

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de MPV17, une protéine de la membrane mitochondriale interne, dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Khelfi, Alexis

Award date: 2017

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- · Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
 You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté de Sciences

Etude de MPV17, une protéine de la membrane mitochondriale interne, dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Alexis KHELFI

Janvier 2017



Faculté de Sciences

Etude de MPV17, une protéine de la membrane mitochondriale interne, dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Alexis KHELFI

Janvier 2017

Université de Namur FACULTE DES SCIENCES Secrétariat du Département de Biologie Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20 E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Etude de Mpv17, une protéine de la membrane mitochondriale interne, dans le contrôle de la prolifération cellulaire

KHELFI Alexis

Résumé

Mpv17 est une protéine de 17kDa logée dans la membrane mitochondriale interne et faisant partie d'un complexe de 600kDa de composition encore inconnue. Bien que sa fonction cellulaire soit encore inconnue, certaines hypothèses émergent : Mpv17 peut jouer un rôle dans le maintien de l'ADNmt car la déficience de cette protéine est associée aux syndromes de déplétion d'ADNmt (MDDS), un effet qui pourrait être lié à la synthèse de nucléotides.

Il a été démontré récemment dans notre laboratoire que le silençage de *MPV17* provoquait une réduction de la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses, ce qui suggère un rôle pour cette protéine dans la prolifération cellulaire.

Afin d'étudier les mécanismes qui sous-tendent le rôle de Mpv17 dans la prolifération, trois pistes ont été investiguées en comparant des cellules Hep3B transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17). Dans un premier temps, nous avons montré que le silençage de MPV17 n'induit qu'une déplétion modérée d'ADNmt contrairement à ce qui est observé dans des hépatocytes de patients atteints d'un MDDS. Deuxièmement nous avons confirmé une réduction d'abondance de certaines protéines impliquées dans le cycle cellulaire: Mitogen-activated protein kinaseinteracting kinase 1 (Mnk1) et Programmed cell death 4 (Pdcd4) qui peuvent réguler la traduction de certains ARNm spécifiques, bien que les conséquences fonctionnelles de ces réductions d'abondance restent à être déterminées. Enfin, le résultat le plus intéressant est basé sur le rôle putatif de Mpv17 dans la synthèse de nucléotides. Une forte réduction de l'abondance protéique d'Activating Transcription Factor 4 (ATF4) a été montrée dans les cellules silencées pour MPV17. Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans différents processus cellulaires. L'un des gènes régulé par ATF4 est MTHFD2 (methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 2) dont l'expression est fortement diminuée dans les cellules silencées pour Mpv17. MTHFD2 est localisée dans la mitochondrie et participe à la voie du tétrahydrofolate (THF), essentiel pour la synthèse des purines. C'est particulièrement intéressant car Mpv17 est fortement surexprimée dans des biopsies d'hépatocarciomes humains qui sont caractérisés par une grande capacité de synthèse nucléotidique. De plus, d'autres gènes régulés par ATF4 et impliqués dans la voie du THF, dans la synthèse d'acides aminés ou dans le transport d'acides aminés, présentent une réduction de leur expression. Cela suggérerait que plusieurs voies métaboliques sont impactées lors du silençage de MPV17, ce qui pourrait expliquer la moindre prolifération.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire Janvier 2017 **Promoteur:** P. Renard **Co-promoteur** : T. Arnould

Table des abréviations

Table d'abréviations

AARE	Amino acid response element			
ADNmt	ADN mitochondrial			
AP1	Activator Protein 1			
ASNS	Asparagine synthétase			
ASL	Argininosuccinate lyase			
ASS	Argininosuccinate synthétase			
ATF3	Activating transcription factor 3			
ATF4	Activating transcription factor 4			
ATF5	Activating transcription factor 5			
ATF6	Activating transcription factor 6			
ATP5G2	ATP synthase proton-transporting mitochondrial F(0) complex subunit C2			
BNE	Blue-Native Electrophoresis			
CARE	C/EBP-ATF response element			
CBP	CREB-Binding Protein			
CHOP10	C/EBP Homology Protein			
CMC2	C-X(9)-C Motif Containing 2			
DGUOK	Deoxyguanosine kinase			
DNMT1	DNA methyltransférase 1			
eFF2	eukaryotic elongation factor 2			
eFF2K	eukaryotic elongation factor 2 kinase			
eIF4A	eukaryotic initiation factor 4 A			
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4 F			
eIF2s2	eukaryotic initiation factor 2 sous-unité 2			
eIF3c	eukaryotic initiation factor 3 c			
eIF4g2	eukaryotic initiation factor 4 gamma 2			
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4 gamma 2			
alE4G	eukaryotic initiation factor 4 F			
aIE5	eukaryotic initiation factor 5			
AE DD1	alE4E Dinding Protoin			
4E-DFI AE SE	olE4E consitivity element			
4E-SE	Electron transporter abain			
GCN12	General control non derenressible protein 2			
Ght 1	Chucing transporter 1			
GVS1	Glycene transporter 1			
	Use a solution of the second s			
	Hemaggiutinne Histore softultronofinges			
	Historie acetyliransierase			
HDM2	Human MDM2			
HERP	Homocysteine-induced endoplamsic reticulum protein			
HMOXI	Heme-Oxygenase I			
HKI	Heme-regulated elf 2a kinase			
ISK	Integrated Stress Response			
IKEI	Inositol-requiring enzyme I			
KDM4C=JMJD2C	Lysine-specific Demethylase 4C= Jumonji domain-containing protein 2C			
LRPPRC	Leucine-rich pentatricopeptide repeat protein			
MDDS	Mitochondrial DNA depletion syndrome (syndröme de déplétion d'ADN			
LADY.	mitochondrial)			
MAPK	Mitogen activated protein kinase			
MIMI	Membrane mitochondriale interne			

ssembly factor 5	
ssembly factor 5	
1 7	
7	
Nitric oxide synthase	
NAD(P)H Dehvdrogenase Quinone 1	
Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2	
Nutrient-sensing response element	
phosphorylation oxydative	
PolyA Binding Protein	
P300/CBP-associated factor	
Programmed cell death 4	
Programmed cell death 4 PKR-like ER kinase	
PKK-like EK Kinase Phosphoglycérate déshydrogénase	
Protein Kinase C	
nhosphosérine nhonhatase	
Ras homolog enriched in brain	
Reactive Oxygen Species	
ribosomal protein S6 kinase A1	
serine hydroxyméthyl transférase 1	
serine hydroxymethyl transférase 2	
Serine/arginine-rich splicing factor 3	
Serine/arginine-rich splicing factor 3 tricarboxylic acid	
Microscopie électronique à transmission	
Terminal Oligopyrimidine	
Tribbles homolog 3	
Tuberous sclerosis 2	
Unfolded Protein Response	

Remerciements

Au bout de 10 mois de travail au labo, quelques remerciements s'imposent :

Je remercie mes parents (mon père, ma mère, mon baboune), qui m'ont permis de faire la biologie, qui m'ont toujours soutenu, et qui se montraient intéressés par mes manipulations et mon sujet. Mes deux frères et ma sœur sont aussi à remercier pour leur folie, leur soutien. Mon petit frère de cinq ans qui est formidable me permettait souvent de m'échapper un peu de mon mémoire en jouant avec lui.

