déacetylases, voire même des histones [9, 87]. L'expression des enzymes ACC1, ACC2 (Acetyl-CoA carboxylase 1,2) et FAS (Apoptosis-inducing *Fas* receptor) est modulée par l'activation des facteurs de transcriptions Srebp1 (Sterol regulatory element-binding proteins 1) et ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) et l'histone acetyltransférase p300. AMPK inhibe directement et indirectement la synthèse d'acides gras dans les cellules en division active en bloquant soit les facteurs de transcriptions Srebp1 et ChREBP, soit les enzymes ACC1, ACC2 et FAS [128-132]. Il est connu également qu'AMPK phosphoryle PGC1 α pour activer la biogenèse mitochondriale en cas de déplétion d'ATP [20, 133]. Les déacetylases HDACs (Histone deacetylases) de la classe IIa, favorisent la prolifération par déacétylation des facteurs de transcription et coactivateurs. AMPK régulerait l'activité de ces déacetylases en les inhibant par phosphorylation [134-141]. Pour finir, certaines études suggèrent qu'AMPK régulerait l'activité de certaines sirtuines (SIRT) qui sont également des déacetylases. SIRT1 à l'opposé des autres déacetylases, favorise l'oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale par déacétylation des facteurs de transcription [133, 142-144].

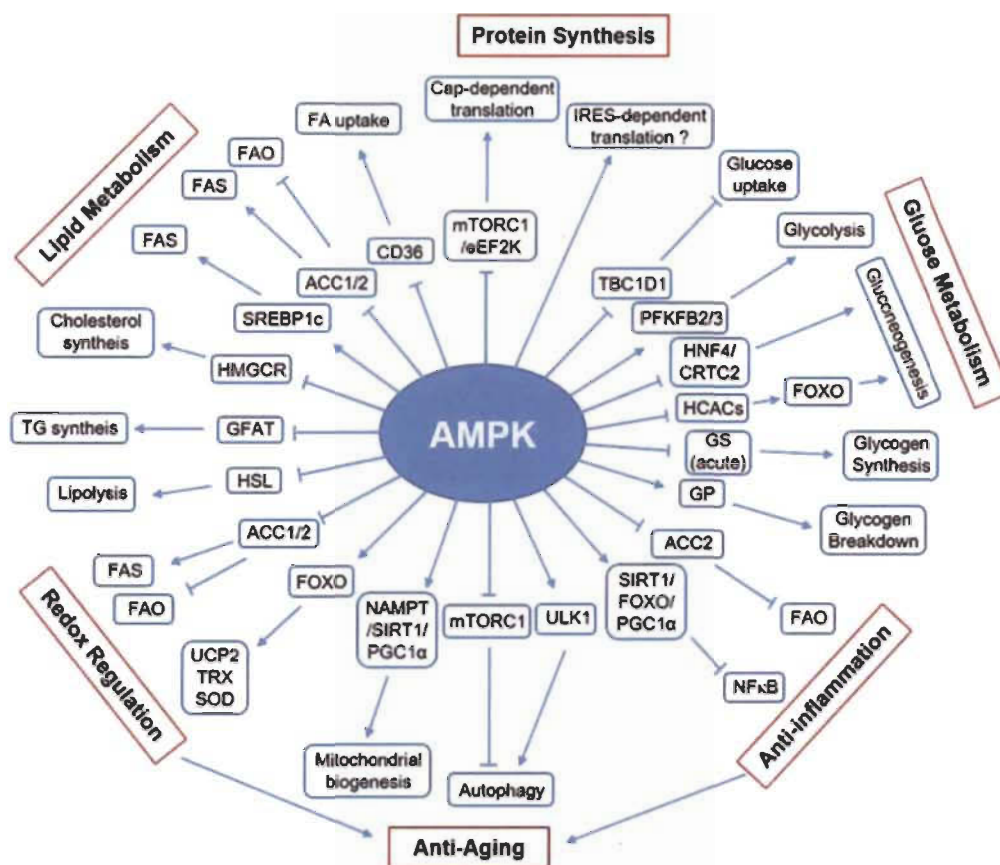


Figure 1.7 Fonction métabolique d'AMPK.

Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la régulation des voies métaboliques sous le contrôle d'AMPK. Les flèches indiquent une activation et les barres une inhibition. Source : [89].

1.1.3.2 Prise du glucose

AMPK joue un rôle clé dans l'utilisation du glucose et de ses formes de stockage par la cellule. Elle affecte la transcription et la translocation du transporteur de glucose 4 (GLUT4), la synthèse du glycogène, la glycolyse et la gluconéogenèse. La translocation du transporteur vers la membrane est un élément critique dans l'absorption du glucose. AMPK phosphorylerait directement la protéine Akt (Protein kinase B (PKB)) substrate of 160 kDa (AS160), une protéine activant la GTPase de Rab (Ras-associated binding proteins), qui contrôle le recyclage des vésicules de GLUT4. AMPK augmente également l'expression de l'ARN messager des gènes codant pour le transporteur GLUT4 et l'hexokinase pour faciliter la prise du glucose [145, 146]. Ce processus est amplifié par

l'interaction d'AMPK et les facteurs de transcription Myocyte-specific enhancer factor 2 (MEF2A et 2D), ce qui cause l'augmentation de l'expression de GLUT4 [122, 147, 148]. AMPK régule également l'internalisation de GLUT1 par la phosphorylation et la dégradation de la protéine TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) [89, 125].

1.1.3.3 Synthèses des protéines

Une des voies métaboliques les plus consommatrices d'énergie est celle de la synthèse des protéines [87, 88]. La kinase mTOR est une sérine/thréonine dirigeant la croissance et la prolifération en favorisant la synthèse des protéines en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments [149]. Des perturbations dans la régulation de la voie de signalisation de son activité sont associées à des syndromes métaboliques et principalement le cancer [26, 27, 150, 151]. La protéine mTOR répond à de nombreux signaux comme l'insuline, les facteurs de croissance, le niveau d'acides aminés pour réguler la croissance et la prolifération en stimulant les processus anaboliques [149]. De nombreuses études ont montré que la signalisation par mTOR régule l'initiation de la traduction par la phosphorylation de substrats tels que la protéine 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor (eIF) 4E binding protein 1) et la protéine p70S6k (Ribosomal protein S6 kinase beta-1) (Figure 1.7). La phosphorylation de 4E-BP1 favorise l'initiation de la traduction en augmentant la formation du complexe eIF4F (Eukaryotic initiation factor 4F) [152]. La phosphorylation de p70S6k augmente l'activité de l'hélicase eIF4A (Eukaryotic initiation factor 4A), un composant de eIF4F, stimulant l'initiation de la traduction [153]. AMPK bloque la voie Akt/mTOR indirectement par l'inhibition du complexe mTORC1 via l'activation de son régulateur négatif: le complexe de la sclérose tubéreuse 2 (TSC2), et directement par l'inhibition du complexe raptor (regulatory associated protein of mTOR) [135, 154, 155]. De plus, AMPK diminue la synthèse des protéines en supprimant la synthèse de l'ARN ribosomal [156]. La protéine eEF2 (Eukaryotic elongation factor 2) initie la traduction de l'ARNm en protéine. AMPK bloque également la synthèse des protéines en activant par phosphorylation la kinase eEF2K (eEF-2-kinase), qui a pour fonction une fois activée d'inhiber eEF2 [135, 138, 141, 157]

1.1.3.4 Métabolisme lipidique

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est une enzyme biotine-dépendante qui initie la synthèse des acides gras [158]. L'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase, HMGCR) est une oxydoréductase intervenant dans la voie du mévalonate [159]. ACC catalyse la carboxylation irréversible de l'acétyl-CoA pour produire de la malonyl-CoA par ses deux enzymes catalytiques, la biotine carboxylase (BC) et la carboxyltransférase (CT). Elle existe sous deux isoformes ACC1 et ACC2 dont l'expression est tissu-dépendante [158, 160]. La fonction la plus importante d'ACC est de fournir le substrat de malonyl-CoA pour la biosynthèse des acides gras [158, 161]. L'hydroxyméthylglutaryl-CoA catalyse la conversion de HMG-CoA en acide mévalonique, une étape nécessaire dans la biosynthèse du cholestérol [162]. Lorsque la disponibilité des nutriments diminue, les lipides deviennent le principal substrat des besoins énergétiques. AMPK bloque la voie de la synthèse lipidique par l'inhibition des 2 enzymes limitantes, ACC (ACC1 et ACC2) et l'HMGCR [159, 161, 162] (Figure 1.7). La synthèse des acides gras (FAS) est l'enzyme responsable de la synthèse de novo des acides gras [163]. On pense qu'il catalyse la formation d'acides gras à longue chaîne à partir d'acétyl-CoA, de malonyl-CoA et de NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) [17, 163]. L'expression de FAS est plus directement contrôlée par le facteur de transcription Srebp1c [87]. La stimulation par le glucose d'AMPK inhibe la transcription du FAS, ce qui bloque la synthèse *de novo* des acides gras [17] (Figure 1.7). Il a été observé que la forme tronquée d'AMPK, CA-AMPK, surexprimée dans le foie diminue l'expression de Srebp1c, bien que le mécanisme exact derrière ce phénomène ne soit pas encore élucidé [18].

1.1.3.5 Glycogénolyse

Le glycogène est un substrat important pour le tissu musculaire pendant l'exercice et pour le foie pendant le jeûne, qui est stocké sous forme de réserve dans les tissus adipeux [55]. La glycogène synthase (GS) est l'enzyme initiatrice de la formation du glycogène et la glycogène phosphorylase (GP) est l'enzyme initiant la dégradation du glycogène [164].

AMPK phosphoryle la GS sur son site inhibiteur, ce qui supprimera la formation de glycogène [87, 164] (Figure 1.7). En parallèle, AMPK augmente l'activité de la glycogène phosphorylase (GP) ce qui favorise la dégradation du glycogène en vue de libérer du glucose disponible dans le sang [164-166].

1.1.3.6 Synthèse des glycérolipides

La glycerol-3-phosphate acyl-transférase (GPAT) est l'enzyme qui catalyse l'étape initiatrice de la synthèse des glycérolipides. Elle existe sous la forme de 2 isoenzymes GPAT, une isoforme sensitive N-éthylmaléimide (NEM) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (GPAT microsomale) et une forme résistante NEM dans la membrane mitochondriale externe (mtGPAT). L'activation de l'AMPK par AICAR réduirait l'activité de la GPAT dans le foie [167, 168]. De même, il a été démontré que l'activation de l'AMPK dans le foie et le tissu adipeux réduit l'activité de mtGPAT chez les athlètes [169] et qu'à jeun, l'activation d'AMPK inhibe à la fois GPAT et DGAT (diacylglycérol O-acyltransférase), une enzyme qui catalyse la formation de triglycérides à partir de diacylglycérol et d'Acyl-CoA [170, 171].

1.1.3.7 Lipolyse ou adipolyse

La lipolyse est la dégradation des lipides qui conduit à la libération des acides gras par hydrolyse des glycérides (triglycérides-TAG, diglycérides-DAG et monoglycérides-MAG) [172]. Trois lipases sont responsables de la lipolyse, la HSL (hormone-sensitive lipase), l'ATGL (adipose triglyceride lipase) et la MGL (monoglyceride lipase) (Figure 1.7). Lors de ce processus, le TAG est hydrolysé formant un DAG et une molécule d'acide gras, réaction catalysée par l'ATGL. Après cela, le DAG est hydrolysé en MAG et un second acide gras par l'HSL. Finalement, le MGL hydrolyse le MAG, produisant du glycérol et un dernier acide gras [173]. Les acides gras issus de la lipolyse sont ensuite métabolisés selon deux voies. La première est la β -oxydation principalement dans les mitochondries qui produit de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA sera alors intégrée au cycle de Krebs pour produire en finale de l'ATP. La bêta-oxydation peut également avoir lieu dans

les peroxysomes [174]. La deuxième voie est la cétogenèse dans le foie en période de jeûne. L'accumulation d'acétyl-CoA dans les cellules hépatiques sera convertie en corps cétoniques et sécrété dans le sang pour être utilisés comme substituts au glucose surtout dans le cœur et les cellules nerveuses [175]. Il a été démontré qu'AMPK diminue l'activité de la HSL et ATGL et donc semble être un régulateur de la lipolyse [168, 176-183].

1.1.3.8 Autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation partielle de certains composants intracellulaires par les lysosomes selon le besoin de la cellule [6-8, 184, 185]. ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ATG1 (autophagy-related protein 1 homolog)) est la protéine initiatrice de la formation et la maturation de l'autophagosome via la phosphorylation de Beclin-1 (Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein, ATG6) [8]. Lors du processus, l'autophagosome mature fusionne avec un lysosome formant un phagolysosome dans lequel les éléments séquestrés seront dégradés ou recyclés [184]. Il a été démontré qu'AMPK active directement et indirectement l'autophagie via l'activation de la protéine ULK1 [9]. ULK1 peut être directement activé par AMPK ou inhibé par mTOR par phosphorylation [9, 184]. De ce fait, pour favoriser l'autophagie, AMPK phosphoryle directement ULK1 et bloque mTOR également par phosphorylation [8, 88, 186]. En parallèle, AMPK favorise également la biogenèse lysosomale par l'augmentation de l'activité du facteur de transcription TFEB (Transcription factor that binds E-box sequences) puis active la transcription des protéines nécessaires à la macroautophagie médiée par FOXO3 (Forkhead box O3) [187, 188]. Des recherches récentes montrent que FOXO régule l'expression de certains inducteurs de l'autophagie comme Bnip3 (BCL2 Interacting Protein 3), LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) et ATG12-9 (Autophagy-related protein 12), suggérant qu'AMPK régulerait l'autophagie par l'activation de FOXO [189, 190]. Une carence en nutriments ou en acides aminés va mener à l'activation de ce processus intracellulaire d'autodégradation. Cela permettra de recycler les éléments non nécessaires aux besoins de la cellule en carence énergétique et donc d'augmenter la disponibilité de diverses sources d'ATP et d'acides aminés pour la survie cellulaire [6, 185].

Il est à noter que lors de l'activation de l'autophagie, AMPK coordonne en parallèle la biogenèse mitochondriale via l'activation du cofacteur PGC1 α [191] (Figure 1.8). La biogenèse mitochondriale est le processus par lequel de nouvelles mitochondries se forment dans la cellule. Ce processus est généralement activé lors d'un stress cellulaire ou en réponse à des stimuli environnementaux. Ce procédé a pour but de maintenir l'intégrité des mitochondries nécessaire à la production d'ATP [192]. Il est rapporté qu'un nombre plus élevé de copies mitochondriales serait protecteur pour la cellule [87]. Plusieurs autres facteurs de transcription et coactivateurs différents, en plus de PGC1 α , semblent être impliqués dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. Par exemple, les facteurs nucléaires NRF-1 et 2 (nuclear respiratory factor 1 and 2) contrôlent de manière transcriptionnelle les gènes codant pour les cinq complexes de la chaîne d'électrons de la mitochondrie [20] (Figure 1.8). L'activation chronique d'AMPK par AICAR augmente l'expression de l'ARN messager de NRF-1 et du facteur transcriptionnel de l'ADN mitochondrial mtTFA (mitochondrial DNA transcription factor A) [133] [193]. Il a également été montré que PGC1 α est augmenté en réponse à l'activation par AMPK et qu'il co-immunoprécipite avec AMPK α 2. AMPK peut directement phosphoryler PGC1 α sur Thr177 [191, 192]. De plus, en réponse à une augmentation du ratio NAD/NADH, SIRT1 amplifie l'activation de PGC1 α par la déacétylation [127, 194]. La biogenèse mitochondriale est également régulée par la nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) dépendant d'AMPK et de l'augmentation de l'expression de PGC1 α dépendant de la p38MAPK (P38 mitogen-activated protein kinase) [192].

1.1.4 AMPK coordonne la croissance cellulaire, le cytosquelette et la polarité cellulaire

1.1.4.1 Croissance et prolifération cellulaire

AMPK est également connue pour avoir un impact considérable sur la croissance et la prolifération cellulaire. De manière générale, AMPK inhibe la croissance et la prolifération cellulaire (Figure 1.9) par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S [55]. Des études ont démontré que la protéine suppresseuse de tumeur p53 (tumor protein 53,

TP53) et les inhibiteurs de la cycline, p21 (p21^{Cip1}, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)) et p27 (p27^{Kip1}, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B)), sont impliqués dans ce processus. En effet, AMPK phosphoryle et active la protéine p53 qui est un activateur des inhibiteurs de cycline, p21 et p27 [195-198]. De plus, AMPK semblerait être impliquée dans la régulation de la protéine de liaison à l'ARN HuR (Hu family of RNA-binding proteins) réduisant la stabilité de l'ARN messager des régulateurs du cycle cellulaire telle la cycline A et la cycline B1 [142].

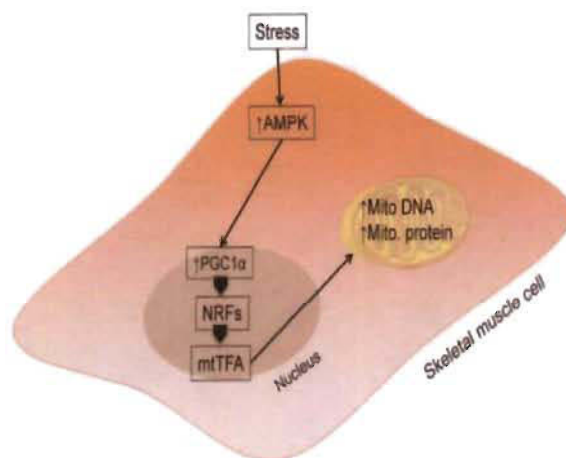


Figure 1.8 Régulation de la biogenèse mitochondriale par AMPK.

Signalisation d'activation d'AMPK conduisant à la biogenèse mitochondriale. Les signaux activés par AMPK via le facteur de transcription PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha), le facteur de transcription mitochondrial TFAM (mitochondrial transcription factors) et les récepteurs nucléaires NRF (nuclear respiratory factors) mènent à l'expression des gènes codant pour l'ADN et les protéines mitochondriaux en condition de stress. Cela conduit à une augmentation de la masse mitochondriale. Source : [87].

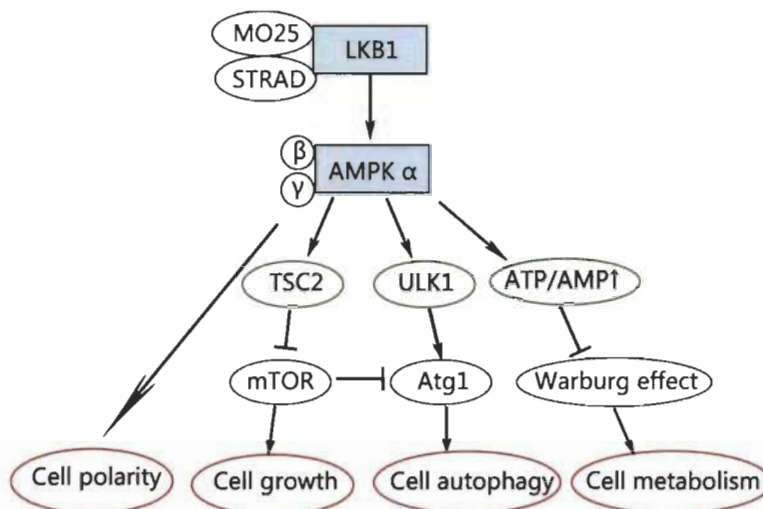


Figure 1.9 Régulation des processus biologiques par la voie LKB1/AMPK. AMPK maintient la polarité cellulaire et inhibe la croissance cellulaire en régulant négativement la cascade mTOR et l'effet Warburg. De plus, l'autophagie est initiée par la phosphorylation d'ULK1. Source : [199].

1.1.4.2 Polarité cellulaire et dynamique du cytosquelette

Il est de plus en plus évident qu'AMPK et son activateur LKB1 jouent un rôle important dans la polarisation cellulaire, la polarité cellulaire est impliquée dans la différenciation et la prolifération des cellules uniques et des organes multicellulaires [200-202] (Figure 1.10). La polarité cellulaire est l'organisation asymétrique de plusieurs composants cellulaires (sa membrane plasmique, cytosquelette ou ses organites) utilisée pour des fonctions spécialisées, tel le maintien d'une barrière dans l'épithélium ou la transmission de signaux dans des neurones [203]. Les microtubules du cytosquelette sont essentiels pour établir et maintenir la polarité. Les mécanismes liant les microtubules à la polarité épithéliale ne sont pas encore bien compris, mais l'interférence avec l'assemblage et le renouvellement des microtubules par l'utilisation des médicaments perturbe la polarisation des cellules épithéliales [204, 205]. Dans des modèles de cellules de mammifères MDCK (Madin-Darby canine kidney), l'activation de la voie LKB1/AMPK serait nécessaire à la polarisation et la dynamique du cytosquelette par la régulation des kinases MARKs (microtubule-associated protein (MAP)-microtubule affinity regulating kinases) [105, 200, 202, 206, 207]. Des études récentes suggèrent également qu'AMPK

serait impliqué dans le contrôle de la polarité cellulaire et la dynamique du cytosquelette [208, 209], mais plus précisément des protéines adhérentes E-cadherin RANi [210], Afadin1 et Arf5 (ADP-ribolysation factor 5; Golgi-specific nucleotide exchange factor, GBF1) [211, 212], de la KLC2 (Kinesin Light Chain 2) [213, 214], de la MLC (myosin light chain) [215], et CLIP-170 (cytoplasmic linker protein of 170 kDa) [216-218]. Additionnellement, CLIP-170 serait impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans des modèles d'animaux d'Alzheimer et AMPK aurait un rôle dans cette régulation [213, 219, 220].

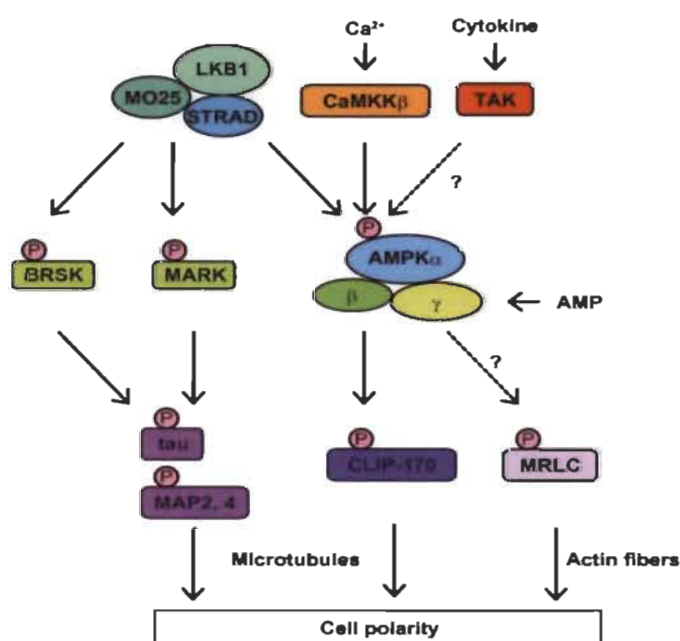


Figure 1.10 Contrôle la polarité cellulaire.

Voies de signalisation de la protéine AMPK liées à la polarité cellulaire. La polarité cellulaire est contrôlée par l'activation des kinases LKB1 et AMPK. La phosphorylation de tau, MAP2 et MAP4 par BRSK (Brain-selective serine/threonine-protein kinase) et MARK contrôlé par LKB1, régule la polarité cellulaire. De même, le contrôle de la dynamique des microtubules par la phosphorylation de CLIP-170 via AMPK affecte la stabilité des microtubules et est important pour établir la polarité cellulaire. Source : [105].

Bien qu'AMPK soit une kinase centrale dans la génération d'ATP, la majeure partie de la synthèse d'ATP se réalise dans les mitochondries. En effet, agissant comme une centrale énergétique, les mitochondries ont comme fonction principale de générer de

l'ATP selon les besoins de la cellule [221]. Elles représentent un lieu dans lequel divers substrats y sont acheminés pour permettre la production en masse de l'ATP [12]. Leur intégrité s'avère nécessaire non seulement pour la production d'ATP, mais aussi pour la survie de la cellule [222].