Je remercie tout particulièrement Morgane Canonne (Morganelle pour les intimes ;-)), une encadrante toujours souriante, dont le rire est communicatif. Une personne avec qui j'aimais discuter tant au niveau de biologie, mais aussi dans la vie de tous les jours. Une personne avec qui je déconnais beaucoup, mais qui déconnait aussi beaucoup ⁽³⁾. Je suis certain que tu auras ta thèse, il n'y a aucun doute de cela (étant donné que tu te poses énormément de questions sur toutes les manipulations, résultats, etc). Je te souhaite de trouver la bonne supplémentation sur les cellules transduites (tu y arriveras !), mais le plus important, je te souhaite d'être heureuse ⁽³⁾.

Je remercie également le laboratoire de l'URBC qui est composé de personnes extraordinaires : Kathleen, les Sebastien, Maude, Antoine, Géraldine, François, Sophie, Marie, Emilie, Valérie, Guy, Martine, Noelle, Catherine et bien d'autres que j'ai oublié.

Je remercie aussi mes «collègues» mémorants avec lesquels on se marrait toujours bien, mais surtout pour leur aide et leur soutien sans faille lors de la fin de ce mémoire. A tous nos fous rire et ces moments de discussion en toute amitié forgée pendant ce mémoire ©.

Je remercie également tous mes amis : Olivia, Camille, Louise, Chloé, Pauline et Pauline, Antoine. Des personnes avec qui j'aime discuter, rigoler, boire un verre (un café bien sûr ;-) !) ou juste passer du temps. Que les étoiles veillent sur vous !

Je remercie EndNote qui m'a permis d'avoir une belle bibliographie bien uniforme ;-).

Je remercie les membres de mon jury d'avoir pris du temps à lire ce mémoire.

Finalement, je remercie ma promotrice et mon co-promoteur qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et qui m'ont permis de réaliser ce projet de recherche qui était et qui est passionnant. Je remercie tout particulièrement ma promotrice de m'avoir appris le métier de biologiste en me permettant de me poser les bonnes questions lors de l'obtention de certains beaux résultats ou lors de problèmes qui se sont multipliés lors de la fin de ce mémoire.

Table des matières

I.	Introduction		
1.	Les syndromes de déplétion d'ADN mitochondrial	1	
2.	La protéine Mpv17	2	
	2. 1. Etat de l'art concernant les orthologues de MPV17	2	
	2.1.1. <i>MPV17</i> murin	2	
	2.1.2. SYM1, l'orthologue de MPV17 chez la levure Saccharomyces cerevisiae		
	2.1.5. <i>MFV17</i> , 1 of utologue de <i>MFV17</i> chez <i>Danio Ferto</i>		
3.	Resultats anterieurs obtenus au laboratoire	ð	
4.	Les acteurs de la traduction réprimés suite au silençage de MPV17	9	
	4.1. Les proteines Mnk		
	4.2. La proteine Paca4		
5.	ATF4, un facteur de transcription réprimé suite au silençage de MPV17		
	5.1. ATF4 et l'integrated stress response (ISR)		
	5.2. A 1F4 et la vole du tetranydroiolate (1HF)		
	5.2.2. ATF4 et la traduction protéigue		
	5.2.3. ATF4 et les transporteurs d'acides aminés		
	5.2.3.1. SLC7A5 (LAT1)		
	5.2.3.2. SLC7A11 (xCT)		
	5.2.3.3. SLC1A5 (ASCT2)		
	5.2.3.4. SNAT1 (SLC38A1/ATA1)		
	5.2.3.5. SLC/AI (CATI)	18	
II.	Objectif du mémoire		
III.	Matériel et méthodes		
1.	Culture cellulaire		
2.	Transduction lentivirale		
3.	Western Blot		
4.	RT-PCR en temps réel		
5.	Extraction d'ADN et évaluation du nombre de copie d'ADN mitochondrial2		
6.	Transfection des cellules Hep3B		
7.	Supplémentations des cellules Hep3B transduites et évaluation de la prolifération cellulaire		
IV.	Résultats et discussion		
1.	Effet du silençage de <i>MPV17</i> sur le nombre de copies d'ADN mitochondrial		
2	Effet du silencage de MPV17 sur des acteurs traductionnels	29	
	2. 1. La protéine Mnk1		
	2. 2. La protéine Pdcd4		
3.	Effet du silencage de MPV17 sur ATF4 et les gènes-cibles d'ATF4		
	3.1. Expression d'ATF4 et niveau protéique		
	3.2. Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes participant à l'ISR		
 3.2. Effet de la répr 3.3. Effet de la répr 3.4. Effet de la répr 	3.3. Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides		
	3.4. Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés		
	3.5. Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqué dans le transport d'acides aminés		
v.	Conclusion et perspectives		
1.	Impact du silençage de <i>MPV17</i> sur le nombre de copies d'ADN mitochondrial		
2.	Impact du silençage de MPV17 sur les acteurs traductionnels		
3.	Impact du silençage de MPV17 sur ATF4 et ses gènes-cibles		

Introduction



Figure 1: Représentation schématique des voies métaboliques qui fournissent les déoxynucléosides triphosphate (dNTP) pour la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'apport de dNTP pour la réplication de l'ADNmt dépend soit, de la voie de sauvetage propre à la mitochondrie soit, de l'import de déoxyribonucléosides phosphates provenant du cytosol qui sont synthétisés de manière de novo ou recyclé via les voies de recyclage cytosoliques. La voie de recyclage mitochondriale est composée de la Thymidine kinase 2 (TK2) et la déoxyguanosine kinase (dGK). La TK2 permet de synthétiser de la déoxythymidine monophosphate (dTMP) et déoxycytosine monophosphate (dCMP) à partir de thymidine et cytidine respectivement. La dGK permet de synthétiser du déoxyguanosine monophosphate (dGMP) et du déoxyguanosine adénosine monophosphate (dAMP) à partir de déoxyadénosine (dAdo) et déoxyguanosine (dGuo). Ensuite, les dNMP sont convertis en dNTP grâce aux réactions successives de la nucléoside monophosphate kinase (NMPK) et de la nucléoside diphosphate kinase (NDPK) et serviront lors de la réplication de l'ADN mitochondrial. La mitochondrie peut importer des bases puriques et pyrimidiques provenant de la voie de sauvetage cytosolique : la déoxycytidine (dCtd), déoxyadénosine (dAdo), la déoxyguanosine (dGuo) et la déoxythymidine (dThd) peuvent être transportés via l'equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1). La dCtd, dAdo et dGuo peuvent être recyclées par la déoxycytidine kinase (dCK) en dCMP, dAMP et dGMP. La dThd pourra être recyclé par la Thymidine kinase 1. Les dNMP pourront être convertis en dNDP et dNTP grâce aux NMPK et NDPK respectivement et pourront être importées dans la mitochondrie. Enfin, la mitochondrie peut importer des déoxyribonucléosides phosphates provenant de la voie de synthèse de novo cytosolique. La synthèse de déoxyribonucléoside diphosphate à partir de ribonucléoside diphosphate est catalysée par la ribonucléotide réductase (RNR). La synthèse de dTMP provient de deux sources : soit le dCMP ou l'uridine diphosphate (UDP). Le dCMP est converti en dUMP grâce à la dCMP déaminase. Par après, le dUMP peut être converti en dTMP grâce à la Thymidilate synthétase (TS). Soit l'UDP est converti en dUDP grâce à la RNR et le dUDP sera converti en dUMP grâce à la NMPK (Gonzalez-Vioque, Torres-Torronteras, Andreu, & Marti, 2011).



Figure 2: Représentation schématique des voies *de novo* et de recyclage des purines et pyrimidines (A) Voie *de novo* et de recyclage des purines. Elles peuvent être importées dans la mitochondrie. La sérine et synthétisée à partir de 3-P grâce à des enzymes tels que PHGDH, PSAT et PSPH. La sérine sert dans la voie du tétrahydrofolate mitochondrial ou cytosolique grâce à des enzymes telles que SHMT2, SHMT1, MTHFD2, MTHFD1L et MTHFD1. Toutes ces enzymes ont pour but de synthétiser du 10-formyl –THF qui sera utilisé lors de la synthèse *de novo* des purines. La synthèse *de novo* permet de synthétiser de l'IMP. Pour la voie de recyclage des purines, l'AMP est dégradé et donne finalement de l'hypoxanthine qui sera converti en IMP par l'HGPRT. L'adénine provenant de la nourriture et/ou de la dégradation de l'ARN et ADN est convertie en AMP par l'APRT. La guanine est convertie en GMP par la HGPRT. (B) Voie de novo et de recyclage des pyrimidines. Elles peuvent être importées dans la mitochondrie. L'UMP est synthétisé grâce à un processus multi-étapes. L'UMP est convertie en UDP et UTP par l'UMPK et la NDPK respectivement. L'UTP est converti en CTP par la CS. La synthèse de dTTP se fait à partir de CDP ou UDP. La voie de recyclage des pyrimidines permet de synthétiser des déoxynucléosides monophosphate qui sont convertis en déoxynucléosides diphosphate et déoxynucléosides triphosphate.

<u>Abréviations</u>: AD, adénosine déaminase; ADSS, adénylosuccinate synthétase; ADSL, adénylosuccinate lyase; AK, adénylate kinase; APRT, Adénine phosphoribosyltransférase; CMPK, CMP kinase; dCMPK, dCMP kinase; CS; Cytidylate synthétase; DK, déoxycytidine kinase; GMPS, guanosine monophosphate synthétase; HGPRT, hypoxanthine-guanine phosphorybosyltransférase; IMPDH, inosine monophosphate déshydrogénase; NAD, nicotinamide adénine dinucleotide; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; NC, Nucléosidase cytosolique; NMPK, Nucléoside monophosphate kinase; NDPK, nucléoside diphosphate kinase; 3PG, 3Phosphoglycérate ;3POHPyr, 3-Phosphohydroxypyruvate; PHGDH, phosphoglycérate déshydrogénase; PNP, purine nucléoside phosphorylase; PSAT1, Phosphosérine aminotransférase 1; PSer, Phosphosérine ; PSPH, Phosphosérine phosphatase; RNR, ribonucléotide réductase; SHMT1, sérine hydroxyméthyl transférase 1; SHMT2, sérine hydroxyméthyl transférase 2; UMPK, uridylate monophosphate kinase; fMet, formylméthionine; dTMP, deoxythymidine monophosphate; XMP, Xanthosine monophosphate.

I. Introduction

1. Les syndromes de déplétion d'ADN mitochondrial

Les syndromes de déplétion d'ADN mitochondrial (nommés mitochondrial DNA depletion syndrome, MDDS) appartiennent au groupe des maladies mitochondriales. Les MDDS sont des maladies récessives autosomales et sont groupées en quatre catégories qui dépendent des organes affectés: MDDS hépatocérébral, encéphalomyopathique, myopathique et neurogastrointestinale (Nogueira et al., 2014). Parmi les manifestations cliniques très variées, les plus communes sont l'hypoglycémie, la haute concentration plasmatique en lactate, une dysfonction précoce et progressive du foie et des anomalies neurologiques (Fellman & Kotarsky, 2011; Garone et al., 2012; Rotig & Poulton, 2009; Uusimaa et al., 2014). Les MDDS sont dus à des mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans le maintien du génome mitochondrial et/ou la réplication de celui-ci. Parmi ces gènes, citons ceux qui codent pour la polymérase y spécifique de la mitochondrie (Poly), l'hélicase mitochondriale Twinkle (aussi nommée C100RF2) ou le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) (Viscomi et al., 2009). Lorsque certaines mutations affectent ces gènes, on observe des délétions, déplétions ou des mutations ponctuelles au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Copeland, 2012; El-Hattab & Scaglia, 2013; Garone et al., 2012). De plus, certaines mutations dans des gènes qui encodent des protéines participant à la biosynthèse ou au recyclage des nucléotides peuvent aussi mener aux MDDS (Dalla Rosa et al., 2016; El-Hattab & Scaglia, 2013; Garone et al., 2012). C'est le cas par exemple pour le gène codant pour la déoxyguanosine kinase (DGUOK)

La DGUOK est une enzyme localisée dans la mitochondrie qui catalyse la synthèse de déoxyguanosine monophosphate (dGMP) et déoxyadénosine monophosphate (dAMP) à partir de déoxyguanine et déoxyadénine respectivement (Mandel et al., 2001). Le rôle de la DGUOK dans le métabolisme des nucléotides de la mitochondrie est illustré par la **figure 1** (ainsi que différentes voies qui fournissent des nucléotides à la mitochondrie illustré par la **figure 2**). La DGUOK est exprimée de manière ubiquitaire mais son abondance est particulièrement élevée dans le cerveau, le foie, les muscles et les tissus lymphoïdes et il a été démontré que la déficience en DGUOK déclenche un MDDS de type hépatocérébral (Mandel et al., 2001; Rotig & Poulton, 2009). Le fait que le cerveau et le foie soient touchés en cas de déficience en DGUOK s'explique probablement par le fait que ces deux organes sont plus dépendants du recyclage des nucléotides dû au fait qu'il y a peu de synthèse *de novo* de nucléotides (Mandel et al., 2001).