1.2 Mitochondrie

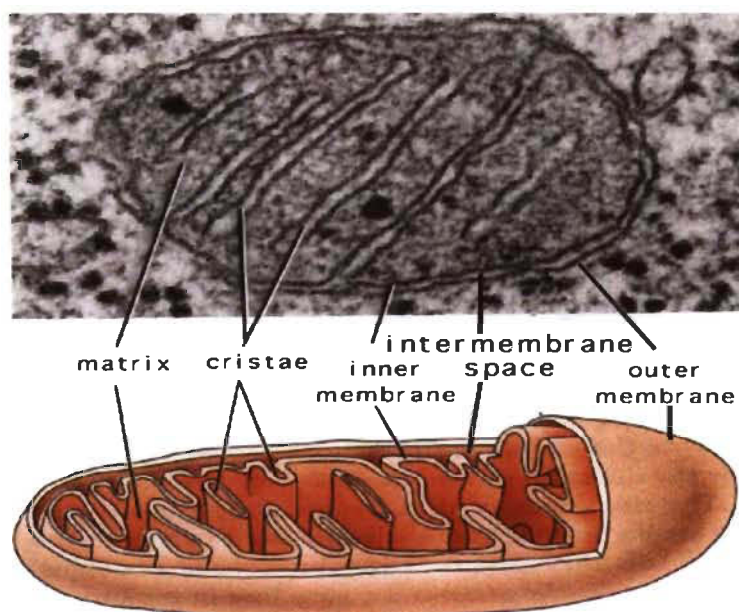


Figure 1.11 Ultrastructure typique d'une mitochondrie normale.

Ce sont des organites composés d'une double membrane, une membrane interne et une membrane externe, d'un espace entre les deux membranes appelé l'espace intermembranaire, et d'une matrice délimitée par la membrane interne. On y trouve également des extensions ou invaginations dans la membrane interne appelées crêtes. C'est à l'intérieur des crêtes que l'on retrouve les complexes protéiques de la chaîne de transport d'électrons nécessaires à la production d'ATP via la phosphorylation oxydative. Source : [232].

Les mitochondries sont des organites intracellulaires constitués d'une double membrane impliquée dans les conversions énergétiques résultant de la respiration cellulaire. Elles sont très dynamiques et leur morphologie varie selon les demandes énergétiques de la cellule [221, 223]. Leur fonction principale est de répondre aux besoins énergétiques cellulaires par la production d'ATP [221, 224, 225] (Figure 1.11). Le rôle

des mitochondries s'étend au-delà de la production d'ATP, car, depuis peu, il a été montré que la dynamique mitochondriale est impliquée dans la régulation de divers processus biologiques comme la reprogrammation métabolique, le contrôle du cycle cellulaire, l'autophagie et l'apoptose [12, 221, 222, 226-228]. De ce fait, il n'est pas surprenant que des dysfonctions mitochondriales soient associées à certaines pathologies comme les désordres métaboliques et les maladies neurodégénératives [23, 224, 229-231].

1.2.1 Caractérisation de la structure mitochondriale

Les mitochondries sont constituées de deux membranes lipidiques et protéiques, les membranes internes (MIM) et externes (MOM), d'un espace intermembranaire (IMS), d'une matrice (Figure 1.11). Elles possèdent également leur propre ADN circulaire (ADNmt) (Figure 1.11) [12, 221, 223].

1.2.1.1 La membrane externe (MOM)

Elle est perméable aux petites molécules et contient de nombreuses protéines transmembranaires appelées porines (canal anionique dépendant du voltage (VDAC) [233])) dont la fonction est le passage des nucléotides, des ions, des acides gras et autres molécules de moins de 7kDa [234]. L'import des protéines à l'intérieur de la mitochondrie se fait par l'intermédiaire d'un système de transport actif régulé, le complexe protéique TOM (Translocase of the outer membrane) [235-237]. Tom est un complexe qui comprend quatre protéines réceptrices (Tom20, Tom22, Tom37 et Tom70), et un pore d'importation général contenant quatre protéines associées (Tom7, Tom6, Tom5 et Tom40) [235, 236, 238, 239]. Les protéines y sont acheminées par un système de reconnaissance par le complexe Tom (Figure 1.12) en interaction avec les chaperonnes cytosoliques, par exemple Hsp90 et Hsp70 (heat shock protein 90, 70) [240]. L'organisation et la régulation de la membrane externe sont associées au lieu d'activation de certains processus biologiques. Par exemple, l'induction de l'apoptose est un processus nécessitant l'activation de certaines protéines de la famille de Bcl-2 qui, une fois activées, régulent la libération de protéines de l'espace entre la MIM et la MOM dans le cytosol,

activant les caspases menant à l'apoptose [241]. Également, une réponse antivirale de l'immunité innée entraîne une réponse inflammatoire à l'interféron initiée par l'assemblage du complexe MAVS (mitochondria anti-viral signaling protein) localisé au niveau de la MOM [242].

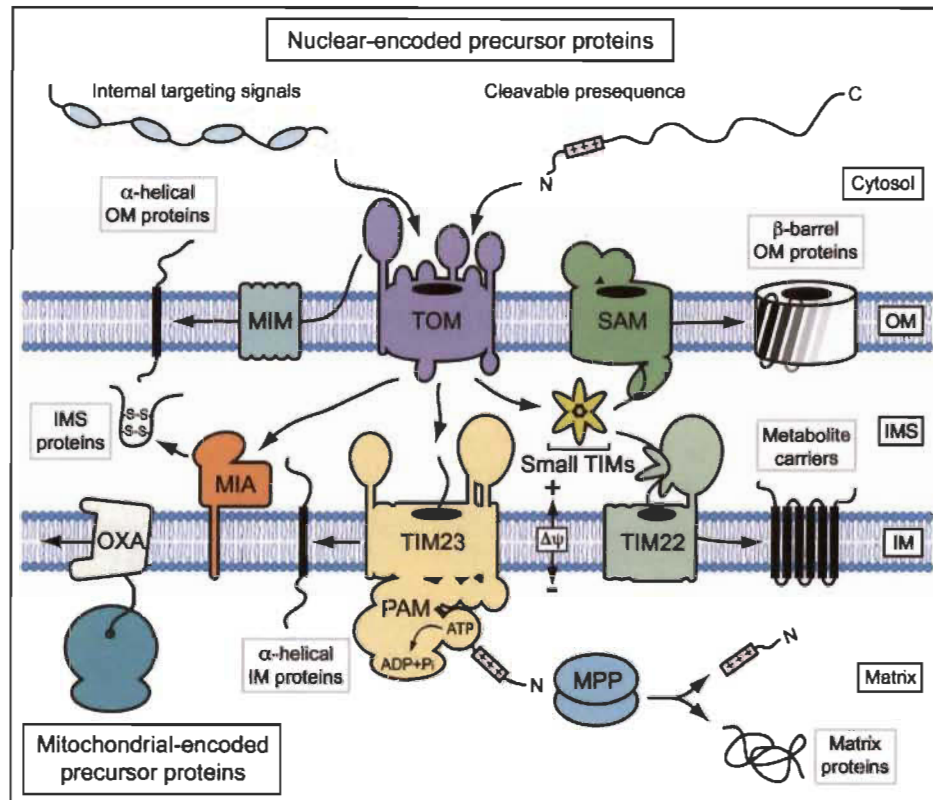


Figure 1.12 Organisation dynamique des machines d'importation de protéines mitochondriales.

La grande majorité des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol et importées par la translocase Tom de la MOM dans l'IMS. La translocase Tim23 peut trier les protéines précurseurs dans la MIM ou, en coopération avec la translocase PAM (presequence translocase-associated motor) dans la matrice. La peptidase MPP (mitochondrial processing peptidase) clive les préséquences amino-terminales dans la matrice. Les protéines mitochondriales sont exportées dans la MIM par la translocase OXA (oxidase assembly) et dans la MOM par les protéines SAM (Sorting and assembly machinery) associées aux tonneaux beta (β -barrel). Source : [243].

1.2.1.2 Espace intermembranaire (IMS)

C'est l'espace délimité par la MOM et la MIM. Sa composition est proche de celle du compartiment cytosolique et constitue le lieu de transit de toutes les molécules diffusant de part et d'autre entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Son milieu est acide et se retrouve saturé en protons transférés depuis la matrice par les quatre complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC) [244]. Il joue un rôle central dans la coordination des activités mitochondriales avec d'autres processus cellulaires par exemple les échanges de protéines, de lipides, d'ions entre la matrice et le cytosol [245], mais également des enzymes spécifiques impliquées dans certains processus par exemple l'élongation des acides gras par l'acyl-CoA ligase, le recyclage de certains acides aminés comme la dégradation du tryptophane par la monoamine oxydase (MAO) ou même des neurotransmetteurs comme l'oxydation de l'adrénaline par la kynurénine 7,8-hydroxylase [12, 223].

1.2.1.3 La membrane interne (MIM)

Elle est composée des enzymes et complexes de la chaîne respiratoire, de l'ATP synthase et de perméases. En effet, c'est le lieu où les réactions d'oxydoréductions et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) s'opèrent menant à la genèse d'ATP [12, 246, 247]. Elle ne contient pas de porines et les protéines diffusent en grande partie entre l'IMS et la matrice par l'intermédiaire de la translocase de la MIM, Tim (Figure 1.12) [235-237]. La membrane interne est structurée en invagination lamellaire et tubulaire appelée crêtes mitochondriales dont la morphologie varie dépendamment de l'activité mitochondriale [247]. Les crêtes sont des extensions lamellaires, tubulaires ou en forme de sac de la membrane interne qui se prolongent depuis la MIM. Elle est continue depuis les jonctions des crêtes et se différencie en membrane limitante interne et le col de la crête [248] (Figure 1.13). Ces crêtes s'étendent plus ou moins profondément dans la matrice et sont les principaux sites de conversion d'énergie mitochondriale [247, 248]. Les pompes à protons de la chaîne de transport d'électrons s'assemblent en super complexes appelés respirasomes [249-251] et sont situées au niveau de la membrane

limitante (ou région membranaire) tandis que l'ATP synthase forme des rangées de dimères dans le col [252, 253].

Organisation of mitochondrial cristae

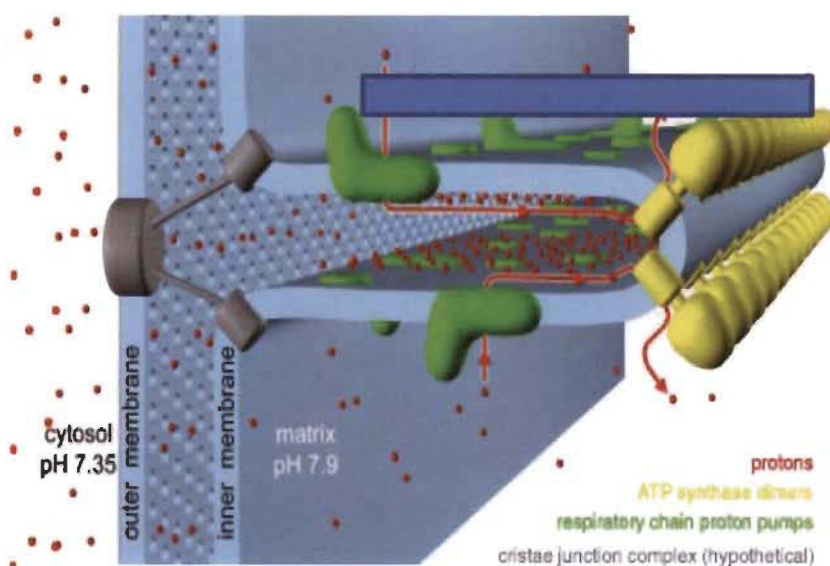


Figure 1.13 Organisation des crêtes mitochondriales.

Les pompes à protons de la chaîne de transport des électrons (vert) sont situées de chaque côté des rangées dans la région membranaire et les dimères d'ATP synthase (jaune) façonnent le col des crêtes mitochondriales. Les supercomplexes pompent les protons (rouges) de la matrice vers l'espace intermembranaire l'ATP synthase et forment un puits pour les protons, les ramenant dans la matrice. Les flèches rouges indiquent la direction du flux de protons. Ces flux permettent aux crêtes de fonctionner comme des conduits de protons menant à une production efficace d'ATP avec le gradient de pH peu profond entre le cytosol et la matrice. Source : [244].

Dans toutes les mitochondries, ces pompes représentent la plus grande partie de la surface de la membrane interne, ce qui souligne leur importance pour la physiologie cellulaire [244]. Ce réarrangement phénotypique a été associé à l'efficacité de la cellule à générer de l'ATP selon certaines conditions [244, 248, 254, 255]. De même, dans les mitochondries, le système de contact mitochondrial et le système d'organisation des crêtes (MICOS, mitochondrial contact site and cristae junction organizing system) permettent l'ancrage des crêtes à la MOM au niveau des jonctions [248] (Figure 1.14). L'interface MICOS est un assemblage d'une protéine soluble et de cinq protéines membranaires qui

permet l'ancrage des crêtes à la MOM [248]. Il semblerait que le complexe MICOS forme une barrière de diffusion au sein de la membrane interne entre les jonctions des crêtes pour expliquer la ségrégation latérale des protéines entre les crêtes et les membranes limitantes [247, 256]. La régulation de la structure des crêtes est menée par la protéine OPA1 (optic atrophie type 1), impliquée dans l'assemblage des complexes de l'ETC [254, 255, 257, 258], et la protéine AIF (apoptosis inducing factor), qui promeut spécialement l'assemblage du complexe I de l'ETC [259, 260] (Figure 1.14). Une dysfonction de l'une ou l'autre entraîne une altération mitochondriale grave, causant des pathologies irréversibles telle l'atrophie musculaire ou neurodégénérescence [261, 262].

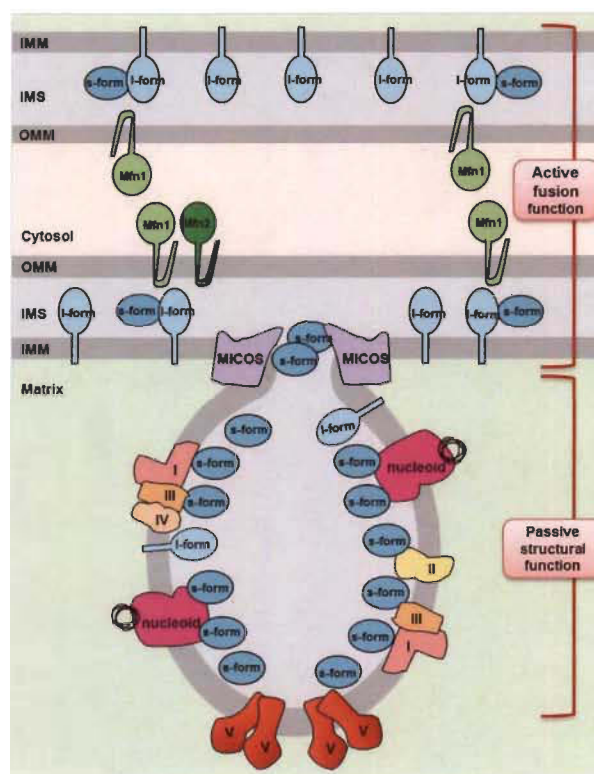


Figure 1.14 Représentation schématique de la régulation de la structure des crêtes. Les isoformes d'OPA1 (s-forme et l-forme) permettent le remodelage de la structure des crêtes favorisant la fusion de la membrane limitante et de la MOM, l'ancrage de l'ADNmt et l'organisation du respirasome ainsi que de l'ATP synthase. Le complexe MICOS est enrichi aux jonctions de la crête qui relie la MIM et la crête. Le sous-complexe MIC60 (mitofilin) forme également des sites de contact avec plusieurs protéines de la MOM, y compris les translocases TOM et SAM. Source : [263].

1.2.1.4 La matrice

Elle représente la région délimitée entièrement par la MIM. À l'intérieur, on y trouve plusieurs copies du génome circulaire mitochondrial (ADNmt) de 16 kilobase, des ribosomes, des ARN de transfert mitochondriaux, des enzymes solubles, des molécules organiques, des cofacteurs nucléotidiques et des ions inorganiques [264] (Figure 1.15). Les ribosomes mitochondriaux sont attachés à la membrane de la matrice et leur rôle est la traduction des protéines mitochondriales qui s'insèrent directement dans la MIM [265]. Les enzymes métaboliques de la matrice permettent les réactions responsables de la production d'ATP et les cofacteurs NAD/NADP (nicotinamide adenine dinucleotide/ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) et FAD/FADP (flavin adenine dinucleotide/ flavin adenine dinucleotide phosphate) sont utilisées dans la matrice en vue des réactions d'oxydoréductions du TCA et facilitant le transfert d'électrons entre les différents complexes du TCA (tricarboxylic acid cycle, Krebs cycle). L'ADNmt est compacté en forme sphérique appelée nucléoïde [266, 267] dont la transcription et la régulation se font sous le contrôle du facteur de transcription TFAM (transcription factor A mitochondrial) [268-272]. Il contient 37 gènes codant pour 13 protéines, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux. Les 13 protéines codées par le gène mitochondrial sont toutes des sous-unités protéiques des complexes enzymatiques du système de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) générant la majorité de l'ATP cellulaire [270, 273, 274]. Cependant, l'ADNmt ne peut produire indépendamment toutes les protéines nécessaires pour le fonctionnement des mitochondries [274]. Toutes les autres protéines mitochondriales sont codées par des gènes de l'ADN nucléaire et sont requises également pour la transcription, la traduction, la modification et l'assemblage des protéines de l'ADNmt [275]. Également, les protéines impliquées dans les autres voies mitochondriales sont également codées dans l'ADN nucléaire comprenant le TCA, l'importation de protéines, l'oxydation des acides gras et des acides aminés, l'apoptose et la biosynthèse des corps cétoniques, pyrimidines, l'hème et l'urée [273] (Figure 1.15).

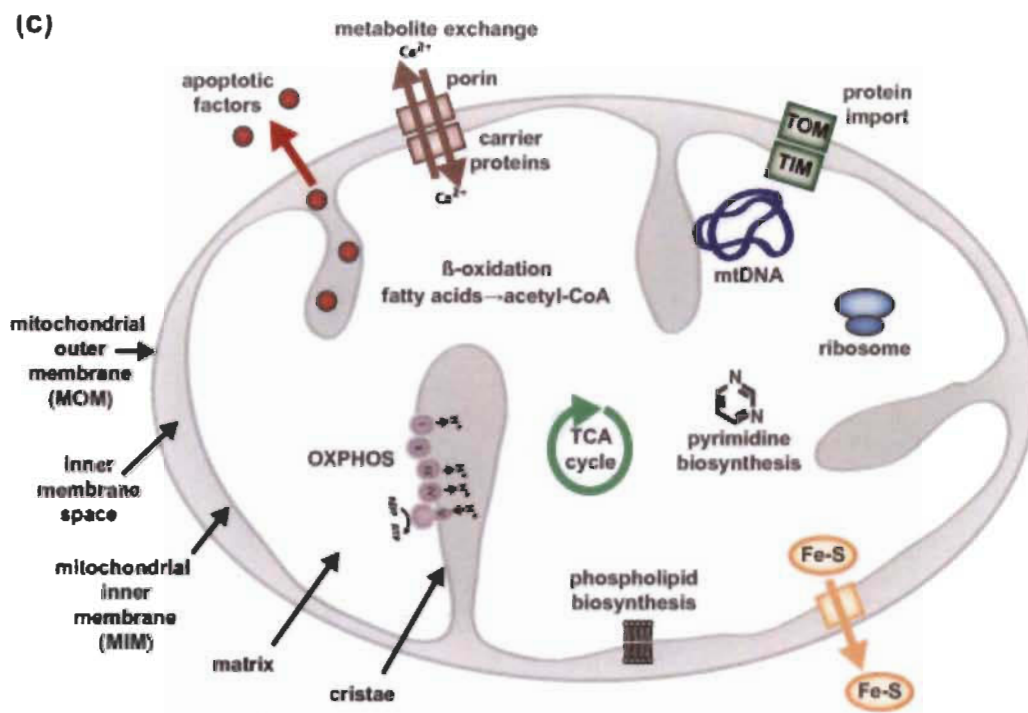


Figure 1.15 **Forme et fonctions des mitochondries.**

Les mitochondries possèdent deux membranes structurellement et fonctionnellement distinctes, la MOM et MIM qui entourent respectivement deux compartiments, l'espace membranaire interne (IMS) et la matrice. À l'intérieur de la matrice se trouve le génome mitochondrial circulaire (ADNmt), qui code les composants protéiques des complexes respiratoires I à IV. La MIM, la membrane la plus dense en protéines de la cellule, adopte des plis élaborés appelés cristae dans lesquels sont logés des complexes respiratoires assemblés. En plus de la production d'ATP via la phosphorylation oxydative, les mitochondries jouent un rôle crucial dans la biosynthèse des phospholipides, l'échange des métabolites et des ions, la β -oxydation des acides gras, la biosynthèse de pyrimidine et le stockage et la libération de facteurs apoptotiques. Source : [276].

Les mitochondries, en plus de la production d'énergie cellulaire, ont une multitude de fonctions qui jouent un rôle critique dans la progression du cycle cellulaire, la différenciation, le développement, les réponses immunitaires, l'homéostasie des lipides et du calcium et la mort cellulaire par apoptose [276].

1.2.2 Fonctions mitochondriales

1.2.2.1 Production d'ATP

L'étape préalable à la production d'ATP est l'assimilation dans le cytoplasme du glucose qui est utilisé lors de la glycolyse (ce processus a pour but de produire du pyruvate nécessaire à la genèse d'ATP) [27]. Le pyruvate est soit directement métabolisé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), donnant un faible rendement d'ATP (glycolyse anaérobie), ou peut être transporté dans la mitochondrie où il est métabolisé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour initier le cycle tricarboxylique (TCA, glycolyse aérobie), donnant un plus grand rendement d'ATP [277] (Figure 1.16). Le TCA est la voie métabolique finale commune de la dégradation du glucose, des lipides, des protéines et des acides aminés pour la production d'ATP. Dans ce cycle, la première étape de la genèse d'ATP est la production en boucle des cofacteurs NADH et FADH qui sont des accepteurs d'électrons nécessaires au fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire pour générer de l'ATP [278] (Figure 1.16).

Les déshydrogénases du cycle TCA sont stimulées par l'apport de calcium mitochondrial (Ca^{2+}) propulsant la réduction du NAD oxydé en NADH [280, 281]. Le TCA ou cycle de Krebs aussi connu sous le nom du cycle de l'acide citrique (CAC), constitue une série de réactions chimiques en boucle pour libérer l'énergie stockée par oxydation de l'acétyl-CoA provenant de la dégradation des glucides, des lipides et des protéines [282]. Le cycle consomme de l'acétate provenant de l'acétyl-CoA et de l'eau, réduit le NAD^+ en NADH et produit du dioxyde de carbone [282]. Le cycle commence par le transfert de deux groupes acétyle de l'acétyl-CoA à quatre carbones d'oxaloacétate pour former le citrate, un composé à six carbones [282]. Le citrate suit une série de transformation, et se termine par la restauration de l'oxaloacétate puis le cycle recommence à nouveau [282] (Figure 1.16). Le NADH et FADH générés par le cycle de l'acide citrique sont utilisés par les complexes de l'ETC pour l'OXPPOS [282]. La seconde étape est la génération d'un gradient de protons à travers la membrane des crêtes (Figure 1.17). Trois des grands complexes de l'ETC, le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), III (cytochrome *c* reductase) et IV (cytochrome *c* oxydase) y sont impliqués [244, 251, 283].