Récemment, l'ajout de certains dNTPs au niveau de culture de cellules mimant la forme hépatocérébrale (mutation de DGUOK) ou neurogastrointestinale (mutation de la thymidine phosphorylase : TP) a permis d'observer une replétion d'ADNmt dans ces cellules (Camara et al., 2014).

En termes de thérapie, les personnes atteintes de MDDS peuvent prendre des cofacteurs, vitamines et du glucose afin de soutenir le métabolisme (Lollgen & Weiher, 2015).

2. La protéine Mpv17

Récemment, la découverte de la perte de fonction d'une protéine mitochondriale nommée Mpv17 a été associée aux MDDS (Spinazzola et al., 2006).

Mpv17 est encodée par un gène nucléaire localisé au niveau du chromosome 2p23-21 (Karasawa et al., 1993) et composé de huit exons (El-Hattab et al., 2010; Uusimaa et al., 2014). *MPV17* est un gène transcrit aussi bien durant l'embryogenèse qu'au stade adulte de manière ubiquiste, mais son expression est plus élevée dans certains organes tels que le cerveau ou le cœur. La protéine encodée par ce gène compte 176 résidus d'acides aminés (Antonenkov et al., 2015; Weiher et al., 1990). La fonction de Mpv17 reste obscure, bien que l'étude de ses orthologues chez la souris, la levure et le poisson zèbre, que nous allons décrire dans les paragraphes suivants, nous apportent quelques informations quant à son rôle au sein de la cellule.

2.1. Etat de l'art concernant les orthologues de MPV17

2.1.1. MPV17 murin

Le gène MPV17 a été découvert chez la souris lors d'un screening réalisé par insertion rétrovirale aléatoire au stade embryonnaire (stade 4-16 cellules) (Karasawa et al., 1993). Les souris knock-out pour MPV17 possèdent non seulement une perte sensorielle des fonctions auditives à cause d'une dégénérescence cochléaire due à une perte des cellules du *stria vascularis* (Meyer zum Gottesberge et al., 2012), mais aussi un syndrome néphrotique (Viscomi et al., 2009). En effet, les souris $MPV17^{-/-}$ meurent de dysfonction rénale entre deux et neuf mois (Weiher et al., 1990). Ce syndrome se manifeste par une protéinurie, une hypoalbuminie plasmatique et une hyperlipidémie plasmatique ce qui est caractéristique d'une dysfonction rénale (Meyer zum Gottesberge et al., 2012; Weiher et al., 1990). Afin de comprendre le phénotype observé, Zwacka et ses collègues ont voulu caractériser Mpv17. Par une approche bioinformatique, ils ont montré que la protéine Mpv17 a une séquence en acides aminés très proche de la protéine peroxisomale pxpm2 (26% d'identité) qui est impliquée dans l'homéostasie rédox. De plus, ces auteurs ont observé une diminution des reactive oxygen species (ROS) dans les fibroblastes murins $MPV17^{-/-}$ suggérant que Mpv17 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie rédox chez les souris.

Ensuite, l'équipe de Spinazzola a pu mettre en évidence que cette protéine serait aussi impliquée dans le vieillissement. En effet, les souris $MPV17^{-/-}$ présentent des caractéristiques du vieillissement tels qu'un pelage grisonnant vers 5-6 mois, une diminution de la masse corporelle, une réduction de l'épaisseur de la peau (de l'épiderme et diminution de la graisse sous-cutanée), ainsi qu'une lordokyphose (déformation de la colonne vertébrale) (Viscomi et al., 2009). Mpv17 aurait donc un autre rôle dans la sénescence cellulaire.

Spinazzola et son équipe ont pu démontrer que les souris $MPV17^{-1}$ présentaient une déplétion d'ADNmt au niveau des reins (60% d'ADNmt restant), du cerveau (60% d'ADNmt restant), des muscles (20% d'ADNmt restant) et du foie (4% d'ADNmt restant) (Spinazzola et al., 2006).

Cependant, l'équipe de Dalla Rosa n'a pas pu montrer de déplétion d'ADNmt significative, malgré une tendance à la baisse, au niveau du cerveau (90% d'ADNmt restant) et des reins (75% d'ADNmt restant), mais seulement au niveau du foie (moins de 10% d'ADNmt restant) chez des souris $MPV17^{-1}$ (Dalla Rosa et al., 2016).

Dans tous les cas, la déplétion d'ADNmt au niveau du foie est observée et pourrait signifier que Mpv17 serait important pour le maintien de l'ADNmt. Bien que les souris présentent une sévère déplétion d'ADNmt au sein des hépatocytes, liée à une réduction de certains dNTP (dTTP et dGTP) au sein des mitochondries (Dalla Rosa et al., 2016), aucune manifestation clinique de MDDS telle que la dysfonction hépatique ou l'hypoglycémie n'a été observée en condition basale (Spinazzola et al., 2009; Viscomi et al., 2009). Cependant, lorsque les souris $MPV17^{-1}$ subissent un régime cétogénique, la dysfonction du foie a pu être observée (Bottani et al., 2014). Cela signifie donc que la perte de fonction de Mpv17 n'est délétère chez la souris que lorsqu'une activité métabolique hépatique intense est requise.

De plus, on observe une réduction de l'abondance protéique de certaines sous-unités des complexes mitochondriaux impliquées dans les phosphorylations oxydatives (OXPHOS) telles que les sous-unités 1 et 4 du cytochrome c oxydase (Cox1, Cox4 du complexe IV et Ndufb8 du complexe I) ainsi que l'apparition de sous-complexes de l'ATP synthase au niveau du foie (Dalla Rosa et al., 2016). Ces données sont corrélées avec une diminution de l'activité des complexes I et IV dans les foies de souris *MPV17^{-/-}*(Spinazzola et al., 2006). De plus, il a aussi été démontré que les mitochondries des hépatocytes présentaient des anomalies morphologiques avec des crêtes mitochondries (Viscomi et al., 2009). Mpv17 pourrait donc avoir un rôle dans la morphogénèse des crêtes mitochondriales, mais aussi dans le maintien de l'ADNmt dont les conséquences sont uniquement observables lors d'un stress chez les souris.

Finalement, il a été démontré que Mpv17 faisait partie d'un complexe protéique d'un poids moléculaire de plus de 600 kDa au sein des mitochondries des hépatocytes de souris WT (Bottani et al., 2014). Afin de caractériser ses partenaires protéiques, Bottani et son équipe ont essayé de fusionner un tag tel que l'hémagglutinine (HA) à la protéine Mpv17. Cependant, le tag interférait avec la localisation de la protéine car elle ne pouvait plus s'insérer au sein de la mitochondrie et donc former le complexe (Bottani et al., 2014). Les techniques qui requièrent un tag (pull down assay ou TAP-tag) pour identifier les partenaires protéiques de Mpv17 sont donc à proscrire. De plus, il est impossible de réaliser une immunoprécipitation de la protéine Mpv17 endogène car elle semble être enfouie dans ce complexe protéique. En effet, il n'est pas possible de détecter Mpv17 lors d'un Western Blot réalisé sur la première dimension d'un gel d'électrophorèse Blue-Native, permettant de séparer les complexes protéiques membranaires sans les dénaturer (Wittig et al., 2006).

2.1.2. SYM1, l'orthologue de MPV17 chez la levure Saccharomyces cerevisiae

L'orthologue du gène MPV17 chez la levure Saccharomyces cerevisiae est SYM1. Ce gène a été découvert lors d'une étude visant à caractériser les gènes induits lors d'un stress thermique et sur un milieu non-fermentable. En effet, lors de la culture des levures WT ou sym1 Δ dans l'éthanol 2% à 37°C, seules les cellules WT pouvaient croître. Cependant, les



<u>Figure 3:</u>Modèle de la protéine mitochondriale humaine Mpv17. Mpv17 est une protéine appartenant à la membrane mitochondriale interne et possédant quatre domaines transmembranaires (TM) prédits. Le TM1 s'étend de l'acide aminé 18-38. Le TM2 de 53-73, le TM3 de 94-114 et le TM4 de 131-151. Différentes mutations sont représentées dont la plus courante est la mutation R50Q. Il existerait potentiellement un site de phosphorylation par la Protein Kinase C (PKC) situé à la position 80 (El-Hattab et al., 2010). Le côté N-terminale et C-terminale sont orientés du côté de l'espace intermembranaire (Reinhold et al.,2012).

cellules $sym1\Delta$ pouvaient continuer de croître dans des conditions permissives sur ce même milieu à 30°C.

Par Northern Blot, il a été démontré que l'ARNm de *MPV17* était rapidement et fortement induit déjà après 15 minutes lors d'un stress thermique et/ou lors de la métabolisation d'un substrat exigeant les OXPHOS. Sym1 est une protéine possédant une séquence en acides aminés très homologue à Mpv17 (48% similarité, 32% identité). De plus, lors de l'étude de son hydropathie, il a été démontré que son profil était surimposable à celui de Mpv17 avec 4 domaines transmembranaires prédits (Trott & Morano, 2004) (**Figure 3**).

La localisation subcellulaire de Sym1 est mitochondriale, comme montré par immunofluorescence et confirmé grâce à des fractionnements subcellulaires (Trott & Morano, 2004). De plus, le gène *MPV17* humain complémente la souche mutante *sym1* Δ en permettant de restaurer la survie des levures mises en culture en présence d'éthanol. Il y a donc eu une conservation de la fonction de cette protéine durant l'évolution (Trott & Morano, 2004).

On peut se demander pourquoi les cellules $sym1\Delta$ ne peuvent pas croître sur un milieu non-fermentable comme l'éthanol qui demande une respiration cellulaire afin de le métaboliser. Les levures sym1 Δ présentent une proportion élevée de colonies « petites », un adjectif utilisé pour décrire des levures dépourvues d'ADNmt (Mounolou et al., 1966), ce qui suggère une déficience au niveau des OXPHOS. De plus, l'analyse par microscopie électronique à transmission (TEM) des levures sym1 Δ a révélé des crêtes mitochondriales profondément altérées, ainsi que la présence des corps denses aux électrons au sein de ces organites (Dallabona et al., 2010). Cette observation corrobore la probable déficience en OXPHOS étant donné que l'activité OXPHOS dépend grandement de la formation des crêtes mitochondriales (Cogliati et al., 2016). Cela suggère donc que cette protéine pourrait participer à la morphogénèse des crêtes mitochondriales, ainsi que dans le maintien de l'ADNmt. Ceci est compatible avec la localisation de MPV17 dans la membrane mitochondriale interne (MMI) qui est associée au nucléoïde contenant l'ADNmt. Un autre argument permettant de soutenir le fait qu'il existe une déficience en OXPHOS est que l'analyse du promoteur de SYMI, a révélé la présence de sites de liaison pour les facteurs de transcription Rtg1/Rtg3 qui activent la biogenèse mitochondriale dans le cadre de la communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau (Liu & Butow, 2006). Enfin, les auteurs ont identifié plusieurs substrats permettant de restaurer la prolifération des levures sym 1Δ . Il s'agit du glutamate, de l'aspartate, de la glutamine ou de l'asparagine. En effet, le catabolisme de ces quatre acides aminés permet de générer des intermédiaires du TCA. On peut penser que les levures sym1 Δ pourraient manquer de certains intermédiaires du TCA (Dallabona et al., 2010).

Les résultats issus d'expériences de complémentation du phénotype mutant $sym1\Delta$ renforcent l'hypothèse que Sym1 interviendrait dans l'homéostasie des intermédiaires du cycle de Krebs. En effet, le screening d'une librairie d'ADNc a permis d'identifier deux gènes permettant de complémenter les levures $sym1\Delta$. Premièrement le gène YMC1, codant pour un transporteur qui permettrait le transport coordonné d'intermédiaires du cycle TCA entre le peroxysome et la mitochondrie. En plus de corriger le phénotype déficient des OXPHOS, la complémentation par YMC1 permet de remédier à l'instabilité mitochondriale comme l'indique une diminution du nombre de colonies *petites* (Dallabona et al., 2010).