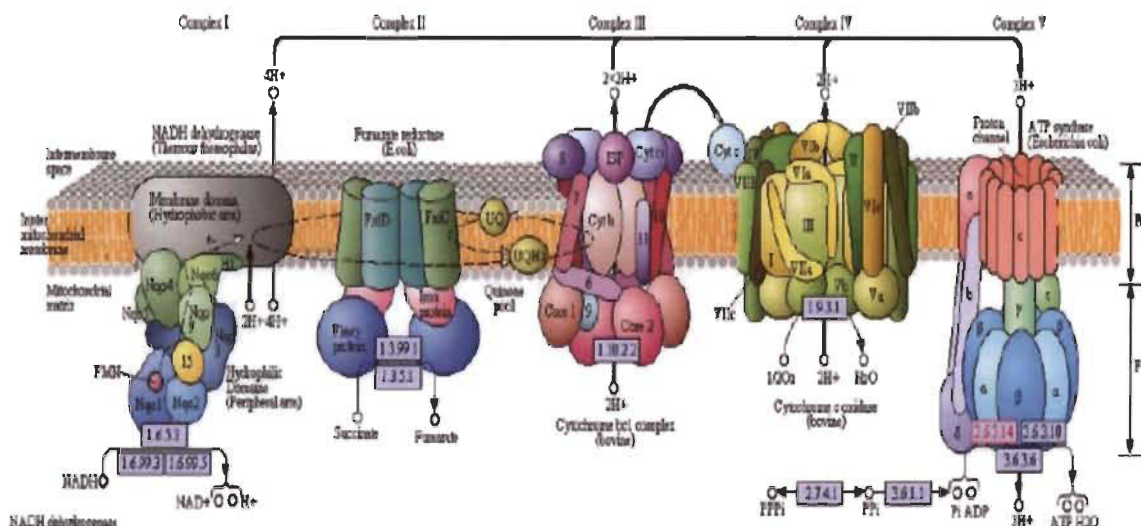


Figure 1.17 Chaîne de transfert d'électrons dans la MIM de la mitochondrie.

La chaîne de transfert d'électrons contient cinq complexes appelés complexes I, II, III, IV et V (F₁F₀-ATP synthase). Le gradient électrochimique H⁺ fourni par ces complexes liés à la membrane sert de source d'énergie pour la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique par une F₁F₀-ATP synthase. Source : [284].

Le complexe I transfère les électrons de NADH au quinol et l'énergie libérée est utilisée pour pomper quatre protons de la matrice dans l'IMS [285]. Le complexe III récupère les électrons du quinol réduit et les transfère au cytochrome C en pompant un proton dans le l'IMS [285]. Enfin, le complexe IV transfère les électrons du cytochrome C vers l'oxygène et contribue au gradient de protons en utilisant quatre protons par molécule d'oxygène consommée pour produire de l'eau (Respiration cellulaire, OXPHOS) [283, 286]. Le complexe II (succinate déshydrogénase) transfère les électrons du succinate directement au quinol et ne contribue pas au gradient de protons [281].

La dernière étape est la génération d'ATP (Figure 1.16). L'ATP synthase est une ancienne turbine conservée qui produit de l'ATP en utilisant le gradient de protons électrochimiques à travers la MIM [252]. Il récupère ces protons dans l'IMS pour les transférer dans la matrice. Ce transfert permet à la turbine de générer de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique [287]. Ici, la production d'ATP dépend donc de l'absorption d'oxygène, du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et de la chaîne de transport des électrons (ETC).

L'utilisation du glucose ne reste cependant pas la seule source utilisée par la cellule pour générer de l'ATP. La dégradation des lipides constitue également une source importante qui s'intègre au TCA (Figure 1.16). En effet, les triglycérides sont métabolisés en glycérol et en acides gras. Le glycérol peut être converti en glucose via la dihydroxyacétone phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate dans le cadre de la néoglucogenèse dans le foie [167, 168]. La β -oxydation permet de produire de l'ATP à partir de la dégradation des acides gras. Les acides gras à courtes chaînes diffusent directement dans la matrice mitochondriale où ils sont métabolisés en acyl-CoA [174, 288] (Figure 1.16). Les acides gras à chaînes longues doivent d'abord être métabolisés en acylcarnitine dans le cytosol, transférés dans l'IMS par le transport de la carnitine puis transloqués dans la matrice par la carnitine-acylcarnitine translocase [174, 288]. Une fois dans la matrice, ils libèrent leur groupement acyl à une coenzyme A pour devenir des acétyl-CoA. Dans les deux processus, l'acétyl-CoA obtenue intègre le TCA en étant fusionné avec une molécule d'oxaloacétate afin de générer une molécule de citrate [288, 289]. Parfois, les acides gras issus des triglycérides peuvent avoir un nombre impair d'atomes et donc sont métabolisés en propionyl-CoA qui est à son tour convertie en succinyl-CoA, un intermédiaire susceptible d'intégrer également le TCA [289, 290]. Les acides aminés peuvent également servir de source de carbone pour le TCA (Figure 1.16). Un exemple fort identifié est celui du cycle glutamate-glutamine, qui peut intégrer le TCA par l' α -cétoglutarate. Il peut aussi être métabolisé en acétyl-CoA pour intégrer le TCA comme le cas de la leucine, l'isoleucine, la lysine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine [291].

1.2.2.2 Reprogrammation métabolique

Les mitochondries sont les principaux régulateurs du métabolisme. Elles génèrent de l'ATP par OXPHOS en utilisant du pyruvate dérivé du glucose lors de la glycolyse ou des acides gras, tous les deux utilisés comme source de combustible et oxydés dans le TCA [292] (Figure 1.16). Les besoins métaboliques des cellules diffèrent en fonction de leur cycle. Chaque type de cellule dans un état spécifique peut avoir une signature métabolique distincte, permettant de répondre à sa demande énergétique particulière

[293]. Des études révèlent que la morphologie mitochondriale peut être modifiée en fonction des états énergétiques des cellules pour favoriser leur survie. Le métabolisme peut ainsi balancer entre un phénotype glycolytique avec une faible phosphorylation oxydative, et un phénotype caractérisé par un niveau élevé de la FAO (fatty acid oxydation) et de la phosphorylation oxydative [150, 294] (Figure 1.18). La réversibilité de nombreuses réactions du cycle du TCA et l'existence de multiples circuits anaplérotiques (rétablissement de la concentration des métabolites du TCA dans le milieu mitochondrial pour y maintenir sa constance) permettent aux mitochondries d'assurer une telle adaptation métabolique [295, 296]. L'un des principaux intermédiaires clés du TCA est le citrate, fonctionnant comme un nœud majeur de la flexibilité, car il se situe à une intersection cruciale entre le métabolisme catabolique et anabolique [297]. En plus d'alimenter le mode oxydatif du TCA, il peut également être converti en acétyl-CoA pour être exporté dans le cytoplasme et le noyau où il peut être utilisé pour la synthèse d'acides gras et de cholestérol [296, 298]. Il peut également être utilisé pour les réactions d'acétylation, régulant la transcription ainsi que certains processus cellulaires, comme l'autophagie [299, 300]. La conversion du citrate en acétyl-CoA est nécessaire dans les cellules cancéreuses ou proliférantes, mais pas pour les cellules normales [301, 302].

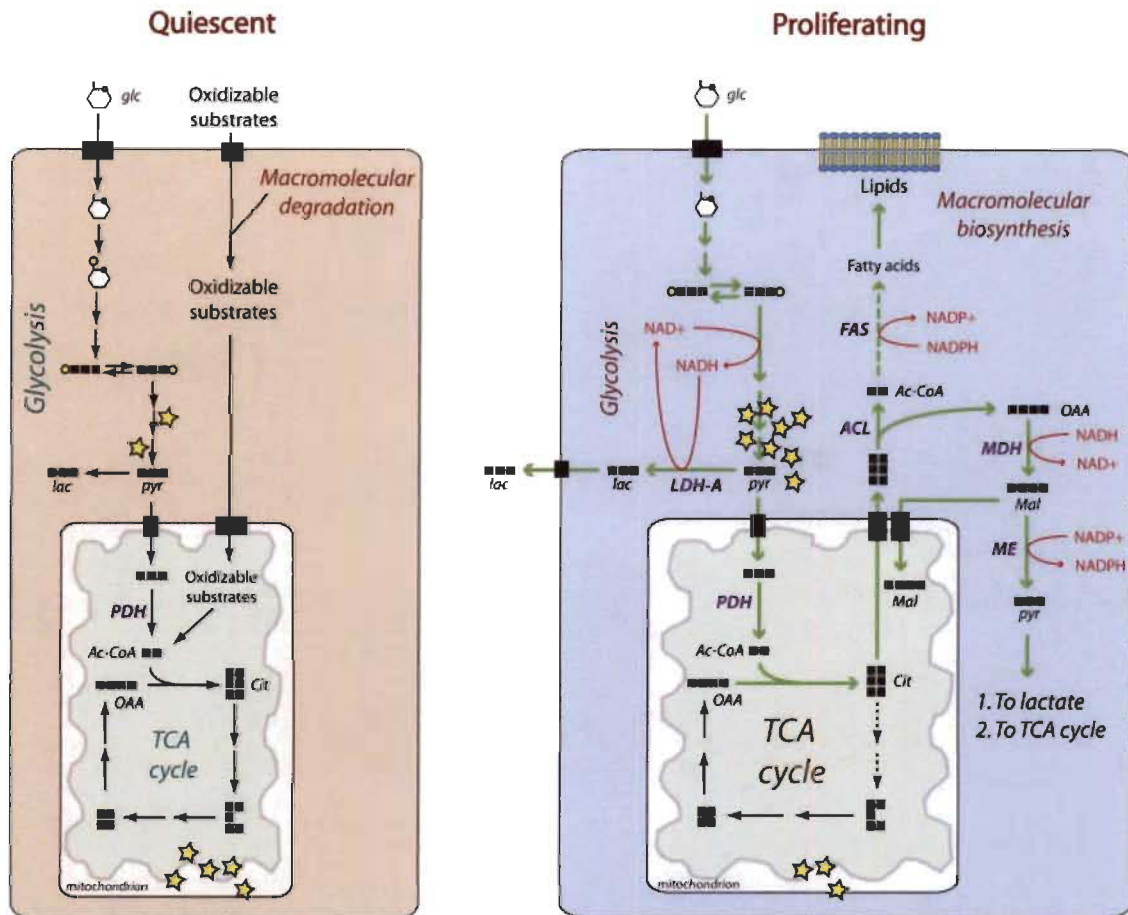


Figure 1.18 Différence de métabolisme entre les cellules quiescentes et proliférantes.

Les cellules au repos (à gauche) ont un taux de glycolyse basal, convertissant le glucose (glc) en pyruvate (pyr), qui est ensuite oxydé dans le cycle du TCA. Les cellules peuvent également oxyder d'autres substrats, tels que les acides aminés et les acides gras provenant du cytosol pour fournir des intermédiaires aux TCA. La majorité de l'ATP (étoiles jaunes) est générée par OXPHOS. Au cours de la prolifération (à droite), la forte augmentation du flux glycolytique génère rapidement de l'ATP dans le cytoplasme. La majeure partie du pyruvate est convertie en lactate (lac) par le lactate déshydrogénase A (LDH-A), qui régénère le NAD^+ à partir du NADH permettant à la glycolyse de persister. Une partie du pyruvate est convertie en acétyl-CoA (Ac-CoA) par le pyruvate déshydrogénase (PDH) et entre dans le cycle du TCA, où il est converti en intermédiaire tel que le citrate (cit) qui est nécessaire à la synthèse des acides gras et du cholestérol utilisés pour générer des membranes lipidiques pour les cellules filles. Le citrate peut être utilisé pour produire du malate (mal) via la malate déshydrogénase (MDH). Le malate peut soit être renvoyé vers les mitochondries, soit être converti en pyruvate par l'enzyme malique (ME), générant le NADPH à utiliser dans la synthèse des acides gras. Source : [150].

De plus, le niveau physiologique des espèces réactives d'oxygène (ROS) contribue à la régulation de la morphologie mitochondriale [303], intervenant non seulement dans la biogenèse mitochondriale, mais aussi dans le contrôle du métabolisme mitochondrial [304]. En effet, il a été montré dans de multiples tumeurs que la surexpression d'inhibiteur de l'ATPase 1 (ATPIF1, ATPase inhibitory factor 1) favorise la dimérisation du complexe V pour limiter la production d'ATP et augmente la génération de ROS [305, 306]. De manière générale, les cellules non prolifératives utilisant la voie OXPHOS pour la génération d'ATP ont une augmentation des enzymes favorisant le catabolisme, fournissant divers substrats intermédiaires qui peuvent intégrer le TCA (Figure 1.18). À l'inverse, les cellules proliférantes, à savoir les cellules cancéreuses et les cellules souches, utilisent la glycolyse plutôt qu'un métabolisme plus oxydatif [293, 294, 307]. Elles convertissent le pyruvate en lactate comme produit de la glycolyse (Figure 1.18) et sont dépendantes du cycle glutamate-glutamine pour compléter le TCA (Figure 1.19) : c'est l'effet Warburg [26, 30, 151, 308]. Elles expriment également une forme particulière de l'enzyme PFKF (6-phosphofructo-2-kinase), la PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) qui favorise la glycolyse [309]. En parallèle, l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) est inhibée par l'enzyme PDK1 (pyruvate déshydrogénase kinase 1), ce qui diminue la conversion du pyruvate en acetyl CoA pour le TCA [310]. Le citrate produit dans le TCA sort de la matrice mitochondriale et peut suivre la voie de conversion lipidique par les 2 enzymes ACC1 et HMGCoA [151]. De plus, il est connu que l'activité de la pyruvate kinase M2 (PKM2) est augmentée dans les cellules cancéreuses, essentielles pour la régulation de la glycolyse [311]. En effet, les études récentes indiquent que la translocation nucléaire de la PKM2 régule l'effet Warburg dans les tumeurs par la régulation de l'expression de nombreuses enzymes pro-glycolytiques [312, 313].

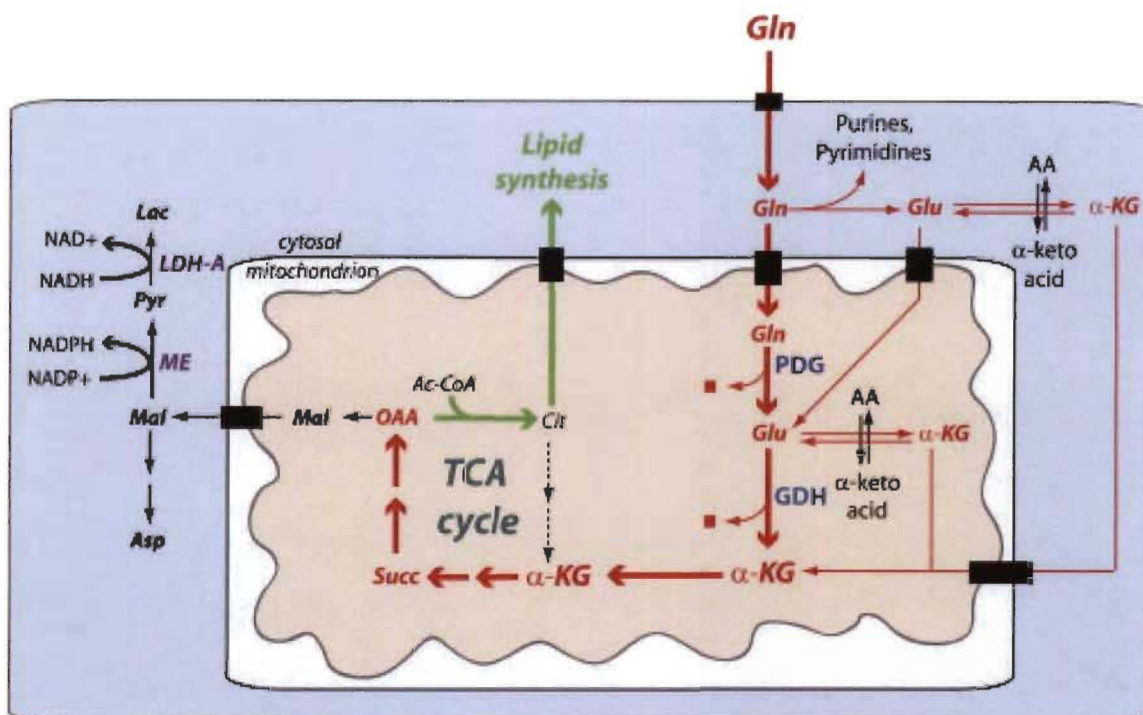


Figure 1.19 La glutamine permet aux cellules en prolifération d'utiliser les intermédiaires du cycle TCA en tant que précurseurs de la biosynthèse. La cellule proliférante utilise le citrate pour la synthèse des lipides (flèches vertes), ce qui entraîne une perte d'oxaloacétate à partir du cycle TCA. Le réapprovisionnement en OAA (anaplérose) résulte du métabolisme complexe de la glutamine (Gln, flèches rouges). Dans le cytosol, la glutamine donne de l'azote aux purines et aux pyrimidines, entraînant la formation de glutamate (Glu). Le glutamate donne son groupe amino aux acides α -cétoniques pour former des acides aminés non essentiels et de l' α -céto glutarate (α -KG), qui peut pénétrer dans les mitochondries. La glutamine peut également être transformée en glutamate dans la matrice mitochondriale par la glutaminase PDG (phosphate-dépendant glutaminase), qui libère le groupe amido de la glutamine sous forme d'ammoniaque libre (carré rouge). Le glutamate mitochondrial peut être converti en α -KG par le glutamate déshydrogénase (GDH) ou les aminotransférases intra-mitochondriales. Pendant l'anaplérose, α -KG entre dans le cycle TCA et produit de l'OAA. En plus de son utilisation comme source d'OAA, le carbone de glutamine peut être converti en lactate (glutaminolyse). Ce processus génère à la fois NADPH et NAD⁺ dans le cytoplasme. L'ammoniaque générée pendant le métabolisme de la glutamine est principalement sécrétée par la cellule. Autres abréviations : Asp, aspartate; Succ, succinate; AA, acide aminé. Source : [150].

1.2.2.3 Signalisation

Les mitochondries sont apparues comme des organites de signalisation contribuant aux décisions critiques sur la prolifération, la différenciation, et la mort cellulaire [314]. L'apoptose est un des processus biologiques intimement lié à fonction mitochondriale [241, 315] (Figure 1.20). La famille des protéines Bcl-2 est constituée de membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-XL (Bcl-2-extra large) et pro-apoptotiques tels que Bax (Bcl-2-associated X), Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) et Bid (BH3 interacting-domain death agonist)[316]. Les membres anti-apoptotiques sont initialement des protéines membranaires que l'on trouve surtout dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire [316]. La grande majorité des protéines pro-apoptotiques sont localisées au cytosol, mais une fois activées, changent de conformation ce qui leur permet de cibler et d'intégrer la membrane externe mitochondriale agissant comme des protéines pro-apoptotiques. Chacune de ces protéines pro-apoptotiques, transférées dans la mitochondrie, mène à la libération du cytochrome c, ce qui activera la cascade des caspases menant à la mort cellulaire [315]. Le cytochrome c'est un composant de l'ETC dont la fonction principale est de transférer des électrons du cytochrome c oxydase (ou coenzyme Q10) au complexe IV [251]. Le cytochrome s'est également impliqué dans l'initiation de l'apoptose. Lors de sa libération, dans le cytoplasme, il se lie au facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique (Apaf-1, Apoptotic protease activating factor 1) activant les caspases menant à l'apoptose [317]. Il a également été observé que durant l'apoptose, le potentiel membranaire décline se traduisant par la baisse de production d'ATP et que son maintien prévient la mort cellulaire [318]. Une condition physiologique dans laquelle les cellules sont sensibles à l'apoptose est le starvation. En effet, 48 heures sont nécessaires pour favoriser la mort cellulaire dans des lignées wild-type cellulaires du cancer colorectal humain (HCT116) dans un milieu sans acides aminés [319].

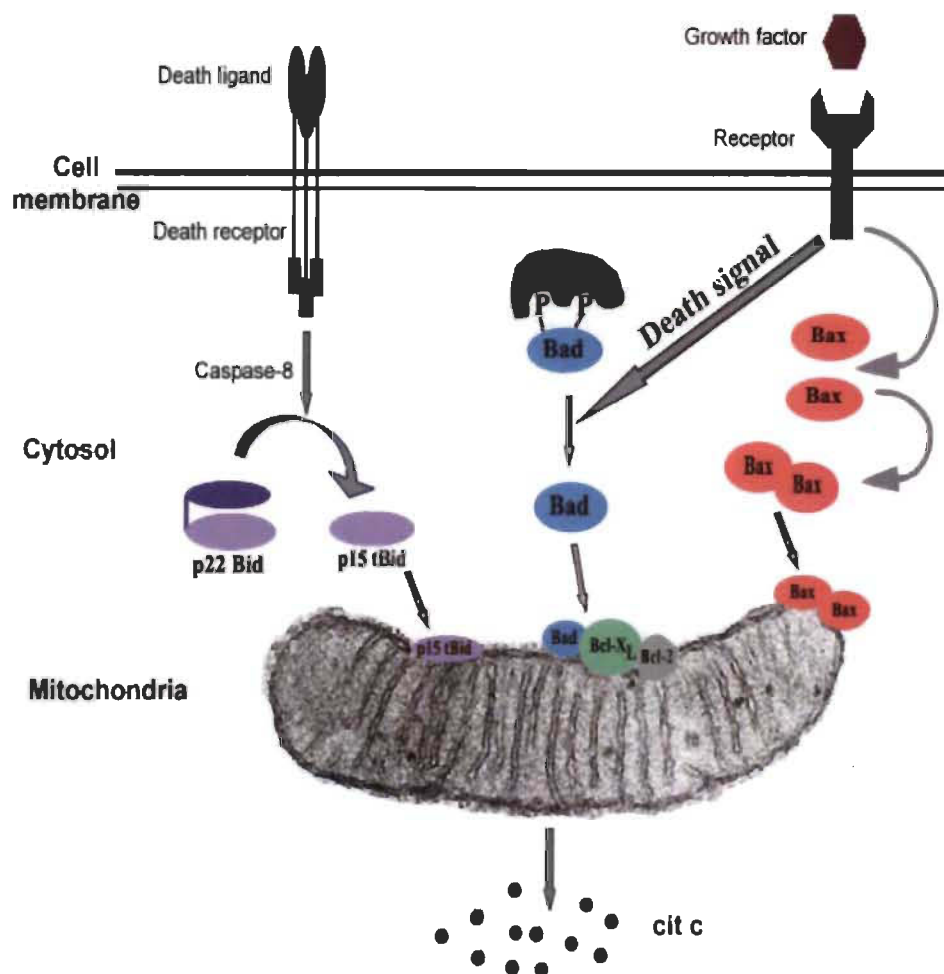


Figure 1.20 Modèle schématique des voies de signalisation de l'apoptose impliquant les protéines pro-apoptotiques Bcl-2.

L'activation des récepteurs d'apoptose conduit au clivage de la protéine Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist) par la caspase 8 activée (non représenté), générant un p15tBid qui transloque vers les mitochondries. L'absence de facteur de croissance induit la dimérisation et la translocation de Bax vers la membrane mitochondriale. Le même type de stimulus par une molécule 14-3-3 peut bloquer les kinases inhibantes et séquestrant Bad dans le cytosol. Une fois active, Bad transloque dans les mitochondries et s'associe avec les protéines Bcl-XL et Bcl-2. Chacune de ces protéines pro-apoptotiques, une fois transloquées dans les mitochondries, peut induire la libération du cytochrome c, ce qui active la cascade des caspases. Source : [315].

Depuis une dizaine d'années, il a été observé que les cellules immunitaires passent d'un état de repos métabolique à un état métabolique hautement actif pendant la phase d'activation d'une réponse immunitaire. Cette conversion nécessite un changement du

métabolisme cellulaire variant d'un métabolisme catabolique à un métabolisme anabolique, répondant et modifiant la signalisation pour stimuler les phénotypes des cellules immunitaires [314]. Le citrate tout comme le succinate et les ROS sortant de la mitochondrie, ont récemment été identifiées comme des molécules régulant la signalisation des réponses immunitaires innées et adaptatives [292, 311, 314, 320-322].