Un simple mutant *YMC1* ne présente pas de défaut de croissance. Cependant, lorsque l'on génère un double mutant *ymc1/sym1*, on observe encore plus de formation de *petites* colonies. Cela suggère que les protéines Sym1 et Ymc1 sont redondantes et jouent un rôle identique au sein de la cellule. De plus, Ymc1 semble important pour l'intégrité de l'ADNmt et pour la croissance en aérobiose lors de la perte de Sym1 (Dallabona et al., 2010).

Un second gène complémente *SYM1* en permettant une restauration partielle de la croissance des levures mutantes *sym1* Δ : il s'agit d'*ODC1*, un transporteur d' α -cétoadipate, α -cétoglutarate et d'autres intermédiaires du cycle de Krebs. Cela suggère donc que l'apport de certains intermédiaires du cycle de Krebs permet de compenser la perte de la protéine Sym1. Sym1 pourrait donc jouer un rôle dans le transport de certaines molécules permettant de réaliser des réactions anaplérotiques. De plus, on observe aussi une réduction de l'abondance protéique de succinate déshydrogenase (SDH) et de l'assemblage du complexe II, ainsi qu'une diminution de l'activité du complexe II (réduction de 60%), permettant de catalyser la réaction d'oxydation du succinate en fumarate. Enfin, le marquage à l'iode a aussi démontré une nette diminution en contenu de glycogène dans les cellules *sym1* Δ . Cela est probablement dû à un manque d'intermédiaires du cycle TCA.

Tout comme la protéine murine Mpv17 (Bottani et al., 2014), Sym1 appartient à un complexe de plus de 600kDa comme montré par électrophorèse bidimensionnelle «Blue Native» (BNE : Blue Native Electrophoresis) réalisée sur des souches de levures sym1 Δ exprimant une construction génétique HA-Sym1. Cependant, cette protéine n'est pas détectable par Western Blot réalisé sur la première dimension du BNE (conditions natives), ce qui suggère que Sym1 est enfoui dans un complexe protéique. Des complexes de plus petites tailles de 120 et 220 kDa contenant Sym1 ont également été mis en évidence. Ces complexes sont probablement des intermédiaires de l'assemblage du complexe de 600kDa (Reinhold et al., 2012).

En résumé, l'ensemble de ces données suggère que les mutants Sym1 présentent une activité OXPHOS altérée à cause d'une réduction de réactions anaplérotiques et une capacité limitée de générer des intermédiaires du cycle de Krebs (pour une revue, voir (Lollgen & Weiher, 2015).

2.1.3. MPV17, l'orthologue de MPV17 chez Danio rerio

Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, la délétion de l'orthologue de *MPV17* nommé *MPV17* provoque une perte de pigmentation des mélanophores (cellules responsables de la coloration foncée) et des iridophores (cellules qui reflètent les rayons du soleil et qui donnent une couleur argentée). Ces derniers sont particulièrement intéressants car à l'intérieur de ces cellules se trouve un organite appelé l'iridosome. Celui-ci accumule des molécules comme la guanine, la guanosine et le dGTP qui forment des cristaux (Krauss et al., 2013). De plus, la protéine Mpv17 a été localisée au niveau des mitochondries par immunofluorescence et lorsque le gène *MPV17* est muté, une réduction de l'iridosome et de l'activité OXPHOS est observée, probablement suite à un plus faible approvisionnement en nucléotides dans la mitochondrie. C'est pour cela que certains ont émis l'hypothèse que la protéine Mpv17 est un pore permettant de fournir des nucléotides à la mitochondrie (Lollgen & Weiher, 2015). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'on observe aussi une perte de la coloration argentée chez les poissons zèbres mutants pour les enzymes Paics (complexe enzymatique constitué des enzymes

Patient	Gene	Mutation
P1	MPV17	Mutation homozygote p.(Gln93Pro)
P2	MPV17	Mutation homozygote p.(Gln93Pro)
P3	MPV17	Composite hétérozygote: p.(Lys88Met) et p.(Met89Leu) sur un allele; p.(Asp143*) sur l'autre
P4	MPV17	Mutation homozygote p.(Asp95fs)
P5	MPV17	Mutation homozygote p.(Arg41Trp)

Tableau 1: Liste des patients et des mutations du gène MPV17 analysé dans l'étude de Dalla-Rosa et al., 2016).

phosphoribosylaminoimidazole carboxylase et phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthétase) et Gart (complexe enzymatique composé des enzymes phosphoribosylglycinamide formyltransférase, phosphoribosylglycinamide synthétase et phosphoribosylaminoimidazole synthétase) qui sont deux complexes enzymatiques participant à la biosynthèse des purines (Krauss et al., 2013).

2. 2. Etat de l'art concernant la fonction de Mpv17 chez l'homme

Chez l'homme le plus souvent, les patients déficients pour Mpv17 contractent la forme hépatocérébrale de MDDS bien que certains puissent développer des neuropathies ou des myopathies (Blakely et al., 2012; Luo et al., 2013; Suomalainen & Isohanni, 2010). La caractéristique la plus frappante à propos des MDDS associées à des mutations dans le gène *MPV17* est une diminution tissu-spécifique d'ADNmt au niveau du foie, du cerveau et dans une moindre mesure au niveau des muscles (Suomalainen & Isohanni, 2010). D'ailleurs, des données provenant de patients Mpv17-déficients montrent que la plupart présentent une réduction de l'activité des complexes I et III au niveau des hépatocytes (Bijarnia-Mahay et al., 2014; El-Hattab et al., 2010). La mutation de Mpv17 donne d'ailleurs des manifestations cliniques assez proches de la mutation de la DGUOK.

Tout comme la protéine Sym1 ou la protéine Mpv17 de *Danio rerio*, la protéine Mpv17 humaine est prédite comme ayant quatre domaines transmembranaires (Antonenkov et al., 2015) (voir **figure 3**). Elle a été décrite comme ancrée dans la membrane mitochondriale interne (Spinazzola et al., 2006) bien que sa localisation mitochondriale ait été récemment remise en question suite à une faible spécificité des anticorps. En effet, la protéine humaine Mpv17 serait localisée dans les lysosomes, les endosomes précoces et les peroxysomes. Cependant, ces données sont à prendre avec précaution puisqu'elles se basent sur des expériences consistant à surexprimer une version de Mpv17 dotée d'un tag GST sur la partie N-terminale.

Il existe deux hypothèses concernant la fonction de Mpv17. Tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment (point 2.1.2.), Mpv17 pourrait être un transporteur d'intermédiaires du cycle TCA comme l' α -cétoglutarate. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la protéine humaine Mpv17 complémente la souche sym1 Δ . De plus, il a été montré que les levures *sym1* Δ avaient une capacité moindre de stockage du glycogène dû probablement à une moindre synthèse de certains intermédiaires permettant de générer du glycogène via la néoglucogénèse. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi les patients mutés pour Mpv17 présentent une hypoglycémie sévère et un manque de glycogène au niveau du foie car tout comme les levures sym1 Δ , la voie de la néoglucogénèse serait altérée (Parini et al., 2009).