La régulation du métabolisme cellulaire et mitochondrial est contrôlée par de nombreux facteurs transcriptionnels. Récemment, la famille des coactivateurs PGC1 a été identifiée comme le principal régulateur du métabolisme [323]. PGC-1 α est le coactivateur le plus connu; il régule et induit la biogenèse mitochondriale en activant différents facteurs de transcription, dont le facteur respiratoire nucléaire 1 et le facteur respiratoire nucléaire 2 (NRF1 et NRF2) [324]. Ces deux facteurs activent le facteur de transcription mitochondrial TFAM qui est impliqué dans la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial [191] (Figure 1.10).

Bien que la biogenèse mitochondriale permette d'abord de maintenir l'intégrité des mitochondries selon les besoins énergétiques de la cellule, elle permet aussi d'augmenter leur efficacité à la production d'ATP [12, 185, 223]. Cependant, les mitochondries sont également des organites très dynamiques [276]. En effet, elles forment un réseau tubulé qui peut continuellement passer d'un état allongé et connecté à un état fragmenté via des processus de fusion et de fission, indépendamment du cycle cellulaire [325]. Le maintien de la forme de ce réseau complexe est essentiel à la fois pour les fonctions mitochondriales et cellulaires. Il met en jeu la dynamique, la motilité et l'ancrage mitochondrial [222, 276].

1.2.3 Dynamisme mitochondrial

Le dynamisme mitochondrial, qui implique principalement des processus de fusion et de fission mitochondriales, est régulé par une famille de GTPases homologue à la Dynamine et permet le maintien des mitochondries saines, l'élimination des mitochondries défectueuses par le processus d'autophagie et la bonne marche des processus biologiques dépendants des conditions de stress [223, 228, 258, 276, 325-327].

1.2.3.1 Fusion

La fusion mitochondriale est régulée par les mitofusines (Mfn 1 et 2) situées dans la MOM et par OPA1 situées au niveau des crêtes de la MIM (Figure 1.21). Mfn1 et Mfn2 sont impliquées dans la régulation de la fusion de la MOM [12, 328, 329]. OPA1 régule la fusion de la MIM, contrôle la restructuration des crêtes et l'efficacité de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ainsi que la maintenance de l'ADNmt [225, 255, 257, 330, 331]. En effet, l'oligomérisation d'OPA1 permet le resserrement des crêtes en jonctions serrées, ce qui favorise le maintien de leur structure, mais favorise également la séquestration du cytochrome c dans l'IMS [254, 332]. La perte d'OPA1 provoque une fragmentation du réseau mitochondrial, associée à une désorganisation structurelle des crêtes [333-335], de même qu'une réduction de la prolifération cellulaire, du potentiel membranaire mitochondrial, de la respiration oxydative [333, 336] sans oublier une réduction de la quantité d'ADNmt [337]. De même, la surexpression contrôlée et partielle d'OPA1 favorise la stabilisation des crêtes mitochondriales, conduisant à son tour à une efficacité respiratoire accrue [338]. OPA1 existe sous deux formes, les longues et courtes. Leur association est nécessaire pour une fusion mitochondriale efficace [334, 339]. La prédominance des formes longues stimule la fusion membranaire [340]. Des études réalisées sur des fibroblastes ont révélé la présence de dysfonctionnements mitochondriaux dans les cellules mutées d'OPA1, causant une désorganisation de la structure des crêtes, un déficit en OXPHOS, une altération de la dynamique mitochondriale et une perturbation du maintien de l'ADNmt [341].

La diminution de la disponibilité des nutriments, la diminution de l'ATP ou le manque d'acides aminés mène à l'initiation de la fusion mitochondriale [185, 343, 344]. Lorsque ces conditions arrivent, les cellules doivent maximiser la production d'énergie qui repose principalement sur des substrats internes, tels que les acides aminés résultant du catabolisme des protéines [345]. Ce procédé permet dans un premier temps de protéger les mitochondries saines de l'autodégradation par autophagie, mais aussi d'augmenter l'efficacité de la production d'ATP [185, 325]. L'expansion de la surface des crêtes et la dimérisation de l'ATP synthase induite dans les mitochondries allongées, médiées par la

protéine OPA1, servent également de mécanisme pour améliorer l'efficacité de la production d'ATP [346]. De ce fait résulte une restructuration des crêtes en jonction serrée, produisant efficacement plus d'ATP [185]. Il a été démontré qu'un stress métabolique par l'absence d'acides aminés induit également l'élongation des mitochondries. Lors de ce processus, l'activité de l'AMP cyclique (AMPC) augmente et active la protéine kinase A (PKA). PKA phosphorylerait la protéine pro-fission DRP1 qui étant retenue dans le cytosol favorise donc la fusion mitochondriale [185].

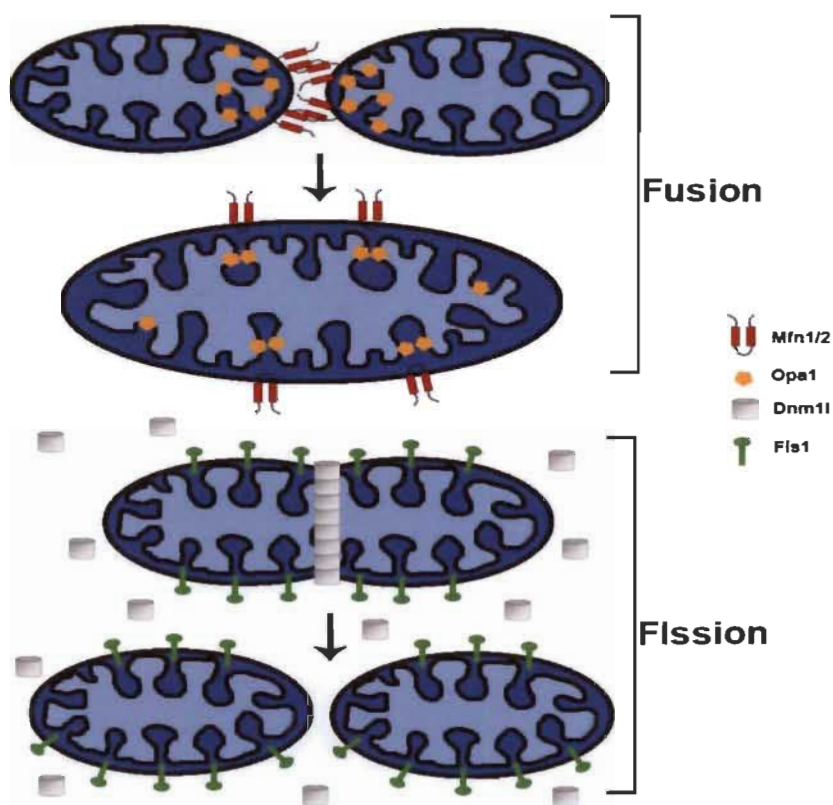


Figure 1.21 Représentation schématique du dynamisme mitochondrial. Les mitofusines 1 et 2 (Mfn1/2) permettent la fusion de la MOM tandis que OPA1 régule la fusion de la MIM. À l'inverse, les récepteurs membranaires Fis1 (en vert) et MFF (non représenté) ancrés dans la MOM recrutent la protéine DRP1 (DNM1l) depuis le cytosol entraînant la formation d'anneaux autour des mitochondries menant à une séparation séquentielle de la membrane interne et externe. Source : [342].

1.2.3.2 Fission

La fission est régulée par la GTPase dynamin-related protein 1 (DRP1). DRP1 est ubiquitaire dans le cytosol. Elle est recrutée par les récepteurs mitochondriaux Fis1 (Mitochondrial fission 1 protein) et Mff (Mitochondrial fission factor) à la surface des mitochondries, et forme des complexes en forme d'anneau autour du site de fission, menant à la constriction de l'organite [330, 347, 348] (Figure 1.21). Elle comporte un site d'activation, la sérine en position 616 (S616) et un site d'inhibition, la sérine en position 637 (S637), tous les deux modulés par une phosphorylation. La PKA, activée par l'AMPc, phosphoryle DRP1 sur la S637 et le retient donc dans le cytosol inhibant la fission. À l'opposé, la cycline b connue pour son implication dans la mitose, est une protéine favorisant la constriction mitochondriale [325, 349-351]. Elle se lie à la kinase cdk1 et phosphoryle DRP1 sur la S616 ce qui mène à un recrutement de DRP1 au site de constriction. De même, la protéine phosphatase 2B ou calcineurine peut déphosphoryler la sérine S637 entraînant la translocation de celle-ci dans la mitochondrie [349, 352, 353]. Une fragmentation du réseau mitochondrial a été observée sous certaines conditions comme l'hypoxie, un stress ou l'exercice, la progression du cycle cellulaire, la mitose, l'apoptose, la mitophagie ou même la reprogrammation métabolique [354]. La mitose nécessite une ségrégation adéquate des mitochondries entre deux cellules filles. Cette ségrégation est médiée par la fission mitochondriale dépendant de DRP1, qui induit la phosphorylation de la kinase promotrice de la mitose Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1)/cycline B, fragmentant les mitochondries au début de la mitose [355] et favorisant la transition de phase G1/S [356], ce qui promeut la prolifération cellulaire. De même, des états alternatifs d'épuisement métabolique, tels que la suppression ou l'élimination de l'oxygène lors de l'hypoxie et l'anoxie, entraînent un phénotype augmentant la fragmentation mitochondriale [357, 358]. Également, il a été observé une fragmentation médiée par DRP1 lors d'un stress, d'un exercice ou de l'activation des β -adrénergiques par la PKA dans les cellules musculaires de la souris [359]. Pour finir, la voie apoptotique intrinsèque dépendante des mitochondries repose sur la perméabilisation de la membrane MOM (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) et sur les médiateurs de la mort cellulaire, tels que le cytochrome c, qui sont libérés des mitochondries dans le

cytosol [246, 360-362]. Le rôle de DRP1 a été détecté dans son association avec la protéine Bax (bcl-2-associated X protein) au niveau des sites de fission mitochondriale, contribuant à la perméabilisation MOM et à la libération du cytochrome c [363].

1.3 Problématique

AMPK est une kinase cruciale activée lors d'un stress énergétique, c'est-à-dire lorsque le niveau d'AMP augmente dû à l'absence de nutriments, à l'exercice physique, à l'ischémie ou à l'hypoxie [9, 87]. Elle modifie le métabolisme pour favoriser le catabolisme en inhibant l'anabolisme dans le but de maintenir la production énergétique [9, 16]. Elle régule positivement les voies qui favorisent la production d'ATP comme la prise de glucose, la glycolyse, l'oxydation des acides gras et l'autophagie. À l'inverse, elle régule négativement les processus biosynthétiques qui consomment de l'ATP comme la néoglucogénèse, la glycogénèse, la synthèse lipidique et protéique [9, 17, 19, 88, 123]. La régulation de ces divers processus produit des métabolites intermédiaires qui permettront la modification du métabolisme mitochondrial. Les mitochondries sont des organites très dynamiques et cruciaux pour la production d'ATP, la régulation métabolique de la cellule et le contrôle du cycle cellulaire [12, 185, 223]. Ce dynamisme mitochondrial permet aux cellules de s'adapter selon la disponibilité des divers métaboliques en fonction de leur besoin afin de stimuler la production d'ATP [293].

AMPK et le dynamisme mitochondrial jouent tous les deux un rôle majeur sur la production d'ATP en réponse à un stress. La problématique sur laquelle s'est penché mon travail de recherche est la suivante : le rôle d'AMPK sur le dynamisme et la fonction mitochondriale qui reste encore incompris. Des études préliminaires suggèrent toutefois que le rôle d'AMPK pourrait également s'étendre à la régulation de la morphologie mitochondriale. Par exemple, l'inhibition de l'activité mitochondriale par le blocage des complexes de l'ETC causerait la fission mitochondriale médiée par AMPK [364]. Spécifiquement, nous cherchons à comprendre le rôle d'AMPK sur la régulation de la fonction et du dynamisme mitochondrial dans le contexte particulier des variations de la disponibilité des nutriments. Selon la théorie, lorsque la disponibilité des nutriments

diminue (starvation), AMPK est activée pour favoriser les voies cataboliques d'une part et induit l'autophagie d'autre part. Lorsque l'autophagie est activée, les mitochondries fusionnent leur MOM les protégeant de l'autodégradation, et la MIM est restructurée dans le but d'augmenter l'efficacité de la production d'ATP [2,4-6]. De plus, l'induction d'un stress métabolique dans les neurones par l'absence d'acides aminés, une condition activant AMPK, entraîne la fragmentation des mitochondries [365]. Dans ces deux cas, AMPK est activée, mais l'organisation phénotypique de la dynamique mitochondriale est opposée. Il est donc important de déterminer quelle est la véritable fonction de l'AMPK dans la régulation du dynamisme mitochondrial. Ceci est d'autant plus important que ces changements métaboliques n'affectent pas seulement le dynamisme mitochondrial, mais également sa fonction qui est le centre de contrôle du métabolisme et de la survie cellulaire.

1.4 Objectifs et hypothèses de recherche

Étant donné que l'ATP est produite en grande partie dans les mitochondries, nous avons pensé qu'AMPK pourrait jouer un rôle central dans la réponse au stress métabolique, en régulant la structure et la fonction mitochondriales.

Objectif général du projet de recherche : Il est nécessaire de déterminer l'interaction entre l'activation d'AMPK et le dynamisme mitochondrial sur la régulation du métabolisme cellulaire via la fonction mitochondriale. Pour cela, nous modulerons l'activation d'AMPK dans un premier temps par un agent pharmacologique puis par la répression de l'expression du gène de la sous-unité β d'AMPK (knock-out pour $\beta 1$ et $\beta 2$). La modulation de l'activation d'AMPK se fera également par l'utilisation de diverses sources de carbones dans les cellules.

Premier objectif spécifique : Démontrer le rôle de l'AMPK sur la dynamique mitochondriale par l'observation de la longueur des mitochondries en présence d'un activateur et d'un inhibiteur d'AMPK en condition normale. Également, il serait important par comparaison de soumettre un stress métabolique aux cellules, conditions activant

AMPK également. Cette observation s'avère nécessaire pour voir les changements phénotypiques mitochondriaux. Dans les deux cas, AMPK est activé donc il s'agit de voir la différence morphologique des mitochondries dans ces différentes conditions.

Deuxième objectif spécifique : Déterminer l'effet d'AMPK sur la fonction mitochondriale des cellules. Il s'agit d'analyser le rôle de l'activation d'AMPK sur les différents paramètres de la fonction mitochondriale à savoir la glycolyse, l'ATP le potentiel membranaire, les espèces réactives d'oxygène et l'activité de la caspase-3 sous diverses conditions métaboliques.

Troisième objectif spécifique : Déterminer la corrélation entre la dynamique et la fonction mitochondriale via l'activation d'AMPK. Il s'agit de comprendre le lien existant entre la restructuration dynamique mitochondriale et la reprogrammation métabolique sous l'activation d'AMPK.

The logo for Clicours.COM, featuring the text "Clicours.COM" in a white, sans-serif font centered on a dark blue rectangular background.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFS) immortalisées au SV40, wild-type/knock-out AMPK et wild-type OPA1 ont été cultivées dans des pétris de 100 mm de diamètre avec du milieu Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Wisent) contenant de la glutamine, du pyruvate et 4,5 g/L de glucose. Ce milieu de base était supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS, Wisent). Les MEFs knock-out sont AMPK (null) pour les 2 sous-unités β qui sont absentes [366].

2.2 Traitement des cellules

Les cellules ont été divisées afin d'obtenir une confluence de 70-80 % après 24 h dans des plaques 6 puits (9,6 mm) pour la mesure du potentiel membranaire, des espèces réactives d'oxygènes et de la mesure de l'activité de la caspase 3, sur des lamelles dans des plaques 24 puits (2 mm) pour la microscopie confocale, ou dans des plaques 96 puits (0.3 mm) pour les essais d'ATP et de lactate. Les cellules ont été traitées dans du DMEM, du milieu sans glucose contenant 1 mL de pyruvate et 2 mL de glutamine, du milieu Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, ThermoFischer) pendant 4 h en présence ou non de 150 μ M de A769662, 10 μ M de compound C, 100 μ M de staurosporine, 10 μ M de camptothecin, 10 μ M d'oligomycine entre 1 et 16 h avant la fixation pour l'immunofluorescence ou l'analyse par western blot. A769662, le compound C, la staurosporine, la camptothecine, l'oligomycine ont été dilués dans du DMSO (ThermoFischer). Le DMSO a été ajouté dans les cellules non traitées en quantité égale comme contrôle. La fixation sur les coverslips a été réalisée avec 4 % de paraformaldehyde (PFA) dans une solution saline de phosphate 1x à pH 7,4 (PBS, Wisent).

A769662 est un activateur spécifique de l'AMPK tandis que le compound C est un inhibiteur non spécifique. L'EBSS est un milieu sans calcium, magnésium, ni acides aminés, constitué essentiellement de glucose. Son importance est d'induire aux cellules un stress métabolique cellulaire par manque d'acides aminés identiques en période d'autophagie. Le milieu contenant le pyruvate et la glutamine induit un stress métabolique également et force les cellules à n'utiliser que leurs mitochondries pour produire de l'ATP. L'oligomycine est un inhibiteur de l'ATP-synthase, le complexe produisant l'ATP dans les mitochondries. La staurosporine et la camptothécine sont deux agents induisant la mort cellulaire (apoptose).

2.3 Immunofluorescence

2.3.1 Microscopie confocale

Une immunofluorescence est réalisée sur les MEFS wild-type et knock-out AMPK pour voir le phénotype des mitochondries selon les traitements utilisés. Les MEFs fixés sur des coverslips sont perméabilisés pendant 2 minutes dans une solution de 0,2 % Triton-PBS1x puis maintenus dans une solution de blocage 1 % BSA-0,1 % Triton-PBS1x pendant 10 minutes. Ensuite, ils sont mis en contact durant 1 h avec l'anticorps primaire, rincés 3 fois dans du PBS 1x puis incubés avec un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire pendant 45 minutes. Les coverslips sont ensuite fixés sur des lamelles par le biais de l'Immu-Mount (9990402) et après avoir séché, les images obtenues sont réalisées au microscope confocal TCS SP8 de la compagnie Leica à l'objectif 63X. Les anticorps primaires et secondaires sont préparés dans une solution 1 % BSA-0,1 % Triton-PBS1x avec une dilution respective de 1 :200 et 1 :500. Les anticorps primaires sont des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt et les anticorps secondaires sont des anticorps polyclonaux provenant de la chèvre, couplés à différents fluorochromes émettant à diverses longueurs d'onde (488, cy3, 594, 647) et spécifiques aux anticorps primaires. Ici, l'identification de la membrane externe des mitochondries est réalisée par le marquage de la translocase de la membrane externe (Tom) par l'anticorps primaire Tom20, puis incubée dans une

solution contenant l'anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre Tom20, couplé à un fluorochrome vert.

2.3.2 Microscopie optique

Le même protocole d'immuno fluorescence a été réalisé sur les MEFs wild-type OPA1, mais l'observation après immunofluorescence a été faite au microscope optique META ZEISS en utilisant l'objectif de 40X.

La luminosité et le contraste et l'analyse des images ont été réalisés à l'aide du logiciel image j.

2.4 Essai d'ATP

Les MEFs wild-type et knock-out AMPK ont préalablement été divisés dans des plaques 96 puits pour un nombre initial de 30000 cellules par puits, une plaque noire et une blanche puis traitées pendant 4 h dans diverses conditions en présence ou non de l'activateur A769662 (4 h) et de l'oligomycine (1 h). La détermination de l'ATP intracellulaire se fait directement dans la plaque noire en utilisant le kit CellTiter-Glo® Luminescent de Promega (G7571) suivant le protocole du fabricant et est normalisée par la concentration des protéines mesurées directement dans la plaque blanche par DC protein assay (BIO-RAD).

2.5 Mesure du Lactate

Les cellules ont préalablement été divisées dans 1 plaque blanche 96 puits pour un nombre initial de 30000 cellules par puits. Le milieu extracellulaire est retiré et collecté après 4 h de traitement. La détermination du lactate extracellulaire se fait directement dans le milieu extracellulaire en utilisant le kit Lactate Reagent de Trinity Biotech (735-10) suivant le protocole du fabricant et est normalisée par la concentration des protéines mesurée directement dans la plaque blanche par DC protein assay (BIO-RAD).

2.6 Mesure du Potentiel Membranaire (MP) et des espèces réactives d'oxygènes (ROS)

Le potentiel membranaire a été mesuré par citometry en flux dans des MEFs incubés avec du Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM, Sigma T5428), utilisé comme sonde sensible pour la détection du potentiel membranaire mitochondrial. Le TMRM est importé dans les mitochondries en fonction du potentiel membranaire. Les cellules ont été traitées 4 h dont 30 minutes avec du TMRM à 37 °C. Les cellules ont été décollées avec de la trypsin, centrifugées à 2600 rpm pendant 5 minutes, lavées avec du PBS1x, centrifugées à nouveau pendant 2 minutes à 2600 rpm puis resuspendues dans 200 uL PBS1x pour chaque puits. Le signal du TMRM a été quantifié en utilisant le canal FL2 du système Cytomics Fc500 MPL de Beckman Coulter pour chaque échantillon y compris le control positive contenant des cellules prétraitées au Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma C2759), un découpleur de la phosphorylation oxydative qui inhibe le gradient de pH dans les mitochondries. Les données ont été analysées par le logiciel Flowing Software. Similairement, les ROS ont été mesurés en utilisant 5 uML du reagent MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide (M36008) pendant 30 minutes et détecté par le canal FL2.

2.7 Mesure de l'activité de la caspase 3

Les cellules ont été traitées avec du DMEM, A769662, EBSS, staurosporine et camptothecin pendant 4 à 16 h. Les cellules ont été récoltées puis lysées avec une solution contenant 50 mM HEPES pH 7,6, 5 mM EDTA, 0,5 % Triton100x et 2 mM DTT pendant 10 minutes à la température pièce. Elles ont été centrifugées à 13000 RPM dont le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube pour chaque échantillon. Le substrat de la caspase 3, DEVD-AMC 5 mL, est dilué 1 :100 dans le tampon de lyse et 100 uL du mélange est ajouté à 25 ug de protéines dont la concentration est déterminée par DC protein assay (BIO-RAD). DEVD-AMC est un substrat fluorogénique térapeptidique synthétique pour la caspase-3 (CPP32) et contient la séquence d'acides aminés du site de clivage de la PARP à Asp-216. Il peut être utilisé pour identifier et quantifier l'activité de la caspase-3 dans les cellules apoptotiques. La caspase-3 active coupe le térapeptide

entre D et AMC, libérant ainsi l'AMC fluorogène, qui peut être quantifiée dans un spectrofluoromètre. Le substrat peut également être utilisé pour étudier l'inhibition de la caspase-3 par le térapeptide aldéhyde, l'Ac-DEVD-CHO ou tout autre inhibiteur de la caspase-3 [367]. La lecture de l'activité est réalisée 30 minutes après incubation à 37 °C à l'abri de la lumière, par la détection de la fluorescence dont l'excitation est à 370 et l'émission 450 (EX 370, EM 450).

2.8 Analyses statistiques

Les barres d'erreurs représentent les variations +/- l'écart type (SD) ou l'erreur type (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel GraphPad Prism 6, avec un one way ANOVA lorsque plus de deux groupes de données étaient comparés, Two way ANOVA lorsque deux conditions de groupe de données étaient comparées, et Student T test lorsque seulement deux groupes de données étaient comparés. Nous considérons que la différence était statistiquement significative lorsque le P value < 0.05.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 AMPK joue un rôle direct dans la fragmentation des mitochondries

Les mitochondries sont des organites très dynamiques dont la morphologie peut varier au gré des mécanismes de fission et fusion. Nous avons cherché à déterminer si l'AMPK joue un rôle dans la réponse dynamique des mitochondries induite par des changements métaboliques. Pour cela, nous avons traité les lignées de cellules embryonnaires de souris (MEFs) wild-type OPA1 (WTOPA1), de même que wild-type et knock-out pour les deux sous-unités β d'AMPK (WTAMPK, KOAMPK), avec un activateur spécifique d'AMPK (A769662) ou un inhibiteur d'AMPK (compound c) dans un milieu de culture complet. Les images obtenues par la microscopie confocale après l'immunofluorescence de la protéine mitochondriale Tom20, nous ont permis de visualiser la morphologie des mitochondries. Cette observation microscopique nous a permis d'évaluer les transitions morphologiques mitochondriales régulées par des processus dynamiques de fusion et de fission membranaire. De ce fait, nous avons pu caractériser 3 phénotypes mitochondriaux distincts : fragmenté, intermédiaire et allongé (Figure 3.1).

Dans les deux lignées cellulaires, la majorité des cellules avaient un phénotype transitionnel mitochondrial intermédiaire (Figure 3.2). La microscopie confocale a révélé une fragmentation mitochondriale provoquée par l'activateur A769662 après 4 h de traitement (Figure 3.2A et B) dans les deux lignées cellulaires, et ce, en absence comme en présence d'AMPK. De manière réciproque, l'utilisation de l'inhibiteur compound c cause une élongation des mitochondries. Nous pouvons conclure ici qu'en condition basale, l'activation d'AMPK cause la fragmentation mitochondriale et inhibe la fusion.

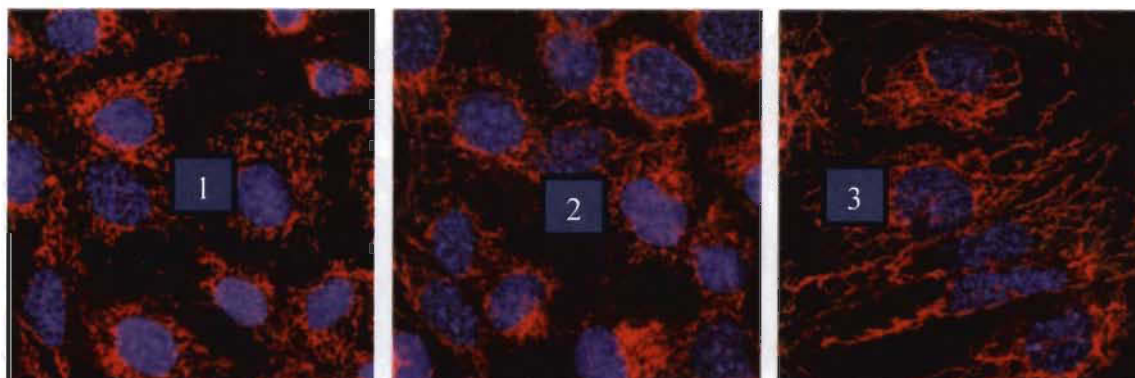


Figure 3.1 Visualisation de la morphologie de mitochondries de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) isolés de souris sauvages (WT). Images représentatives de mitochondries marquées avec un anticorps reconnaissant la translocase de la membrane externe Tom20 (rouge) et avec le réactif liant l'ADN Hoechst pour marquer les noyaux (bleu). Les images ont été obtenues à un agrandissement de 63X au microscope confocal. Les numéros 1,2 et 3 sur les images montrent respectivement un exemple de cellule aux mitochondries fragmentées, intermédiaires et allongées.

La diminution de la disponibilité des nutriments, la diminution de l'ATP ou le manque d'acides aminés, toutes des conditions activant AMPK, mène à l'initiation de la fusion mitochondriale entraînant un allongement des mitochondries [185, 343]. Pour déterminer si AMPK joue un rôle dans ce processus, nous avons évalué l'impact du retrait des acides aminés en cultivant les lignées WT OPA1 et WT AMPK dans du milieu EBSS, sur la distribution des trois phénotypes mitochondriaux. Après un traitement de 4 h dans un milieu sans acides aminés, EBSS, nous avons observé un allongement des mitochondries dans les deux cellulaires (Figure 3.3A et B), similairement à ce que nous avons observé avec le compound c qui inhibe l'AMPK (Figure 3.2A et B), ce qui suggère que le phénomène pourrait impliquer l'AMPK.

Cependant, un allongement des mitochondries en réponse au retrait des acides aminés a également été observé dans la lignée KO pour AMPK (Figure 3.3B), indiquant que la fusion serait indépendante d'AMPK. L'observation qu'AMPK stimule la fission, mais n'affecte pas l'élongation causée par un manque d'acides aminés suggère que l'activation d'AMPK est impliquée dans la dynamique mitochondriale plus spécifiquement au niveau du processus de fission et que la fusion serait indépendante d'AMPK.

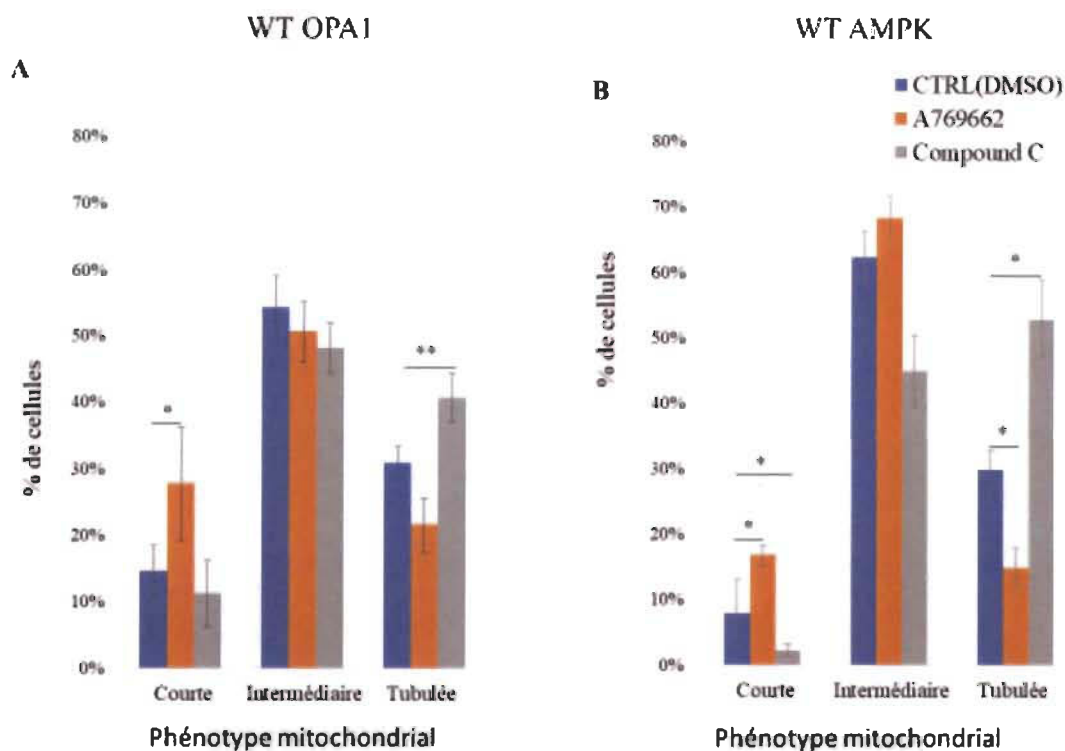


Figure 3.2 Effet de l'activation et de l'inhibition d'AMPK sur la dynamique mitochondriale.

Dénombrement des mitochondries de chaque phénotype dans les cellules wild-type OPA1 (A) et wild-type AMPK (B). Des MEFs ont été traités pendant 4 h dans trois conditions différentes toutes diluées dans du DMEM. La statistique de la variance de phénotype des mitochondries est obtenue par test ANOVA sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifié.

3.2 Altération de la fonction mitochondriale par la perte d'AMPK

AMPK est une kinase cruciale activée lors d'un stress énergétique. Lors de la déplétion énergétique, elle va inhiber les voies anaboliques et activer les voies cataboliques pour synthétiser de l'ATP [126]. Ainsi, comme les mitochondries sont le centre majeur de la synthèse d'ATP et que la fusion engendrée lors d'un stress énergétique permet une meilleure efficacité de la production d'ATP [185, 325], nous avons cherché à déterminer si AMPK jouait un rôle dans la régulation la fonction mitochondriale induite par des changements métaboliques. Pour cela, nous avons d'abord traité une lignée MEFs wild-type AMPK (WTAMPK), avec un activateur spécifique

d'AMPK (A769662) dans un milieu de culture complet, et avons évalué différents paramètres métaboliques (ATP, lactate) et mitochondriaux (potentiel membranaire (PM), espèces réactives d'oxygène (ROS)). Après 4 heures de traitement, l'activation d'AMPK par A769662 a causé une augmentation de la quantité d'ATP (Figure 3.4A), cohérente avec le rôle d'AMPK dans la régulation métabolique. De plus, le A769662 a mené à une diminution de la production de lactate (Figure 3.4B), accompagnée d'une baisse du potentiel membranaire (Figure 3.4C) et d'une diminution de la production de ROS (Figure 3.4D). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la production d'ATP induite par AMPK passe par une modification du métabolisme mitochondrial.

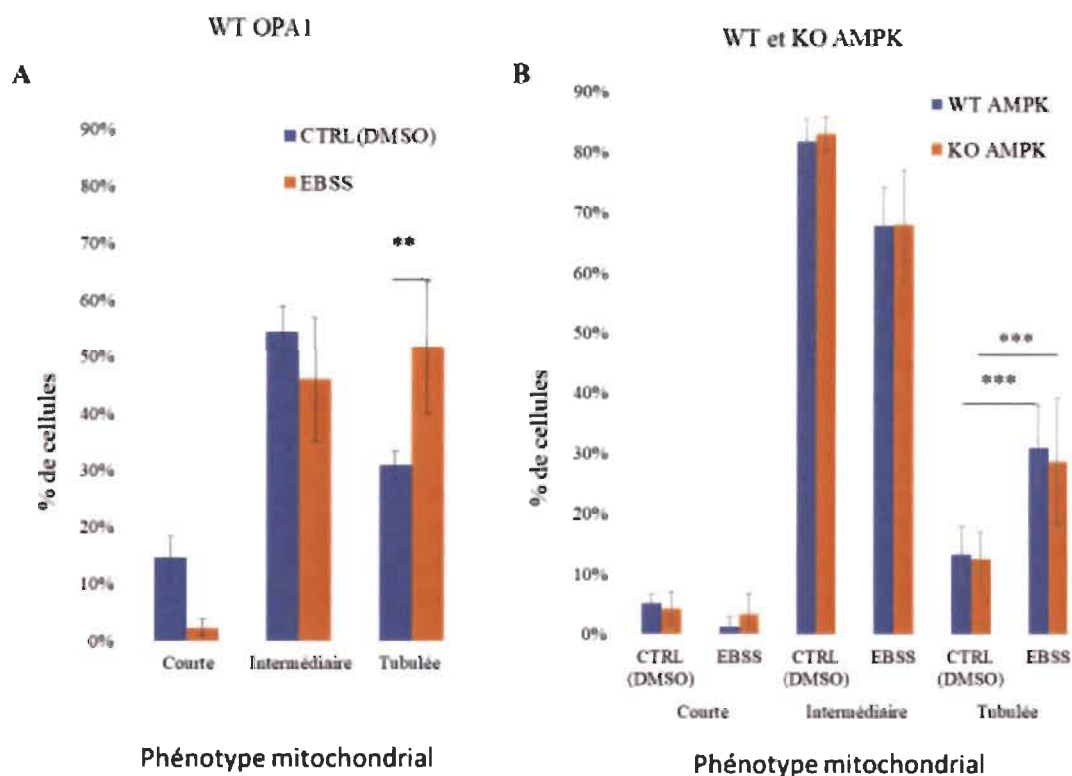


Figure 3.3 L'élongation mitochondriale pendant le starvation est AMPK-indépendant.

Dénombrement des mitochondries de chaque phénotype dans les cellules wild-type OPA1 (A) et wild-type et knock-out AMPK (WT et KO) (B). Des MEFs ont été traitées pendant 4 h dans deux conditions différentes. L'EBSS est un milieu sans acides aminés induisant un stress métabolique. La statistique de la variance de phénotype des mitochondries est obtenue par test ANOVA sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifié.

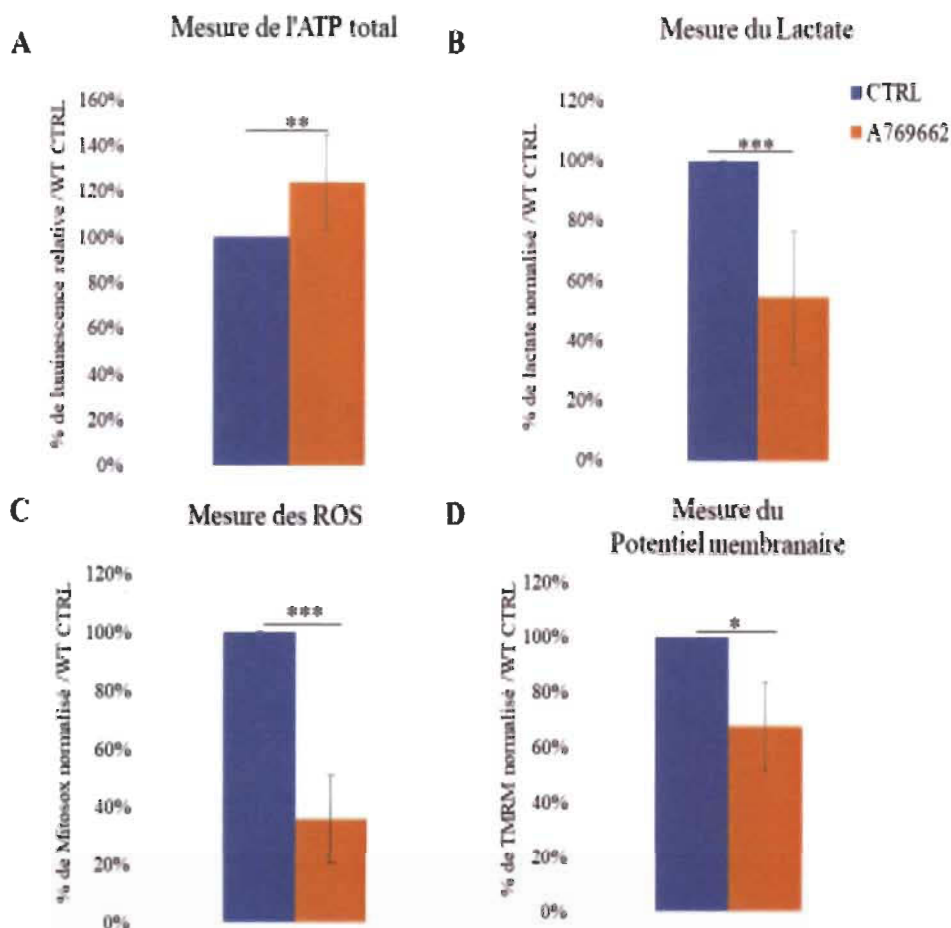


Figure 3.4 Effet de l'activation d'AMPK sur la fonction mitochondriale par un agent pharmacologique spécifique A769662.

Mesure de l'ATP total (A), du lactate (B), des espèces réactives d'oxygènes (C) et du potentiel membranaire (D) en condition basale dans les cellules wild-type AMPK en présence ou non de l'activateur A769662 pendant 4 h. La statistique de la variance des divers paramètres mitochondriaux est obtenue par un test de student T. Test sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifiées.

Nous avons donc ensuite investigué l'effet de la délétion d'AMPK sur la fonction mitochondriale en condition basale. En condition basale, la perte de AMPK n'a pas affecté les niveaux totaux d'ATP (Figure 3.5A), mais a mené à une augmentation de la production de lactate (Figure 3.5B), cohérent avec l'idée que AMPK inhibe la glycolyse et l'effet Warburg [123]. Comme nous avons également observé une diminution du potentiel membranaire (Figure 3.5C) et des ROS (Figure 3.5D), nos résultats supportent l'hypothèse qu'AMPK altère la fonction mitochondriale globale.

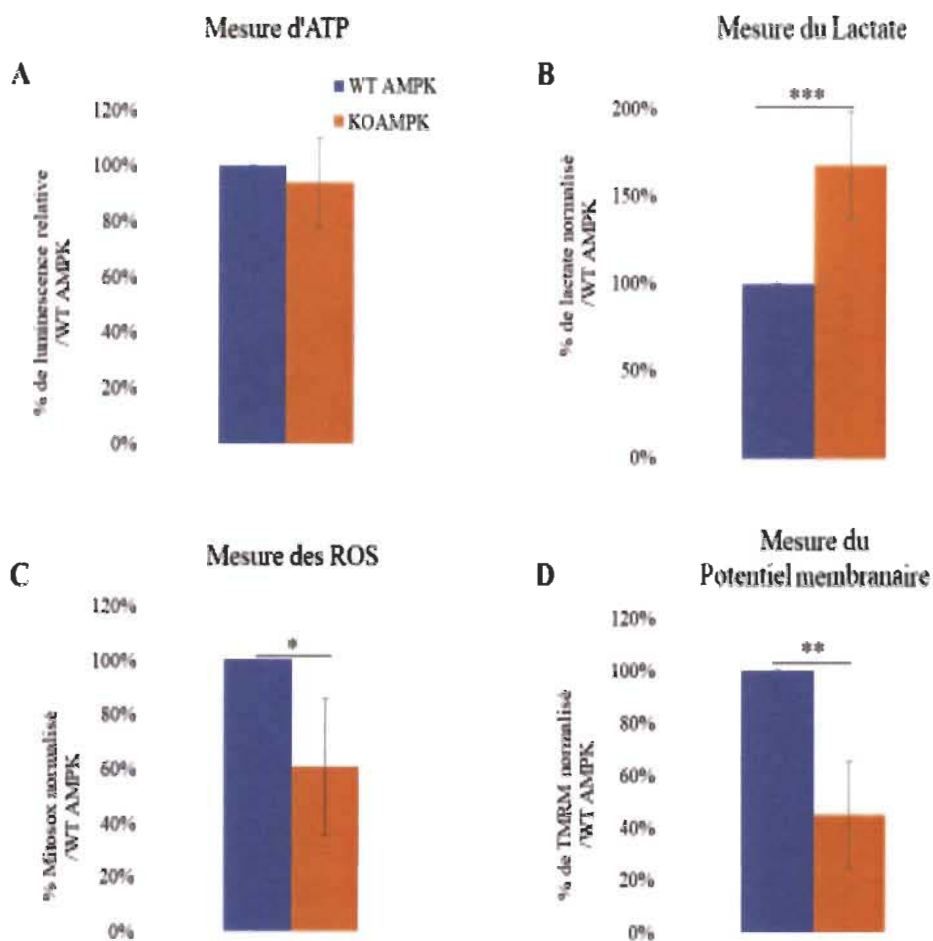


Figure 3.5 **Altération de la fonction mitochondriale par la perte d'AMPK.** Mesure de l'ATP total (A), du lactate (B), des espèces réactives d'oxygène (C) et du potentiel membranaire (D) en condition basale pendant 4 h dans les cellules wild-type AMPK et knock-out AMPK. La statistique de la variance des divers paramètres mitochondriaux est obtenue par un test de student T. Test sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifié.

La viabilité de la disponibilité des nutriments, la diminution de l'ATP ou le manque d'acides aminés, toutes ces conditions activant AMPK mènent à l'augmentation de l'efficacité à produire de l'ATP dans les mitochondries en reprogrammant le métabolisme dû à l'existence de multiples circuits anaplérotiques du TCA [295, 296]. Nous nous sommes donc demandé quel est le rôle d'AMPK dans la capacité des cellules à adapter leur métabolisme et de maintenir leur niveau d'ATP sous certaines conditions. Nous avons cherché à savoir si la perte d'AMPK empêchait l'adaptation des cellules lors d'un stress

métabolique causé par l'absence d'acides aminés ou de glucose. Nous avons donc traité les cellules wild-type et knock-out AMPK pendant 4 h dans un milieu contrôle, l'EBSS et un milieu sans glucose (Figure 3.6). Dans les cellules WT, l'induction des diverses formes de stress métabolique a causé une forte diminution de la production de lactate (Figure 3.6B), cohérente avec une réorganisation du métabolisme vers la phosphorylation oxydative. Ce changement métabolique a permis de maintenir les niveaux d'ATP (Figure 3.6A) et le potentiel membranaire des mitochondries (Figure 3.6C). À l'inverse, bien que le niveau d'ATP (Figure 3.6A) ne varie pas dans les cellules knock-out, leur potentiel membranaire (Figure 3.6C), ainsi que leurs statuts glycolytiques (Figure 3.6B) sont diminués en condition de stress métabolique. Ces résultats suggèrent que la fonction mitochondriale est maintenue dans les cellules WT, mais est altérée dans les KO qui perdent en même temps qu'AMPK la capacité à utiliser la voie de la glycolyse pour compenser la perte d'ATP.

Pour finir, nous avons investigué de quelle manière AMPK serait nécessaire au maintien de la fonction mitochondriale. Nous avons d'abord cherché à savoir si la perte d'AMPK rendait les mitochondries non ou peu fonctionnelles. Dans des cellules saines, l'inhibition de l'ATP synthase cause une hyperpolarisation des mitochondries en empêchant le retour des protons dans la matrice et leur accumulation dans l'IMS. Cependant, si la chaîne de transport des électrons ne fonctionne pas correctement, il n'y aura pas d'augmentation du potentiel membranaire dans ces conditions, nous permettant de distinguer une baisse du potentiel membranaire causé par une augmentation de l'activité de l'ATP synthase de celle causée par un problème avec la chaîne de transport d'électrons. Comme la perte d'AMPK diminue le potentiel membranaire, nous avons mesuré l'effet de l'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase [368] et mesuré le potentiel membranaire. Nous avons d'abord cherché à savoir si la perte d'AMPK rendait les mitochondries non ou peu fonctionnelles. Nous avons donc bloqué l'ATP synthase pendant 1 h avec l'oligomycine et mesuré le potentiel membranaire dans les cellules WT et KO. L'ajout d'oligomycine a entraîné une hyperpolarisation des mitochondries tant chez les WT que les KO (Figure 3.7A), indiquant que les mitochondries demeurent fonctionnelles en absence d'AMPK. Nous avons ensuite traité les cellules WT et KO

pendant 4 h dans un milieu contrôlé, l'EBSS et un milieu sans glucose contenant uniquement du pyruvate et de la glutamine, en présence ou non d'oligomycine pendant 1 h, puis mesuré l'ATP total. Par la suite, nous avons représenté les portions de la production d'ATP qui est sensible et insensible à l'oligomycine (Figure 3.7B). La portion sensible ici présentée en bleu est déterminée en calculant la différence entre l'ATP totale mesurée sans oligomycine, et la quantité d'ATP présente après l'ajout d'oligomycine. On observe chez les cellules WT qu'il n'y a pas de différence de la production d'ATP de la portion sensible dans un milieu sans acides aminés comparé au contrôle, mais on observe une augmentation de cette portion dans le milieu sans glucose (Figure 3.7B) bien que le potentiel membranaire reste inchangé (Figure 3.7 C). En effet, le milieu sans glucose est un milieu qui force les cellules à être dépendantes de leurs mitochondries pour produire de l'ATP. De même, en absence d'acides aminés, aucun changement n'est visible dans les cellules WT (Figure 3.7B) bien que selon la théorie, AMPK serait activée et induirait la production d'ATP par Oxphos. À l'inverse, les cellules KO sont plus dépendantes de leurs mitochondries en condition basale, et on observe une augmentation de la portion sensible à l'oligomycine dans le milieu sans glucose (Figure 3.7B). On remarque également que la portion indépendante à l'oligomycine (insensible), diminue autant en absence d'acides aminés qu'en absence de glucose (Figure 3.7B) bien que le niveau potentiel membranaire soit diminué (Figure 3.6C).

Ces résultats suggèrent ici que le niveau d'efficacité des mitochondries pour produire l'ATP n'est pas linéairement corrélé avec le niveau du potentiel membranaire qui lui est affecté par la perte d'AMPK. En revanche, AMPK serait requis alors pour le maintien de la fonction mitochondriale.