Ensuite, comme vu dans les points 2.1.2 et 2.1.3, les orthologues de la protéine humaine Mpv17 pourraient être impliquées dans l'import de nucléotides et/ou de précurseurs de nucléotides. Cette hypothèse est renforcée par une publication récente de l'équipe de Spinazzola sur des fibroblastes humains (Dalla Rosa et al., 2016).

Dans des cellules en culture, l'abondance de l'ADNmt est réduite au sein de cinq lignées de fibroblastes quiescents provenant de cinq patients déficients pour Mpv17 (voir **Tableau 1** pour les différentes mutations) alors que l'on n'observe pas cela lorsque ces cellules sont en phase prolifératives. Le fait que la réduction d'ADNmt soit propre aux cellules



Figure 4: Représentation schématique de la voie de synthèse des nucléotides. (A) Les cellules prolifératives utilisent beaucoup plus la voie *de novo* de synthèse des nucléotides. La mitochondrie importe donc les nucléotides venant majoritairement de cette voie et utilise peu le mitochondrial salvage pathway (MSP). La synthèse de déoxynucléosides diphosphate est réalisée grâce à la ribonucléotide réductase (RNR) et des ribonucléosides diphosphate (rNDP). (B) Les cellules quiescentes reposent beaucoup plus sur la voie de recyclage des nucléotides. Cependant, bien que les cellules quiescentes ne répliquent pas leur ADN nucléaire, leur ADNmt est toujours répliqué. Pour ce faire, il existe différents mécanismes afin de maintenir leur ADNmt : premièrement, la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase (RNR) qui est exprimée au sein de cellules prolifératives est remplacée par la sous-unité p53R2 dans les cellules quiescentes et est uprégulée. Elle permet ainsi une synthèse constitutive de nucléotides au sein de ces cellules et indépendamment du cycle cellulaire. Deuxièmement, la cellule quiescente utilise à plus haut niveau le mitochondrial salvage pathway (MSP) car on observe une uprégulation des protéines associées au MSP comme la thymidine kinase 2 (TK2) ou DGUOK. Finalement, on observe une augmentation de l'abondance de certains transporteurs de nucléotides comme equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1).

quiescentes pourrait expliquer pourquoi les patients MPV17-déficients présentent une déplétion d'ADNmt de manière tissu-spécifique et plus particulièrement dans le foie, les muscles et le cerveau (Dalla Rosa et al., 2016). De plus, la réduction en ADNmt dans les fibroblastes quiescents MPV17-déficients était associée à une diminution de certains dNTP (dTTP, dGTP et dCTP) par comparaison aux fibroblastes prolifératifs. De plus, il a été montré que Mpv17 est surexprimé dans les fibroblastes quiescents en comparaison avec des fibroblastes prolifératifs chez des patients sains. Par conséquent, les auteurs ont émis l'hypothèse que Mpv17 pourrait être un transporteur mitochondrial qui importent les déoxyribonucléotides et/ou les précurseurs de nucléotides (Dalla Rosa et al., 2016; Lollgen & Weiher, 2015). Enfin, une replétion d'ADNmt a pu être mis en évidence grâce à l'addition simultanée de trois déoxynucléosides (déoxyadénosine, déoxyguanosine et déoxycytosine) dans des cellules quiescentes provenant de patients Mpv17-déficients (Dalla Rosa et al., 2016). Cela conforte l'hypothèse concernant Mpv17 car cette donnée établit un lien entre la déficience de Mpv17 et l'apport de déoxynucléosides au sein de la mitochondrie.

Pour comprendre ces résultats, il est nécessaire de souligner la distinction entre le métabolisme nucléotidique des cellules prolifératives et des cellules quiescentes : les cellules prolifératives reposent essentiellement sur la voie de synthèse de novo des nucléotides afin de produire de grandes quantité de nucléotides alors que les cellules quiescentes reposent essentiellement sur les voies de recyclage des nucléotides. Cependant, bien que les cellules quiescentes ne répliquent pas leur ADN nucléaire, leur ADNmt est toujours répliqué. Pour ce faire, il existe différents mécanismes afin de maintenir leur ADNmt : premièrement, la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase (RNR) qui est exprimée au sein de cellules prolifératives est remplacée par la sous-unité p53R2 dans les cellules quiescentes et est uprégulée (Pontarin et al., 2012; Pontarin et al., 2007). Elle permet ainsi une synthèse constitutive de nucléotides au sein du cytosol de ces cellules et indépendamment du cycle cellulaire contrairement à la sous-unité R2. Deuxièmement, la cellule quiescente utilise à plus haut niveau le mitochondrial salvage pathway (MSP). En effet, on observe une uprégulation des protéines associées au MSP comme la thymidine kinase 2 (TK2) ou la DGUOK (Dalla Rosa et al., 2016). Finalement, on observe une augmentation de l'abondance de certains transporteurs de nucléotides comme equilibrative nucleoside transpoter 1 (ENT1). Cela peut expliquer comment la mitochondrie maintient son ADNmt et sa duplication (Figure 4). Toutes ces données suggèrent que MPV17 pourrait être un pore permettant aux cellules quiescentes d'alimenter le MSP qui est une voie de recyclage des nucléotides au sein de la mitochondrie (Dalla Rosa et al., 2016).

Au niveau de sa localisation cellulaire, Spinazzola et son équipe ont pu montrer via la transfection d'un vecteur d'expression contenant le gène de la protéine humaine MPV17 liées avec l'HA au côté C-terminal que la protéine MPV17 se localisait au niveau des mitochondries de cellules HeLa (adénocarcinome utérin) et COS7 (fibroblaste rénal de singe).

Enfin, il existe des solutions thérapeutiques pour les patients déficients pour Mpv17. Une transplantation hépatique peut grandement améliorer la qualité de vie des patients (El-Hattab & Scaglia, 2013; Parini et al., 2009). Cependant, ces transplantations hépatiques sont inefficaces pour soulager les anomalies neurologiques dont peuvent souffrir les patients déficients en cette protéine (Blakely et al., 2012). D'autre part, éviter des moments de faim et en se nourrissant toutes les trois heures permet d'arrêter la progression de la dysfonction hépatique (Parini et al., 2009).