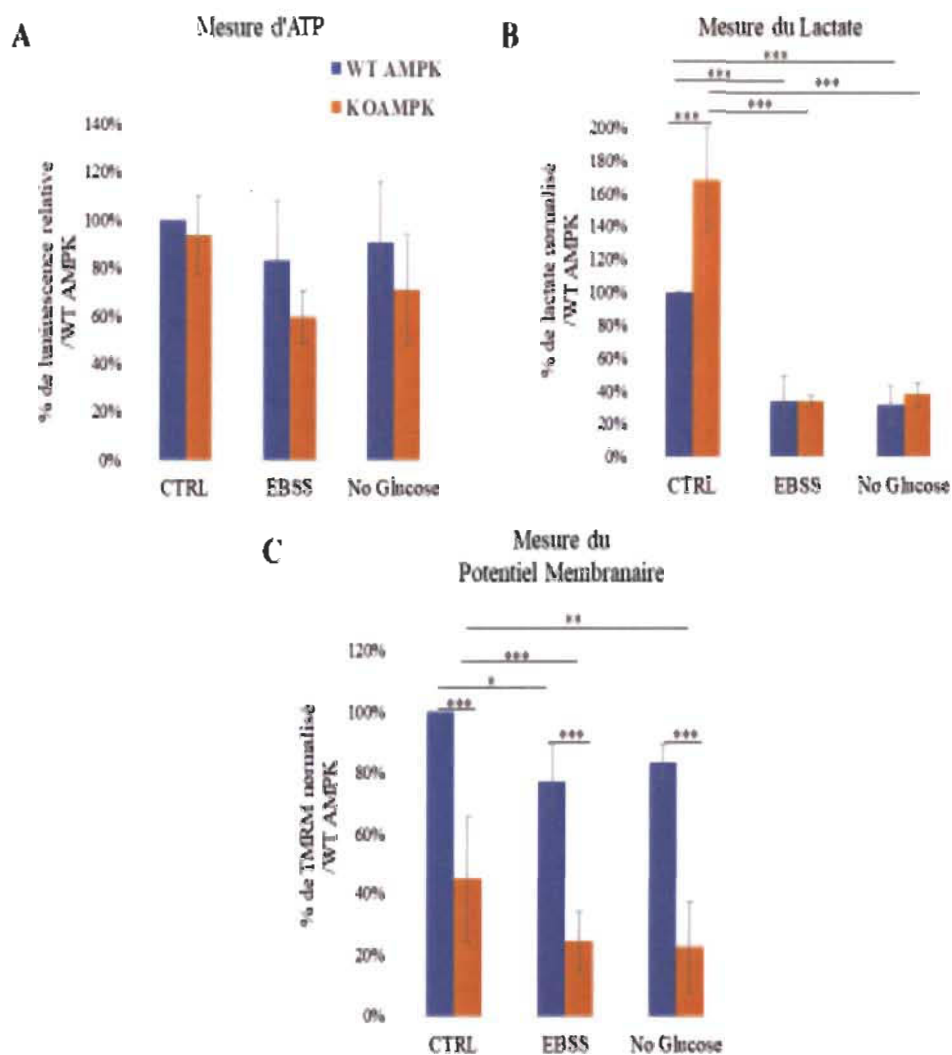


Figure 3.6 **Altération de la fonction mitochondriale dans des conditions de stress métaboliques.**

Mesure de l'ATP total (A), du lactate (B) et du potentiel membranaire (C) en condition de stress métabolique pendant 4 h dans les cellules wild-type et knock-out AMPK. La statistique de la variance des divers paramètres mesurés est obtenue par test ANOVA sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifié.

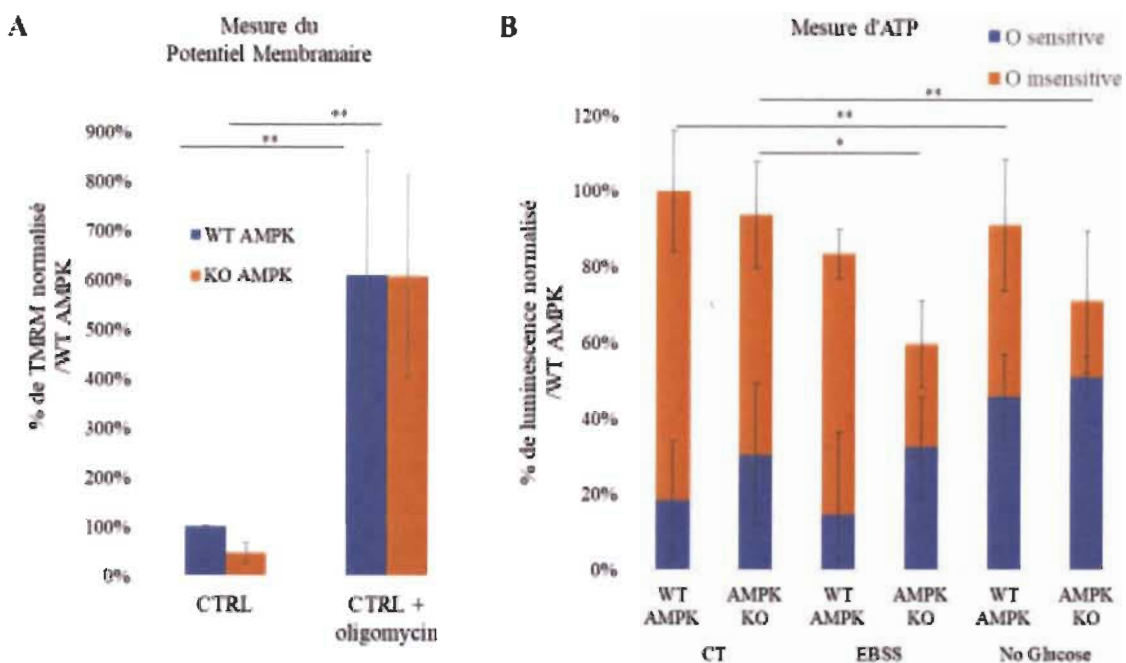


Figure 3.7 AMPK est nécessaire au maintien de la fonction mitochondriale. Mesure du potentiel membranaire (A) et de l'ATP (B) en condition de stress métabolique pendant 4 h dans les cellules wild-type et knock-out AMPK. L'oligomycine a été rajouté dans la dernière heure du traitement. La statistique de la variance de paramètres mesurés est obtenue par test ANOVA sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond à un changement significatif de la réponse entre deux conditions expérimentales tel qu'identifié.

3.3 AMPK est requis pour la survie cellulaire

L'ATP constitue la source d'énergie vitale pour la survie de la cellule. Le maintien de la production d'ATP s'avère crucial pour les cellules et leur incapacité à maintenir leur niveau d'ATP cause des dommages irréversibles menant à la mort cellulaire. Comme nous avons remarqué une altération dans le maintien de la synthèse d'ATP dans les cellules KO, nous nous sommes demandé si la perte d'AMPK sensibiliserait les cellules à l'apoptose. La disponibilité d'ATP s'avère être un élément clé dans la régulation des processus biologiques comme l'apoptose. L'apoptose est un processus biologique intimement lié à fonction mitochondriale [241, 315]. Dans un premier temps, nous cherchions à savoir si l'activation d'AMPK en condition basale préviendrait l'apoptose.

Nous avons utilisé l'activateur spécifique d'AMPK, A769662, pour mesurer son effet sur l'apoptose dans les WT et KO. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de la caspase 3 clivée (Casp3), la forme active de la protéase déclenchant l'apoptose, dans les cellules WT et KO. Après 4 heures de traitement, aucun changement significatif n'est observé sur l'apoptose lors de l'activation d'AMPK en condition normale dans les cellules wild-type (Figure 3.8A). Par la suite, nous avons cherché à savoir si AMPK réduirait la sensibilité à l'apoptose en conditions de stress métabolique. Nous avons traité les cellules WT et KO dans un milieu normal ou dans l'EBSS pendant 4 h. En condition normale, il n'y a aucun impact de la perte d'AMPK sur l'activation de l'apoptose (Figure 3.8B). L'absence d'acides aminés se traduit par une augmentation de l'activation de l'apoptose (Figure 3.8B) ce qui a déjà été observé dans des cellules du cancer colorectal humain [319]. Donc, ceci suggère plutôt que la présence ou non d'AMPK ne dicte pas la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par l'absence d'acides aminés.

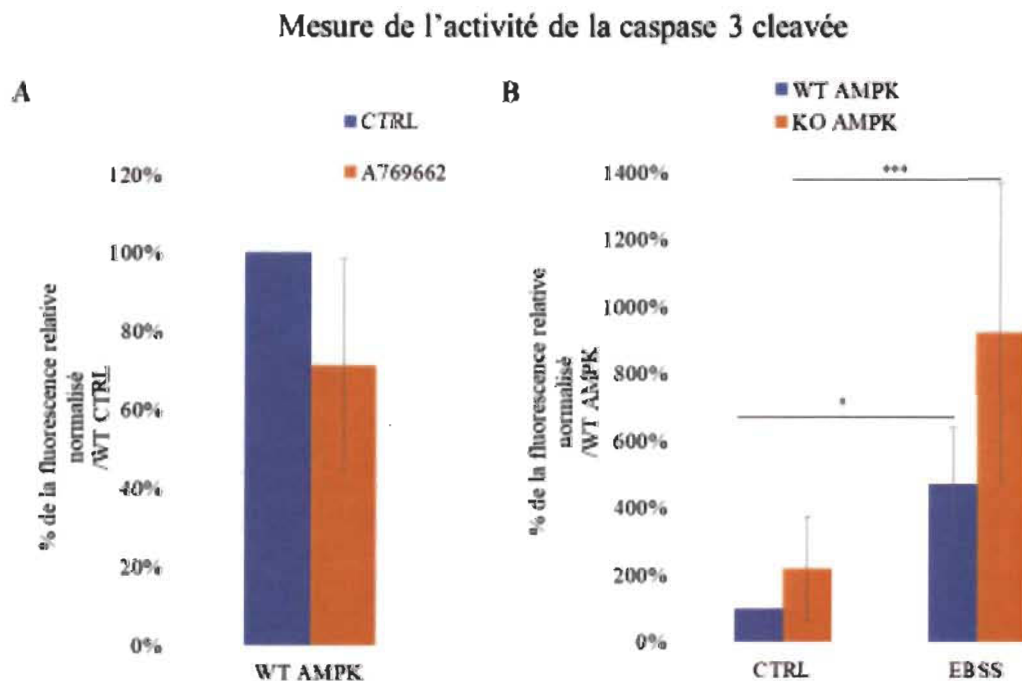


Figure 3.8 Effet de d'AMPK sur la sensibilité des cellules à l'apoptose. Mesure de l'activité de la caspase 3 clivée après l'activation d'AMPK (A) et en absence d'acides aminés (B) pendant 4 h dans les cellules wild-type et knock-out AMPK. La statistique de la variance de paramètres mesurés est obtenue par des tests de student T. Test en (A) et ANOVA en (B) sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond au degré de variabilité significative de l'expérience.

Pour savoir si AMPK est nécessaire à la survie cellulaire, nous avons cherché à mesurer la résistance aux cellules pendant l'apoptose. Pour cela, nous induisons la mort cellulaire en traitant les cellules WT et KO avec l'un ou l'autre de deux agents pharmacologiques, un inhibiteur de la topoisomérase I, la camptothécine, pendant 16 h, ou un inhibiteur de kinase, la staurosporine, pendant 4 h (Figure 3.9). Nos résultats montrent que l'utilisation de la staurosporine (Figure 3.9A) ou de la camptothécine (Figure 3.9B) entraîne une augmentation de l'activité de la Casp3 dans les KO. Ces résultats suggèrent que la perte d'AMPK rend les cellules plus susceptibles d'exécuter l'apoptose.

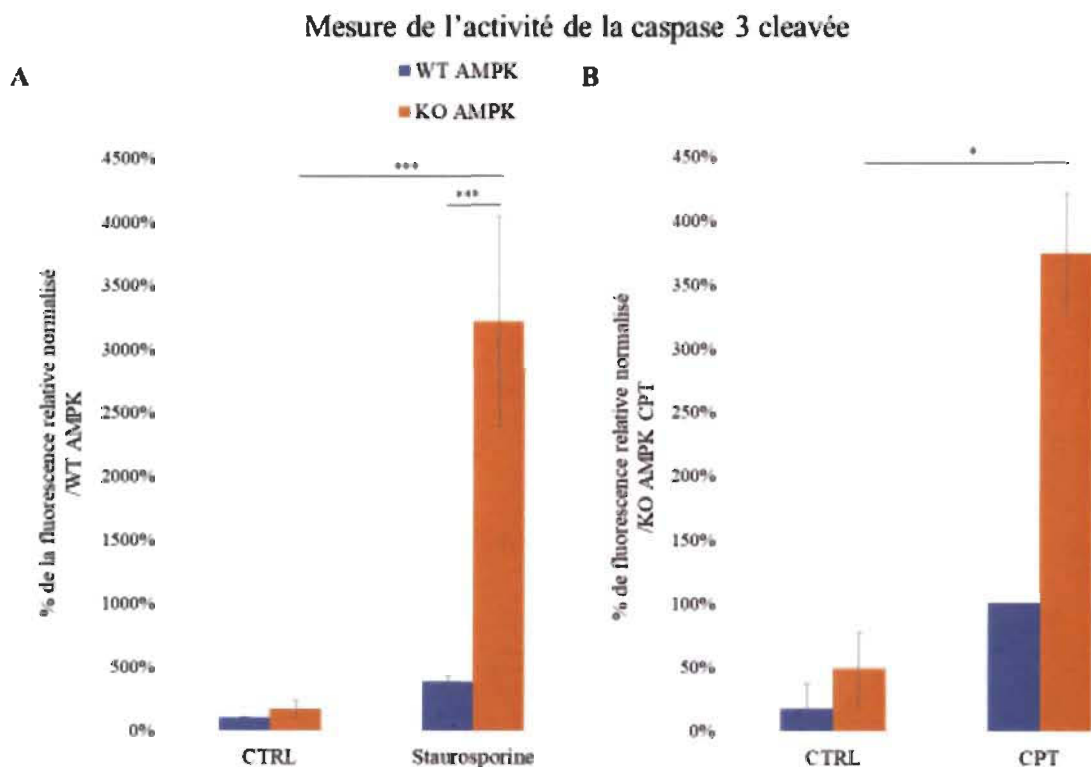


Figure 3.9 AMPK prévient l'apoptose.

Mesure de l'activité de la caspase 3 clivée des cellules wild-type et knock-out AMPK en présence ou non de staurosporine pendant 4 h (A) et de la camptothécine (B) pendant 16 h. La statistique de la variance de paramètres mesurés est obtenue par ANOVA sur le logiciel GraphPad. Le symbole * correspond au degré de variabilité significative de l'expérience.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Des avancées majeures ont récemment été réalisées dans la compréhension de la biogenèse des protéines mitochondriales, notamment sur les supercomplexes [369-372]. Cependant, le niveau d'organisation architecturale au sein du dynamisme mitochondrial représente une fenêtre nouvelle sur le fonctionnement interne de la mitochondrie, et reste encore à être approfondi. Le dynamisme mitochondrial, modelé par le processus de fission et fusion permet à la cellule de s'adapter selon la disponibilité des nutriments [180, 223, 228]. Ce processus est par ailleurs la clé de la régulation du métabolisme basal cellulaire influençant plusieurs activités intrinsèques ou biologiques de la cellule comme la synthèse d'ATP, la prolifération ou la différenciation, l'apoptose ou la survie cellulaire [221, 225, 229, 373]. Par ailleurs, AMPK inhibe les voies anaboliques et active les voies cataboliques pour augmenter la production d'ATP par OXPHOS dans les mitochondries [15, 87, 103, 365]. Nous cherchons donc à identifier l'effet d'AMPK sur la fonction mitochondriale par la régulation du dynamisme mitochondrial en période de stress métabolique.

Tout d'abord, nous avons adressé notre questionnement sur le rôle d'AMPK sur le dynamisme mitochondrial en condition basale, c'est-à-dire dans une condition où les cellules sont baignées dans un milieu contenant tous les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires, et l'effet engendré sur la fonction mitochondriale. Physiologiquement, en présence abondante de nutriments, les mitochondries sont plus courtes et les crêtes sont plus larges, alors qu'en manque de nutriments les mitochondries fusionnent et les crêtes deviennent plus serrées dans le but de devenir plus efficaces à la production d'ATP, favorisant ainsi la survie cellulaire [185, 228, 343, 344]. Rappelons-nous que l'utilisation de l'analogue de l'AMP, AICAR, entraîne la fragmentation des mitochondries [364]. AICAR mime l'activité d'AMP et se fixe à la sous-unité γ d'AMPK au niveau des sites

CBS [41]. Cependant, étant un analogue d'AMP, il pourrait en plus d'activer AMPK influencer d'autres mécanismes intracellulaires qui permettraient cette fragmentation. C'est pour cela que nous avons donc utilisé un activateur pharmacologique plus spécifique d'AMPK, A769662, connu pour se lier au niveau de l'interface de la liaison des sous-unités α et β [41, 42, 112]. Nous cherchions avant tout à nous assurer que cette fragmentation est bien spécifique de l'action d'AMPK. Activer AMPK avec le A69662 a mené à une fragmentation mitochondriale dans les cellules wild-type AMPK et wild-type OPA1 et s'accompagnait d'une augmentation du niveau d'ATP ainsi que d'une diminution de lactate, des ROS et du potentiel membranaire dans les cellules wild-type AMPK en condition basale. L'augmentation du niveau d'ATP et la baisse du niveau de lactate étaient des effets attendus puisqu'il est déjà connu qu'AMPK favorise la synthèse d'ATP et a une propriété anti-glycolytique puisque c'est un senseur métabolique négatif de l'effet Warburg [123, 365, 374]. Cependant, la baisse du niveau des ROS concordant avec la diminution du potentiel membranaire traduirait plutôt une diminution de la synthèse d'ATP par OXPHOS. En effet, la génération d'ATP est associée à la polarisation des mitochondries et la respiration oxydative menant à une production de ROS [221, 223, 375, 376]. Ce que nous comprenons ici est qu'étant dans des conditions normales avec tous les éléments nutritifs disponibles dans le milieu, les cellules n'éprouvent pas la nécessité d'être efficace pour la production d'ATP. Au niveau basal, AMPK est activée d'une certaine manière à un certain niveau, donc utiliser A769662 dans cette condition reviendrait à une suractivation de la kinase. AMPK étant activée, va donc phosphoryler Mff et Fis1 qui sont les récepteurs de la MOM, permettant le recrutement de DRP1 requis pour la fission [228, 340, 357]. Donc naturellement, la fission étant favorisée, il est fort probable que la masse mitochondriale totale soit plus élevée dans cette condition, ce qui entraînerait l'augmentation du niveau d'ATP. Étant donné que les mitochondries sont moins efficaces en situation d'abondance de nutriments, cela causerait une diminution de la respiration cellulaire et donc une baisse de la polarisation mitochondriale et donc en fin de compte à une diminution des ROS. Tout de même, il est à noter que l'initiation de l'apoptose est également associée à une fragmentation massive mitochondriale où les crêtes étant très larges permettent le relargage massif du cytochrome c favorisant alors l'activation de la voie intrinsèque de la mort cellulaire par les caspases

[221, 231, 377]. De ce fait, il était important de vérifier que cette fragmentation n'est pas associée à la mort cellulaire et nos résultats obtenus de la mesure de l'activité de la caspase 3 cleavée indiquent que celle-ci n'est pas associée avec la fission observée lors de l'activation d'AMPK avec par A769662.

La baisse des nutriments ou l'absence d'acides aminés sont des stress métaboliques induisant la fusion mitochondriale et une restructuration des crêtes en jonction serrée. Ce processus d'une part maintient l'intégrité mitochondriale dans le contexte de l'autophagie et d'autre part permet le recyclage des protéines pour produire efficacement de l'ATP [185]. AMPK étant également activée dans cette condition, nous cherchons à comprendre comment la kinase peut être activée dans différentes conditions métaboliques et avoir un effet opposé sur le dynamisme mitochondrial. Dans un premier temps, nous pensions qu'inhiber AMPK avec le compound c entraînait une fusion mitochondriale dans les cellules wild-type AMPK et OPA1, mais l'allongement mitochondriale observée autant dans les cellules wild-type et knock-out AMPK dans l'EBSS nous indique plutôt que cette fusion est indépendante d'AMPK. Évidemment, l'allongement obtenu ici est cohérent avec ce qui a déjà été démontré [185], à savoir qu'en absence d'acides aminés les mitochondries fusionnent pour être plus efficaces à la production d'ATP. Toutefois, il apporte une information nouvelle sur le rôle d'AMPK dans le dynamisme métabolique, en ce que l'élongation mitochondriale après retrait des acides aminés ne nécessite pas la présence de la kinase. En temps normal, DRP1 est cytosolique et est recruté pour participer aux divers processus tels le transport mitochondrial, la mitophagie et l'apoptose en plus de son implication dans la morphologie mitochondriale [349, 352]. En période de stress métabolique, la protéine kinase A est activé par l'AMPc [378-380], séquestre DRP1 dans le cytosol en la phosphorylant [354] ce qui prévient donc la fission et favorise la fusion mitochondriale. La fusion est régulée par deux mécanismes distincts, la fusion de la MOM par les mitofusines 1 et 2 (MFN1, MFN2) et la fusion de la MIM par OPA1 [255, 257, 261, 263, 331]. La fusion de la MOM a pour fonction de protéger les mitochondries saines lors de l'autophagie [185, 340, 343]. OPA1 existe sous deux isoformes, les formes longues et courtes dont la régulation est nécessaire pour une fusion mitochondriale efficace [263]. C'est la régulation de la combinaison des deux formes qui est nécessaire pour initier la

fusion et que le clivage des formes longues stimule davantage la fusion et l'organisation des crêtes [334, 339]. D'un point de vue métabolique, au niveau basal, la répression d'AMPK rend les cellules plus glycolytiques s'accompagnant d'une diminution des ROS et du potentiel membranaire dans les cellules knock-out AMPK bien que le niveau d'ATP total reste inchangé en comparaison aux cellules wild-type. Une fois de plus, la propriété anti-glycolyse de la kinase apparaît puisque la répression de l'expression d'AMPK dans les cellules KO rend ces cellules plus glycolytiques avec comme produit final de la glycolyse le lactate au lieu du pyruvate. En effet, dans la plupart des cellules cancéreuses, l'activité d'AMPK est diminuée et est glycolytique [28, 30, 123]. La diminution du potentiel membranaire et des ROS; phénomène déjà observé avec l'utilisation du A769662 dans les cellules wild-type; semble indiquer qu'AMPK n'influence en rien la fonction mitochondriale, d'autant plus que la viabilité des mitochondries semble intacte dans ces cellules. La respiration est très fortement contrôlée par la cinétique des fuites des protons et partiellement par l'oxydation des substrats impliqués. Une forte augmentation de ces fuites peut signifier que les mitochondries sont gravement endommagées et peut causer une hyperpolarisation [2, 283]. L'utilisation de l'oligomycine bloque le complexe 5 et prévient ainsi le retour des protons dans la matrice. L'accumulation de ces protons dans l'IMS nous permet de mesurer la contribution des autres complexes. Le blocage du complexe 5 par l'oligomycine montre par l'accumulation similaire des protons non couplés que les mitochondries sont autant fonctionnelles dans les cellules wild-type que knock-out. Donc la chaîne de transport des électrons ne semble pas être affectée ou dysfonctionnelle. Il semblerait alors que dans un premier cas, suractiver AMPK dans un milieu nutritif abondant, ou dans le deuxième cas, réprimer AMPK dans ce même milieu, n'oblige guère les cellules à être plus efficace à synthétiser de l'ATP. En revanche, les cellules knock-out étant glycolytiques seraient probablement dépendantes de la glutamine pour compléter le TCA. N'oublions pas que la grande majorité de l'ATP se produit dans les mitochondries donc si le TCA est déplété d'une voie, la cellule se doit de le compléter en utilisant une autre voie, car elle pourrait se retrouver en stress énergétique qui pourrait la mener à la mort cellulaire. L'activité de la caspase3 cleavée en condition basale nous a aussi confirmé que la cellule est capable de s'adapter même en réprimant AMPK dans un milieu contenant tous les éléments

nutritifs qui lui sont nécessaires. Cependant, il serait intéressant d'observer de quelle manière réagissent les cellules en période de stress métabolique ou énergétique. La baisse des nutriments ou l'absence d'acides aminés sont des conditions physiologiques dans lesquelles AMPK est activée et la synthèse d'ATP est maximisée de manière efficace dans les mitochondries. Effectivement, AMPK inhibe l'anabolisme et favorise le catabolisme ce qui permet de moduler le trafic des divers métabolites à travers le TCA [88, 123]. Un stress induit par l'absence d'acides aminés (EBSS), ou la diminution de nutriments (No glucose, pyruvate et glutamine uniquement) inhibe la glycolyse autant dans les cellules wild-type et knock-out bien que les niveaux totaux d'ATP restent inchangés. Ces résultats étaient attendus puisqu'ils ont déjà été observés. Ce qui est intéressant est le fait que le potentiel membranaire aussi soit diminué de 20 % dans les cellules wild-type, mais elle l'est encore plus drastiquement dans les cellules knock-out d'au moins 60 %. Si nous comparions ces résultats avec ceux observés en condition basale, cette diminution reste la même dans les knock-out AMPK en stress métabolique. À l'inverse, la diminution du potentiel membranaire est amoindrie dans les cellules wild-type lors d'un stress métabolique plutôt que lorsqu'on suractive AMPK avec le A769662. Cela pourrait suggérer, ici, qu'en stress métabolique, les cellules wild-type ont une certaine efficacité à produire de l'ATP dans ces conditions. L'utilisation d'oligomycine nous montre, également, que les cellules wild-type ont la parfaite capacité de s'adapter et ce peu importe le type de métabolite fourni. En outre, les knock-out AMPK peinent à utiliser efficacement leurs mitochondries lors d'un stress par déplétion des acides aminés ou l'absence de certains métabolites. Nous avons tout de même remarqué que les cellules knock-out étaient plus dépendantes de leurs mitochondries en période de stress métabolique. Nous nous attendions à ce que les cellules knock-out restent glycolytiques dans le milieu EBSS et No glucose. Dans les milieux ne contenant soit que du glucose sans acides aminés ou du pyruvate et de la glutamine, les knock-out devraient être à mesure de convertir le pyruvate en lactate grâce à l'absence d'AMPK et de pouvoir utiliser le TCA via le cycle de la glutamine. Il est assez difficile, ici, de pouvoir expliquer la réponse obtenue, car avec seulement ces informations il pourrait y avoir une multitude de causes à effets. Ces milieux, étant appauvris en nutriments, forcent les cellules à ralentir leur croissance, car la survie cellulaire prime et donc le flux glycolytique est ralenti dans les cellules

knock-out. Étant donné qu'elles étaient très glycolytiques en condition basale, la source majeure de leur production d'ATP est drastiquement diminuée en condition de stress métabolique ce qui va à long terme conduire à la mort cellulaire, étant incapable de compenser ce manque. Également, les cellules ne pouvant favoriser efficacement le catabolisme par la perte d'AMPK, les mitochondries ne pourront produire plus d'ATP. Et en plus du ralentissement du flux glycolytique, elles vont probablement utiliser l'ATP disponible dans le cytosol pour maintenir au minimum les réactions biochimiques qui lui sont nécessaires pour sa survie. De la même manière, il se pourrait que la prise du glucose dans les knock-out pourrait bien être altérée également puisque AMPK favorise la prise du glucose [124, 125]. D'une manière ou d'une autre, AMPK semble influencer la régulation du flux énergétique mitochondrial et son importance en tant que senseur métabolique varie différemment selon les besoins de la cellule comme nous avons modélisé dans la figure 4.1. Il serait nécessaire d'approfondir la compréhension de l'interaction entre AMPK et le dynamisme mitochondrial en incluant d'autres paramètres afin de mieux interpréter cette régulation énergétique.

Une analyse plus poussée sur l'incorporation des divers métabolites par exemple selon la condition s'avère nécessaire tout comme la mesure de la consommation d'oxygène comme paramètre supplémentaire. Ce dont nous sommes sûrs est le fait que la qualité du nutriment disponible semble dicter l'adaptation des cellules à utiliser les divers métabolites présents. L'absence d'AMPK semble, à notre grande surprise, requise pour la voie glycolytique en période de stress métabolique.

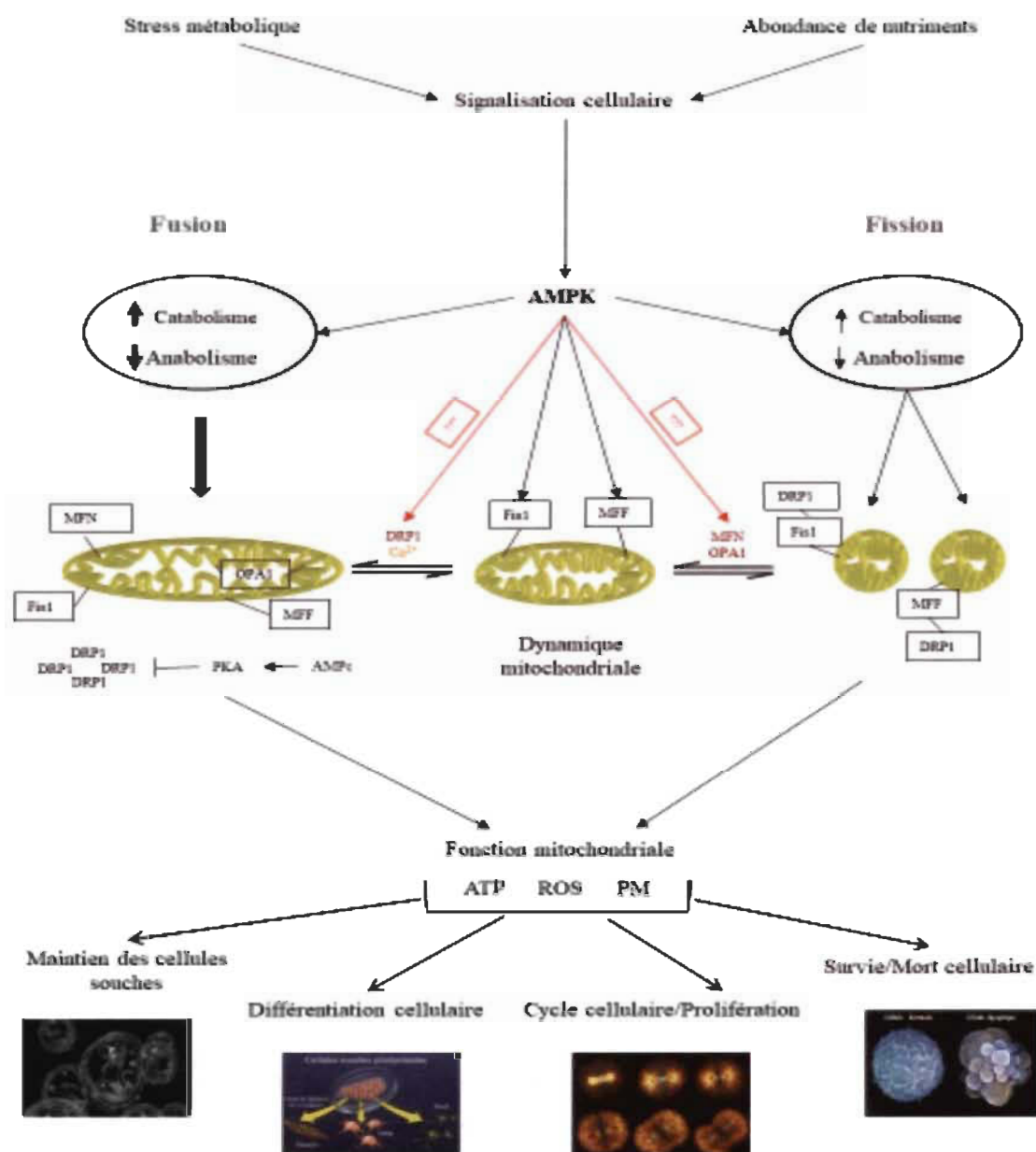


Figure 4.1 Aperçu de la régulation énergétique mitochondriale sous l'effet de l'activation d'AMPK.

Résumé de l'hypothèse de l'interaction d'AMPK et des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale montrant qu'AMPK pourrait affecter directement ou indirectement l'activité de la fonction des mitochondries. Mesure de l'activité de la caspase 3 clivée des cellules wild-type.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Les travaux réalisés pendant le cadre de mon projet de maîtrise nous ont permis de comprendre que l'activation d'AMPK avec l'A769662 en condition basale mène à la fission mitochondriale sans pour autant augmenter la production d'ATP. Si la cellule n'éprouve pas le besoin de produire plus d'ATP alors activer AMPK, dans cette condition, ne mènera pas nécessairement à une augmentation de la production d'ATP. Son rôle sur la fission est inhibé par un autre mécanisme cellulaire indépendant en réponse à un stress métabolique et à l'inverse, la fusion se produit pour maintenir l'efficacité des mitochondries à générer de l'ATP. De plus, il est évident qu'elle a un rôle primordial sur la survie cellulaire puisque son activation semble plus que nécessaire à maintenir efficacement le niveau d'ATP requis pour la cellule dans cette condition.

Nous comprenons ici que l'absence d'AMPK dans cette condition mène à l'activation de la mort cellulaire due à la déplétion d'ATP. Ce dont nous n'avons pas encore déterminé est le lien intrinsèque entre l'absence d'AMPK et l'activation de la mort cellulaire due à la perte d'ATP, c'est-à-dire si la kinase en est la cause ou la conséquence.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires et d'autres paramètres doivent être pris en considération pour pouvoir plus clairement expliquer nos résultats obtenus. Effectivement, il serait nécessaire de mesurer la consommation d'oxygène et également le niveau d'expressions des protéines régulant le dynamisme mitochondrial pour essayer de déterminer si AMPK influencerait de manière directe la respiration cellulaire. De la même manière, mesurer l'incorporation du glucose dans ces cellules ainsi que le taux de divers acides aminés nous permettrait de comprendre le comportement des cellules selon les différentes sources de carbone disponibles ce qui nous permettrait de comprendre la perte du flux glycolytique en absence d'AMPK. Pour finir, un autre aspect qui est

récemment observé est la connectivité mitochondriale. Elle se définit par un rapprochement de deux ou plusieurs mitochondries formant des jonctions sans pour autant fusionner dont la fonction n'est pas encore comprise. Il semblerait que cela pourrait traduire une forme de communication entre ces mitochondries permettant l'échange de divers métabolites ou protéines mitochondriales. C'est un processus qui commence à être mis en avant et qui concerne l'efficacité de la fonction des mitochondries. Il serait tout aussi intéressant de déterminer, dans un premier temps, les conditions dans lesquelles surviennent ces rapprochements et, par ailleurs, les échanges qui s'y produisent, et ce sous l'effet d'AMPK.

L'importance de l'interaction entre cette kinase régulatrice clé du métabolisme cellulaire et la viabilité de la fonction mitochondriale reste encore à approfondir. Il est primordial de comprendre les mécanismes des actions coordonnées d'AMPK dans la régulation du métabolisme énergétique et des protéines impliquées dans le dynamisme mitochondrial.

RÉFÉRENCES

1. Albert, R., *Scale-free networks in cell biology*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 21): p. 4947-57.
2. Brand, M.D., *Regulation analysis of energy metabolism*. J Exp Biol, 1997. **200**(Pt 2): p. 193-202.
3. Woods, S.C. and D.S. Ramsay, *Food intake, metabolism and homeostasis*. Physiol Behav, 2011. **104**(1): p. 4-7.
4. Karpac, J. and H. Jasper, *Metabolic homeostasis: HDACs take center stage*. Cell, 2011. **145**(4): p. 497-9.
5. DeBerardinis, R.J. and C.B. Thompson, *Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?* Cell, 2012. **148**(6): p. 1132-44.
6. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008: **132**(1): p. 27-42.
7. White, E., *Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis*. Autophagy, 2008. **4**(4): p. 399-401.
8. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
9. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(9): p. 1016-23.
10. Gowans, G.J. and D.G. Hardie, *AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 71-5.
11. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 774-85.
12. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. R551-60.
13. Hardie, D.G., *The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 23): p. 5479-87.

14. Curry, D.W., et al., *Targeting AMPK Signaling as a Neuroprotective Strategy in Parkinson's Disease*. J Parkinsons Dis, 2018.
15. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
16. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(4): p. 381-8.
17. Foretz, M., et al., *AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 14767-71.
18. Foretz, M., et al., *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1331-9.
19. Canto, C. and J. Auwerx, *AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(20): p. 3407-23.
20. McGee, S.L. and M. Hargreaves, *AMPK and transcriptional regulation*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3022-33.
21. Hencheliffe, C. and M.F. Beal, *Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis*. Nat Clin Pract Neurol, 2008. **4**(11): p. 600-9.
22. Franco-Iborra, S., M. Vila, and C. Perier, *The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at?* Neuroscientist, 2016. **22**(3): p. 266-77.
23. Bose, A. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2016. **139** Suppl 1: p. 216-231.
24. Poliquin, P.O., et al., *Metabolomics and in-silico analysis reveal critical energy deregulations in animal models of Parkinson's disease*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69146.
25. Rabinovitch, R.C., et al., *AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species*. Cell Rep, 2017. **21**(1): p. 1-9.
26. Courtney, R., et al., *Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(4): p. 841-51.

27. Kato, Y., et al., *Cancer metabolism: New insights into classic characteristics*. Jpn Dent Sci Rev, 2018. **54**(1): p. 8-21.
28. Gingras, M.C. and A. Pause, *FLCN: A new regulator of AMPK-dependent Warburg metabolic reprogramming*. Mol Cell Oncol, 2014. **1**(2): p. e961819.
29. Prakasam, G., et al., *Pyruvate kinase M knockdown-induced signaling via AMP-activated protein kinase promotes mitochondrial biogenesis, autophagy, and cancer cell survival*. J Biol Chem, 2017. **292**(37): p. 15561-15576.
30. Xu, X.D., et al., *Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism*. Oncol Res Treat, 2015. **38**(3): p. 117-22.
31. Hardie, D.G., *AMP-activated protein kinase as a drug target*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 185-210.
32. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1167-74.
33. Fryer, L.G., A. Parbu-Patel, and D. Carling, *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25226-32.
34. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
35. Hwang, J.T., et al., *Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(2): p. 694-9.
36. Lim, H.W., H.Y. Lim, and K.P. Wong, *Uncoupling of oxidative phosphorylation by curcumin: implication of its cellular mechanism of action*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **389**(1): p. 187-92.
37. Lee, Y.S., et al., *Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2256-64.
38. Lee, M.S., et al., *Reduction of body weight by dietary garlic is associated with an increase in uncoupling protein mRNA expression and activation of AMP-activated protein kinase in diet-induced obese mice*. J Nutr, 2011. **141**(11): p. 1947-53.

39. Kudo, N., et al., *High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17513-20.
40. Creighton, J., *Targeting therapeutic effects: subcellular location matters. Focus on "Pharmacological AMP-kinase activators have compartment-specific effects on cell physiology"*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(6): p. C1293-5.
41. Ducommun, S., et al., *Enhanced activation of cellular AMPK by dual-small molecule treatment: AICAR and A769662*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(6): p. E688-96.
42. Madhavi, Y.V., et al., *Targeting AMPK in Diabetes and Diabetic Complications: Energy homeostasis, Autophagy and Mitochondrial health*. Curr Med Chem, 2018.
43. Baena-Gonzalez, E., et al., *A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling*. Nature, 2007. **448**(7156): p. 938-42.
44. Hedbacker, K. and M. Carlson, *SNF1/AMPK pathways in yeast*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2408-20.
45. Bokko, P.B., et al., *Diverse cytopathologies in mitochondrial disease are caused by AMP-activated protein kinase signaling*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(5): p. 1874-86.
46. Narbonne, P. and R. Roy, *Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival*. Nature, 2009. **457**(7226): p. 210-4.
47. Johnson, E.C., et al., *Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced AMPK function in Drosophila*. PLoS One, 2010. **5**(9).
48. Thelander, M., T. Olsson, and H. Ronne, *Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1900-10.
49. Kurumbail, R.G. and M.F. Calabrese, *Structure and Regulation of AMPK*. EXS, 2016. **107**: p. 3-22.
50. Herrero-Martin, G., et al., *TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells*. Embo j, 2009. **28**(6): p. 677-85.
51. Proszkowiec-Weglarz, M., et al., *Characterization of the AMP-activated protein kinase pathway in chickens*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **143**(1): p. 92-106.

52. Stapleton, D., et al., *Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 611-4.
53. Woods, A., et al., *Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10282-90.
54. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
55. Steinberg, G.R. and B.E. Kemp, *AMPK in Health and Disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 1025-78.
56. Zhu, L., et al., *Structural insights into the architecture and allostery of full-length AMP-activated protein kinase*. Structure, 2011. **19**(4): p. 515-22.
57. Salt, I., et al., *AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 1): p. 177-87.
58. Ross, F.A., C. MacKintosh, and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours*. Febs j, 2016. **283**(16): p. 2987-3001.
59. Cheung, P.C., et al., *Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding*. Biochem J, 2000. **346** Pt 3: p. 659-69.
60. Wojtaszewski, J.F., et al., *5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes*. J Physiol, 2005. **564**(Pt 2): p. 563-73.
61. Mahlapuu, M., et al., *Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(2): p. E194-200.
62. Barthel, A., et al., *Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase*. Endocrinology, 2002. **143**(8): p. 3183-6.
63. Kawaguchi, T., et al., *Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3829-35.

64. Lamia, K.A., et al., *AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation*. Science, 2009. **326**(5951): p. 437-40.
65. Oakhill JS1, C.Z., Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay SL, Kemp BE, *β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK)*. PNAS, 2010.
66. Kodiha, M., et al., *Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(5): p. C1427-36.
67. Suzuki, A., et al., *Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4317-27.
68. Hallows, K.R., et al., *Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(5): p. C1297-308.
69. Evans, A.M., et al., *Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells?* J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41504-11.
70. Salt, I.P., et al., *AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release*. Biochem J, 1998. **335** (Pt 3): p. 533-9.
71. Ai, H., et al., *Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulated glucose transport in rat muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(6): p. E1291-300.
72. Fisslthaler, B. and I. Fleming, *Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells*. Circ Res, 2009. **105**(2): p. 114-27.
73. Wojtaszewski, J.F., et al., *Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle*. J Physiol, 2000. **528** Pt 1: p. 221-6.
74. Warden, S.M., et al., *Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 2): p. 275-83.

75. Liang, J., et al., *Myristoylation confers noncanonical AMPK functions in autophagy selectivity and mitochondrial surveillance*. Nature Communications, 2015. **6**: p. 7926.
76. Ali, N., et al., *beta-subunit myristoylation functions as an energy sensor by modulating the dynamics of AMP-activated Protein Kinase*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 39417.
77. Xie, Z.W.N.W.P.L.X., *AMPK and Cancer*. Vol. 107. 2016: Springer, Cham.
78. Hawley, S.A., et al., *Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27879-87.
79. Hawley SA, R.F., Gowans GJ, Tibarewal P, Leslie NR, Hardie DG, *Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells*. Biochem J, 2014.
80. Sanz P, R.T., Garcia-Gimeno MA., *AMPK β subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex*. Febs j, 2013.
81. Polekhina, G., et al., *AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 867-71.
82. Hudson, E.R., et al., *A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 861-6.
83. Xiao, B., et al., *Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 496-500.
84. Scott, J.W., et al., *CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 274-84.
85. Gowans, G.J., et al., *AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation*. Cell Metab, 2013. **18**(4): p. 556-66.
86. Oakhill, J.S., et al., *AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1433-5.

87. Shirwany, N.A. and M.H. Zou, *AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 447-74.
88. Garcia, D. and R.J. Shaw, *AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance*. Mol Cell, 2017. **66**(6): p. 789-800.
89. Jeon, S.M., *Regulation and function of AMPK in physiology and diseases*. Exp Mol Med, 2016. **48**(7): p. e245.
90. Woods, A., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 21-33.
91. Bland, M.L. and M.J. Birnbaum, *Cell biology. ADaPting to energetic stress*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1387-8.
92. Xiao, B., et al., *Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP*. Nature, 2011. **472**(7342): p. 230-3.
93. Hardie, D.G., D. Carling, and S.J. Gamblin, *AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?* Trends Biochem Sci, 2011. **36**(9): p. 470-7.
94. Chen, L., et al., *AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(7): p. 716-8.
95. Peixoto, C.A., et al., *AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration*. Exp Neurol, 2017. **298**(Pt A): p. 31-41.
96. Li, X., et al., *Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen*. Cell Res, 2015. **25**(1): p. 50-66.
97. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 9-19.
98. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
99. Momcilovic, M., S.P. Hong, and M. Carlson, *Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25336-43.

100. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. J Biol, 2003. **2**(4): p. 28.
101. Shaw, R.J., et al., *The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3329-35.
102. Hardie, D.G. and S.C. Lin, *AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor*. F1000Res, 2017. **6**: p. 1724.
103. Shackelford, D.B. and R.J. Shaw, *The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 563-75.
104. Lizcano, J.M., et al., *LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1*. EMBO J, 2004. **23**(4): p. 833-43.
105. Nakano, A. and S. Takashima, *LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity*. Genes Cells, 2012. **17**(9): p. 737-47.
106. Hurley, R.L., et al., *The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29060-6.
107. Fogarty, S., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca²⁺ and AMP*. Biochem J, 2010. **426**(1): p. 109-18.
108. Anderson, K.A., et al., *Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance*. Cell Metab, 2008. **7**(5): p. 377-88.
109. Tamas, P., et al., *Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1665-70.
110. Xie, M., et al., *A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17378-83.
111. Kim SY, J.S., Jung E, Baik KH, Chang M, *AMP-activated protein kinase- α 1 as an activating kinase of TGF- β -activated kinase 1 has a key role in inflammatory signals*. cell death and disease, 2012.
112. Moreno, D., et al., *A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism*. FEBS Lett, 2008. **582**(17): p. 2650-4.

113. Chen, Z., et al., *Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle*. FEBS Lett, 1999. **460**(2): p. 343-8.
114. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 285-9.
115. Clarke, P.R. and D.G. Hardie, *Calmodulin-dependent multiprotein kinase and protein kinase C phosphorylate the same site on HMG-CoA reductase as the AMP-activated protein kinase*. FEBS Lett, 1990. **269**(1): p. 213-7.
116. Clarke, P.R. and D.G. Hardie, *Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver*. EMBO J, 1990. **9**(8): p. 2439-46.
117. Hong, Y.H., et al., *AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27495-501.
118. Jakobsen, S.N., et al., *5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46912-6.
119. Jiang, X.P., et al., *Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells*. Anticancer Res, 2011. **31**(9): p. 2899-906.
120. Koo, S.H., et al., *The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1109-11.
121. Dale, S., et al., *Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I*. FEBS Lett, 1995. **361**(2-3): p. 191-5.
122. Geraghty, K.M., et al., *Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR*. Biochem J, 2007. **407**(2): p. 231-41.
123. Faubert, B., et al., *AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo*. Cell Metab, 2013. **17**(1): p. 113-24.
124. Taylor, E.B., et al., *Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9787-96.

125. Wu, N., et al., *AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1*. Mol Cell, 2013. **49**(6): p. 1167-75.
126. Chaube, B. and M.K. Bhat, *AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2044.
127. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.
128. Wu, Y., et al., *Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9777-88.
129. Lee, W.J., et al., *Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2488-94.
130. Lessard, S.J., et al., *Chronic rosiglitazone treatment restores AMPKalpha2 activity in insulin-resistant rat skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(2): p. E251-7.
131. Muse, E.D., et al., *Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 232-9.
132. Wilkes, J.J., et al., *Topiramate treatment causes skeletal muscle insulin sensitization and increased Acrp30 secretion in high-fat-fed male Wistar rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(6): p. E1015-22.
133. Kukidome, D., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 120-7.
134. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages*. Circulation, 2001. **103**(8): p. 1057-63.
135. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
136. Mizukoshi, E., et al., *Cell-cycle dependent tyrosine phosphorylation on mortalin regulates its interaction with fibroblast growth factor-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 1203-9.

137. Tomas, E., et al., *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16309-13.
138. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1829-34.
139. Beg, Z.H., J.A. Stonik, and H.B. Brewer, Jr., *Solubilization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat and chicken liver microsomes*. Anal Biochem, 1978. **86**(2): p. 531-5.
140. Browne, G.J., S.G. Finn, and C.G. Proud, *Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 2220-31.
141. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
142. Wang, W., et al., *AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3425-36.
143. Carattino, M.D., et al., *Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 17608-16.
144. Hallows, K.R., et al., *Regulation of channel gating by AMP-activated protein kinase modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in lung submucosal cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 998-1004.
145. Zheng, D., et al., *Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(3): p. 1073-83.
146. Stoppani, J., et al., *AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1239-48.
147. Sakamoto, K. and G.D. Holman, *Emerging role for ASI60/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(1): p. E29-37.
148. Lin, S.S., J.K. Manchester, and J.I. Gordon, *Enhanced gluconeogenesis and increased energy storage as hallmarks of aging in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 36000-7.

149. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
150. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
151. Deberardinis, R.J., et al., *Brick by brick: metabolism and tumor cell growth*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 54-61.
152. Gingras, A.C., et al., *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1422-37.
153. Holz, M.K., et al., *mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events*. Cell, 2005. **123**(4): p. 569-80.
154. Kalender, A., et al., *Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner*. Cell Metab, 2010. **11**(5): p. 390-401.
155. Zang, M., et al., *Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2180-91.
156. Hoppe, S., et al., *AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17781-6.
157. *LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress*. J Cell Biol, 2013. **203**(2): p. 373.
158. Kim, T.S., P. Leahy, and H.C. Freake, *Promoter usage determines tissue specific responsiveness of the rat acetyl-CoA carboxylase gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(2): p. 647-53.
159. Carling, D., V.A. Zammit, and D.G. Hardie, *A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis*. FEBS Lett, 1987. **223**(2): p. 217-22.
160. Barber, M.C., N.T. Price, and M.T. Travers, *Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1733**(1): p. 1-28.
161. Ha, J., et al., *Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 22162-8.

162. Sato R, G.J., Brown MS., *Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion.* PNAS, 1993.
163. Baron, A., et al., *Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer?* J Cell Biochem, 2004. **91**(1): p. 47-53.
164. Adeva-Andany, M.M., et al., *Glycogen metabolism in humans.* BBA Clin, 2016. **5**: p. 85-100.
165. Young, M.E., G.K. Radda, and B. Leighton, *Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR--an activator of AMP-activated protein kinase.* FEBS Lett, 1996. **382**(1-2): p. 43-7.
166. Jorgensen, S.B., et al., *The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading.* Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3074-81.
167. Lewin, T.M., et al., *Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria.* J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13488-95.
168. Muoio, D.M., et al., *AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target.* Biochem J, 1999. **338 (Pt 3)**: p. 783-91.
169. Watt, M.J., et al., *Reduced plasma FFA availability increases net triacylglycerol degradation, but not GPAT or HSL activity, in human skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(1): p. E120-7.
170. Assifi, M.M., et al., *AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E794-800.
171. Witters, L.A., et al., *Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states.* Arch Biochem Biophys, 1994. **308**(2): p. 413-9.
172. Bolsoni-Lopes, A. and M.I. Alonso-Vale, *Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update.* Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(4): p. 335-42.
173. Ahmadian, M., Y. Wang, and H.S. Sul, *Lipolysis in adipocytes.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 555-9.

174. Moczulski, D., I. Majak, and D. Mamczur, *An overview of beta-oxidation disorders*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2009. **63**: p. 266-77.
175. Takagi, A., et al., *Emerging role of mammalian autophagy in ketogenesis to overcome starvation*. *Autophagy*, 2016. **12**(4): p. 709-10.
176. Daval, M., et al., *Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(26): p. 25250-7.
177. Fisher, J.S., et al., *Muscle contractions, AICAR, and insulin cause phosphorylation of an AMPK-related kinase*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **289**(6): p. E986-92.
178. Smith, A.C., C.R. Bruce, and D.J. Dyck, *AMP kinase activation with AICAR simultaneously increases fatty acid and glucose oxidation in resting rat soleus muscle*. *J Physiol*, 2005. **565**(Pt 2): p. 537-46.
179. Smith, J.L., P.B. Patil, and J.S. Fisher, *AICAR and hyperosmotic stress increase insulin-stimulated glucose transport*. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. **99**(3): p. 877-83.
180. Ahmadian, M., et al., *Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype*. *Cell Metab*, 2011. **13**(6): p. 739-48.
181. Watt, M.J., et al., *Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **290**(3): p. E500-8.
182. Clark, H., D. Carling, and D. Saggerson, *Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(11): p. 2215-24.
183. Suchankova, G., et al., *Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **326**(4): p. 851-8.
184. Mizushima, N. and B. Levine, *Autophagy in mammalian development and differentiation*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(9): p. 823-30.
185. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(5): p. 589-98.
186. Yang, J., et al., *The regulation of the autophagic network and its implications for human disease*. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(10): p. 1121-33.

187. Hipolito, V.E.B., E. Ospina-Escobar, and R.J. Botelho, *Lysosome remodelling and adaptation during phagocyte activation*. Cell Microbiol, 2018. **20**(4).
188. Sanchez, A.M., et al., *AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1*. J Cell Biochem, 2012. **113**(2): p. 695-710.
189. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 458-71.
190. Zhao, J., et al., *FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 472-83.
191. Jornayvaz, F.R. and G.I. Shulman, *Regulation of mitochondrial biogenesis*. Essays Biochem, 2010. **47**: p. 69-84.
192. Wenz, T., *Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress*. Mitochondrion, 2013. **13**(2): p. 134-42.
193. Bergeron, R., et al., *Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(6): p. E1340-6.
194. Canto, C. and J. Auwerx, *PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 98-105.
195. Carlson, C.A. and K.H. Kim, *Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation*. Arch Biochem Biophys, 1974. **164**(2): p. 478-89.
196. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
197. Liang, J., et al., *The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 218-24.
198. Bjorklund, M.A., et al., *Non-CDK-bound p27 (p27(NCDK)) is a marker for cell stress and is regulated through the Akt/PKB and AMPK-kinase pathways*. Exp Cell Res, 2010. **316**(5): p. 762-74.

199. Li, N., et al., *Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells (Review)*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(6): p. 2821-6.
200. Baas, A.F., et al., *Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD*. *Cell*, 2004. **116**(3): p. 457-66.
201. Brenman, J.E., *AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(22): p. 2755-9.
202. Jansen, M., et al., *LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 777-98.
203. Campanale, J.P., T.Y. Sun, and D.J. Montell, *Development and dynamics of cell polarity at a glance*. *J Cell Sci*, 2017. **130**(7): p. 1201-1207.
204. Stehbens, S. and T. Wittmann, *Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics*. *J Cell Biol*, 2012. **198**(4): p. 481-9.
205. Lee, J.L. and C.H. Streuli, *Integrins and epithelial cell polarity*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 15): p. 3217-25.
206. Watts, J.L., et al., *The C. elegans par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry*. *Development*, 2000. **127**(7): p. 1467-75.
207. Martin, S.G. and D. St Johnston, *A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity*. *Nature*, 2003. **421**(6921): p. 379-84.
208. Zheng, B. and L.C. Cantley, *Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(3): p. 819-22.
209. Zhang, L., et al., *AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(46): p. 17272-7.
210. Sebbagh, M., et al., *Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin*. *Curr Biol*, 2009. **19**(1): p. 37-42.
211. Miyamoto, T., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(7): p. 4430-8.

212. Zhang L, J.F., Rinehart J, Sfakianos J, Mellman I, Lifton RP, Young LH, Caplan MJ., *AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibition induce Ca²⁺-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane.* 2011.
213. Amato, S., et al., *AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization.* Science, 2011. **332**(6026): p. 247-51.
214. Horman, S., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase.* J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18505-12.
215. Lee, J.H., et al., *Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase.* Nature, 2007. **447**(7147): p. 1017-20.
216. Williams, T., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5849-54.
217. Nakano, A., et al., *AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 583-90.
218. Choi, J.H., et al., *The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase.* EMBO Rep, 2002. **3**(10): p. 988-94.
219. Drewes, G., et al., *MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption.* Cell, 1997. **89**(2): p. 297-308.
220. Nishimura, I., Y. Yang, and B. Lu, *PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in Drosophila.* Cell, 2004. **116**(5): p. 671-82.
221. Friedman, J.R. and J. Nunnari, *Mitochondrial form and function.* Nature, 2014. **505**(7483): p. 335-43.
222. Kasahara, A. and L. Scorrano, *Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation.* Trends Cell Biol, 2014. **24**(12): p. 761-70.
223. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
224. Detmer, S.A. and D.C. Chan, *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 870-9.

225. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
226. Labbe, K., A. Murley, and J. Nunnari, *Determinants and functions of mitochondrial behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 357-91.
227. Mannella, C.A., *Structural diversity of mitochondria: functional implications*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 171-9.
228. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
229. Bratic, A. and N.G. Larsson, *The role of mitochondria in aging*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 951-7.
230. Calvo, S.E. and V.K. Mootha, *The mitochondrial proteome and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2010. **11**: p. 25-44.
231. Chan, D.C., *Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 265-87.
232. Seyfried, T.N., et al., *Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics*. Carcinogenesis, 2014. **35**(3): p. 515-27.
233. Colombini, M., E. Blachly-Dyson, and M. Forte, *VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane*. Ion Channels, 1996. **4**: p. 169-202.
234. Gincel, D., H. Zaid, and V. Shoshan-Barmatz, *Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 147-55.
235. Herrmann, J.M. and W. Neupert, *Protein transport into mitochondria*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(2): p. 210-4.
236. Schatz, G. and B. Dobberstein, *Common principles of protein translocation across membranes*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1519-26.
237. Rusch, S.L. and D.A. Kendall, *Protein transport via amino-terminal targeting sequences: common themes in diverse systems*. Mol Membr Biol, 1995. **12**(4): p. 295-307.
238. Ryan, K.R. and R.E. Jensen, *Protein translocation across mitochondrial membranes: what a long, strange trip it is*. Cell, 1995. **83**(4): p. 517-9.

239. Schleyer, M. and W. Neupert, *Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes*. Cell, 1985. **43**(1): p. 339-50.
240. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(2): p. 51-2.
241. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis**. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 95-118.
242. Wang, C., X. Liu, and B. Wei, *Mitochondrion: an emerging platform critical for host antiviral signaling*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(5): p. 647-65.
243. Straub Sebastian, P., et al., *Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery*, in *Biological Chemistry*. 2016. p. 1097.
244. Kuhlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biol, 2015. **13**: p. 89.
245. Herrmann, J.M. and J. Riemer, *The intermembrane space of mitochondria*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(9): p. 1341-58.
246. Chipuk, J.E., L. Bouchier-Hayes, and D.R. Green, *Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1396-402.
247. Vogel, F., et al., *Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane*. J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 237-47.
248. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system*. J Cell Biol, 2014. **204**(7): p. 1083-6.
249. Schafer, E., et al., *Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15370-5.
250. Althoff, T., et al., *Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1*. EMBO J, 2011. **30**(22): p. 4652-64.
251. Schagger, H. and K. Pfeiffer, *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. EMBO J, 2000. **19**(8): p. 1777-83.
252. von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, and P. Dimroth, *Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 649-72.

253. Davies, K.M., et al., *Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(34): p. 13602-7.
254. Scorrano, L., et al., *A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis*. Dev Cell, 2002. **2**(1): p. 55-67.
255. Patten, D.A., et al., *OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand*. EMBO J, 2014. **33**(22): p. 2676-91.
256. Davies, K.M., et al., *Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14121-6.
257. Germain, M., *OPA1 and mitochondrial solute carriers in bioenergetic metabolism*. Mol Cell Oncol, 2015. **2**(2): p. e982378.
258. Harner, M.E., et al., *An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation*. Elife, 2016. **5**.
259. Hangen, E., et al., *Life with or without AIF*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(5): p. 278-87.
260. Modjtahedi, N., et al., *Apoptosis-inducing factor: vital and lethal*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(5): p. 264-72.
261. Bagli, E., et al., *Mitochondrial Membrane Dynamics and Inherited Optic Neuropathies*. In Vivo, 2017. **31**(4): p. 511-525.
262. Bano, D. and J.H.M. Prehn, *Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer*. EBioMedicine, 2018. **30**: p. 29-37.
263. Del Dotto, V., et al., *OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions*. Cell Rep, 2017. **19**(12): p. 2557-2571.
264. Voet, D.V.J.G.P.C.W., *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. Fourth edition ed. 2013, United States: Hoboken, NJ : John Wiley.
265. Pfeffer, S., et al., *Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6019.
266. Kukat, C., et al., *Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(36): p. 11288-93.

267. Kukat, C., et al., *Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13534-9.
268. Ngo, H.B., et al., *Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3077.
269. Bonawitz, N.D., D.A. Clayton, and G.S. Shadel, *Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 813-25.
270. Campbell, C.T., J.E. Kolesar, and B.A. Kaufman, *Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(9-10): p. 921-9.
271. Falkenberg, M., N.G. Larsson, and C.M. Gustafsson, *DNA replication and transcription in mammalian mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 679-99.
272. Rubio-Cosials, A. and M. Sola, *U-turn DNA bending by human mitochondrial transcription factor A*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(1): p. 116-24.
273. DiMauro, S. and G. Davidzon, *Mitochondrial DNA and disease*. Ann Med, 2005. **37**(3): p. 222-32.
274. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 389-402.
275. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
276. Lackner, L.L., *Shaping the dynamic mitochondrial network*. BMC Biol, 2014. **12**: p. 35.
277. Li, X.B., J.D. Gu, and Q.H. Zhou, *Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy*. Thorac Cancer, 2015. **6**(1): p. 17-24.
278. Zhang, N. and A.A. Sauve, *Regulatory Effects of NAD(+) Metabolic Pathways on Sirtuin Activity*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2018. **154**: p. 71-104.
279. Benard, G., et al., *Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 698-709.

280. McCormack, J.G., *Characterization of the effects of Ca²⁺ on the intramitochondrial Ca²⁺-sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria*. *Biochem J*, 1985. **231**(3): p. 581-95.
281. Yankovskaya, V., et al., *Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation*. *Science*, 2003. **299**(5607): p. 700-4.
282. Korla, K. and C.K. Mitra, *Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation*. *J Biomol Struct Dyn*, 2014. **32**(2): p. 242-56.
283. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. *Biochem J*, 2011. **435**(2): p. 297-312.
284. Moghadam, A.A., et al., *Isolation and in silico functional analysis of MtATP6, a 6-kDa subunit of mitochondrial F(1)F0-ATP synthase, in response to abiotic stress*. *Genet Mol Res*, 2012. **11**(4): p. 3547-67.
285. McCormack, J.G., A.P. Halestrap, and R.M. Denton, *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism*. *Physiol Rev*, 1990. **70**(2): p. 391-425.
286. Takehara, Y., et al., *Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **323**(1): p. 27-32.
287. Nalin, C.M. and R.L. Cross, *Adenine nucleotide binding sites on beef heart F1-ATPase. Specificity of cooperative interactions between catalytic sites*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(14): p. 8055-60.
288. Rogers, G.W., et al., *Assessment of fatty acid beta oxidation in cells and isolated mitochondria*. *Curr Protoc Toxicol*, 2014. **60**: p. 25 3 1-19.
289. Dellomonaco, C., et al., *Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 355-9.
290. Corthesy-Theulaz, I.E., et al., *Cloning and characterization of Helicobacter pylori succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25659-67.
291. Wagenmakers, A.J., *Protein and amino acid metabolism in human muscle*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **441**: p. 307-19.
292. Mills, E.L. and L.A. O'Neill, *Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal*. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(1): p. 13-21.

293. Sousa, M.I., et al., *Mitochondrial Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Proliferating Cells*. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(20): p. 2493-504.
294. Porporato, P.E., et al., *Mitochondrial metabolism and cancer*. *Cell Res*, 2018. **28**(3): p. 265-280.
295. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer metabolism: a therapeutic perspective*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(1): p. 11-31.
296. Pietrocola, F., et al., *Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger*. *Cell Metab*, 2015. **21**(6): p. 805-21.
297. Rohrig, F. and A. Schulze, *The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(11): p. 732-749.
298. Danhier, P., et al., *Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect*. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1858**(8): p. 556-572.
299. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of autophagy and related processes*. *EMBO J*, 2017. **36**(13): p. 1811-1836.
300. Wellen, K.E., et al., *ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1076-80.
301. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. *Cell Metab*, 2016. **23**(1): p. 27-47.
302. Zhao, S., et al., *ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch*. *Cell Rep*, 2016. **17**(4): p. 1037-1052.
303. Willems, P.H., et al., *Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics*. *Cell Metab*, 2015. **22**(2): p. 207-18.
304. McGuirk, S., et al., *PGC-1alpha supports glutamine metabolism in breast cancer*. *Cancer Metab*, 2013. **1**(1): p. 22.
305. Bonora, M., et al., *Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition*. *Oncogene*, 2015. **34**(12): p. 1475-86.
306. Formentini, L., et al., *The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response*. *Mol Cell*, 2012. **45**(6): p. 731-42.

307. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
308. Domenis, R., et al., *Glucose-modulated mitochondria adaptation in tumor cells: a focus on ATP synthase and inhibitor Factor 1*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(2): p. 1933-50.
309. Atsumi, T., et al., *High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5881-7.
310. Korotchkina, L.G. and M.S. Patel, *Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37223-9.
311. Palsson-McDermott, E.M., et al., *Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages*. Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 65-80.
312. Yang, W. and Z. Lu, *Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect*. Cell Cycle, 2013. **12**(19): p. 3154-8.
313. Yang, W., et al., *ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(12): p. 1295-304.
314. Weinberg, S.E., L.A. Sena, and N.S. Chandel, *Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity*. Immunity, 2015. **42**(3): p. 406-17.
315. Burlacu, A., *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins*. J Cell Mol Med, 2003. **7**(3): p. 249-57.
316. Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 299-310.
317. Hu, Y., et al., *Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis*. EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3586-95.
318. Richter, C., et al., *Control of apoptosis by the cellular ATP level*. FEBS Lett, 1996. **378**(2): p. 107-10.
319. Braun, F., et al., *Serum-nutrient starvation induces cell death mediated by Bax and Puma that is counteracted by p21 and unmasked by Bcl-x(L) inhibition*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23577.

320. West, A.P., et al., *TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 476-80.
321. Bulua, A.C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS)*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 519-33.
322. Sorbara, M.T. and S.E. Girardin, *Mitochondrial ROS fuel the inflammasome*. Cell Res, 2011. **21**(4): p. 558-60.
323. Austin, S. and J. St-Pierre, *PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 21): p. 4963-71.
324. Handschin, C. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism*. Endocr Rev, 2006. **27**(7): p. 728-35.
325. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
326. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R169-76.
327. Twig, G. and O.S. Shirihai, *The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(10): p. 1939-51.
328. Chen, H. and D.C. Chan, *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No. 2**: p. R283-9.
329. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
330. Delettre, C., et al., *Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene*. Hum Genet, 2001. **109**(6): p. 584-91.
331. Frezza, C., et al., *OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion*. Cell, 2006. **126**(1): p. 177-89.
332. Germain, M., et al., *Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis*. EMBO J, 2005. **24**(8): p. 1546-56.

333. Olichon, A., et al., *Loss of OPA1 perturbrates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7743-6.
334. Song, Z., et al., *OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 749-55.
335. Song, Z., et al., *Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(15): p. 3525-32.
336. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency*. Cell, 2013. **155**(1): p. 160-71.
337. Chen, H., et al., *Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations*. Cell, 2010. **141**(2): p. 280-9.
338. Varanita, T., et al., *The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage*. Cell Metab, 2015. **21**(6): p. 834-44.
339. DeVay, R.M., et al., *Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion*. J Cell Biol, 2009. **186**(6): p. 793-803.
340. Mishra, P. and D.C. Chan, *Metabolic regulation of mitochondrial dynamics*. J Cell Biol, 2016. **212**(4): p. 379-87.
341. Belenguer, P. and L. Pellegrini, *The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria?* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(1): p. 176-83.
342. Mandemakers, W., V.A. Morais, and B. De Strooper, *A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 10): p. 1707-16.
343. Rambold, A.S., et al., *Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(25): p. 10190-5.
344. Molina, A.J., et al., *Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis*. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2303-15.

345. Gomes, L.C. and L. Scorrano, *Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times*. *Autophagy*, 2011. **7**(10): p. 1251-3.
346. Galloway, C.A., H. Lee, and Y. Yoon, *Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(12): p. 2218-28.
347. Pitts, K.R., et al., *The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(12): p. 4403-17.
348. Yoon, Y., K.R. Pitts, and M.A. McNiven, *Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(9): p. 2894-905.
349. Chang, C.R. and C. Blackstone, *Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1201**: p. 34-9.
350. Frank, S., et al., *The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis*. *Dev Cell*, 2001. **1**(4): p. 515-25.
351. Jagasia, R., et al., *DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in C. elegans*. *Nature*, 2005. **433**(7027): p. 754-60.
352. Lee, Y.J., et al., *Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(11): p. 5001-11.
353. Otera, H., N. Ishihara, and K. Mihara, *New insights into the function and regulation of mitochondrial fission*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(5): p. 1256-68.
354. Lima, A.R., et al., *Dynamin-Related Protein 1 at the Crossroads of Cancer*. *Genes (Basel)*, 2018. **9**(2).
355. Taguchi, N., et al., *Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11521-9.
356. Zhan, L., et al., *Drp1-mediated mitochondrial fission promotes cell proliferation through crosstalk of p53 and NF-kappaB pathways in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(40): p. 65001-65011.
357. Kim, H., et al., *Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia*. *Mol Cell*, 2011. **44**(4): p. 532-44.

358. Ong, S.B., et al., *Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*, 2010. **121**(18): p. 2012-22.
359. Cribbs, J.T. and S. Strack, *Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death*. *EMBO Rep*, 2007. **8**(10): p. 939-44.
360. Antignani, A. and R.J. Youle, *How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?* *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(6): p. 685-9.
361. Cassidy-Stone, A., et al., *Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization*. *Dev Cell*, 2008. **14**(2): p. 193-204.
362. Youle, R.J., *Morphology of mitochondria during apoptosis: worms-to-beetles in worms*. *Dev Cell*, 2005. **8**(3): p. 298-9.
363. Harris, M.H. and C.B. Thompson, *The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability*. *Cell Death Differ*, 2000. **7**(12): p. 1182-91.
364. Toyama, E.Q., et al., *Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress*. *Science*, 2016. **351**(6270): p. 275-281.
365. Vincent, E.E., et al., *Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism*. *Oncogene*, 2015. **34**(28): p. 3627-39.
366. Liu, X., et al., *Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(4): p. E435-44.
367. Kravchenko, D.V., et al., *1,3-Dioxo-4-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]quinolines as potent caspase-3 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. **15**(7): p. 1841-5.
368. Maldonado, E.N., et al., *ATP/ADP Turnover and Import of Glycolytic ATP into Mitochondria in Cancer Cells Is Independent of the Adenine Nucleotide Translocator*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(37): p. 19642-50.
369. Zickermann, V., et al., *Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I*. *Science*, 2015. **347**.

370. Vogel, F., et al., *Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane*. J Cell Biol, 2006. **175**.
371. Schleyer, M. and W. Neupert, *Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes*. Cell, 1985. **43**.
372. Dröse, S. and U. Brandt, *Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Adv Exp Med Biol, 2012. **748**.
373. Bossy-Wetzell, E., et al., *Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 706-16.
374. O'Neill, H.M., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 16092-7.
375. Paumard, P., et al., *The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology*. EMBO J, 2002. **21**.
376. Kühlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biology, 2015. **13**(1): p. 89.
377. Detmer, S.A. and D.C. Chan, *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**.
378. Chowanadisai, W., et al., *Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 142-52.
379. Shaywitz, A.J. and M.E. Greenberg, *CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 821-61.
380. Wu, Z., et al., *Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1alpha transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14379-84.