<u>Figure 5:</u> Niveau d'expression de *MPV17* dans des biopsies de plusieurs tissus pairés sains (N) et tumoraux (T). Analyse bioinformatique réalisée sur la plateforme The Cancer Genome Atlas (TGCA). Les résultats représentent la distribution des valeurs. Les tests statistiques utilisés sont un T-test pairés. Une unité de différence correspond à une différence de deux fois.



<u>Figure 6:</u> Effets du silençage de MPV17 sur la prolifération des cellules Hep3B. La prolifération des cellules non-transduites (Unt), des cellules transduites avec un shARN ne ciblant aucun ARN (shNT) ou des cellules transduites avec un shARN ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17) a été évaluée après 96 heures. La prolifération cellulaire a été évaluée par (A) Le test MTT qui est basé sur l'activité de la succinate déshydrogénase, (B) le temps de doublement et (C) le contenu de l'ADN avec les test CyQUANT. Les résultats représentent la moyenne de 5 réplicats indépendants \pm SEM. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport à shNT (données obtenues précédemment au laboratoire lors de la thèse de doctorat de A. Wanet).

3. Résultats antérieurs obtenus au laboratoire

Il a été récemment démontré, par une étude transcriptomique, qu'il y avait une surexpression de de l'ARNm de *MPV17* dans plusieurs cancers (**Figures 5**). On peut remarquer que le niveau d'expression de *MPV17* est plus élevé lorsque l'on compare le tissus du foie sain et les cancers du foie. De plus, nous avons pu observer une augmentation de l'abondance de Mpv17 dans des biopsies d'hépatocarcinomes. En outre, silencer *MPV17* par interférence ARN ralentissait la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines qui sont à savoir les A549 (adénocarcinome du poumon), les Huh7 (hépatome), les HepG2 et les Hep3B (hépatocarcinomes) (**Figure 6**). L'objectif de ce mémoire est de rechercher les mécanismes moléculaires par lesquels la diminution de la protéine Mpv17 permet de ralentir la prolifération des cellules cancéreuses principalement dans les cellules Hep3B (un autre chercheur du laboratoire se concentre sur les cellules Huh7). Pour atteindre ce but, nous avons suivi trois approches :

Premièrement, nous avons tout d'abord essayé d'identifier les partenaires protéiques de Mpv17 en utilisant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle Blue-Native. Malgré plusieurs tentatives, cette approche s'est révélée difficile d'un point de vue technique car nous n'avons pas pu localiser Mpv17 par Western Blot sur le gel de seconde dimension (voir présentation du mémoire première partie). Cet objectif ne sera donc pas décrit dans ce document et nous nous sommes concentrés sur d'autres pistes plus prometteuses.

Ensuite, afin de rechercher les acteurs moléculaires qui seraient impliqués dans la prolifération et potentiellement affectés par le silençage de *MPV17*, une analyse de reverse phase protein array (RPPA) a été réalisée sur les cellules Hep3B et A549 transduites avec un shARN diririgé contre l'ARNm de *MPV17* (shMPV17) ou avec un shARN ne ciblant rien dans la cellule (shNT). Cette technique a été réalisée au MD Anderson Cancer Center. Le RPPA permet d'analyser l'abondance relative de 297 protéines associées au cycle cellulaire (https://www.mdanderson.org/education-and-research/resources-for-professionals/scientific-resources/core-facilities-and-services/functional-proteomics-rppa-core/index.html).

Les résultats ont mis en lumière cinq protéines présentant une diminution significative d'abondance protéique dans les deux types cellulaires : C-X(9)-C Motif Containing 2 (Cmc2), ribosomal protein S6 kinase A1 (Rps6ka1), MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (Mnk1), programmed cell death (Pdcd4) et la glycogène synthase 1 (Gys1). Dans ce travail, nous nous concentrerons sur les protéines Mnk1 et Pdcd4 dans les cellules Hep3B. Ces deux acteurs seront présentés dans les paragraphes suivants.

Finalement, nous avons découvert que les cellules cancéreuses silencées pour *MPV17* possédaient une diminution de l'abondance protéique d'Activating Transcription Factor 4 (ATF4). ATF4 est un facteur de transcription clef qui sera également introduit dans les paragraphes suivants.



Figure 7: Structure des quatre isoformes de Mnk. Toutes les protéines Mnk possèdent un domaine de liaison à eIF4G ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (NLS) et un domaine kinase. Les isoformes a se distinguent des isoformes b par la présence d'un domaine supplémentaire de liaison aux protéines MAPK. Enfin, la protéine Mnk1a possède une séquence nucléaire d'export (NES) (Hou *et al.*, 2012).



Figure 8: Schéma illustrant l'activation des Mnks et la formation du preinitiation complex (PIC). Les Mnks peuvent être activées par la voie ERK (en réponse à une stimulation de mitogènes) et p38 MAPK (suite à un stress tel qu'une irradiation UV). Dans ces deux cas, les Mnks sont phophorylées (Thr 255 et Thr385) et se lient à eIF4G. Lorsqu'elles sont activées, elles phosphorylent leur substrat qui est eIF4E et eIF4G. Le complexe eIF4F est formé de eIF4A (hélicase à ARN), eIF4G (protéine scaffold) et eIF4E. eIF4F reconnait la structure particulière de la coiffe de l'ARNm et s'y lie. Ensuite, le cofacteur eIF4B est recruté et permettra d'augmenter l'activité hélicase d'eIF4A. Enfin, eIF4G recrute eIF3 et la petite sous-unité 40 S permettant de former le complexe d'inititation de la traduction (d'après Hou et al., 2012; Joshi et al., 2014, Diab et al., 2014).

4. Les acteurs de la traduction réprimés suite au silençage de MPV17

4.1. Les protéines Mnk

Tout d'abord, les protéines Mnks sont encodées par les gènes *MKNK1* et *MKNK2* (EC:2.7.11.1). Ce sont des sérine/thréonine kinases dont il existe quatre isoformes différentes qui sont Mnk1a, Mnk1b, Mnk2a et Mnk2b (Cargnello & Roux, 2011; Hou et al., 2012). Ces protéines sont issues d'un épissage alternatif et possèdent toutes un domaine de liaison à la protéine eukaryotic initiation factor 4 G (eIF4G), ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Cargnello & Roux, 2011; Hou et al., 2012). Les isoformes «a» se distinguent des autres par la présence d'un domaine supplémentaire de liaison aux protéines MAPK. Au niveau de leur répartition cellulaire, on retrouve préférentiellement Mnk1a au niveau du cytoplasme alors que les autres variants d'épissage se localisent préférentiellement au niveau du noyau étant donné qu'ils ne possèdent pas de séquence d'export nucléaire (NES) (Hou et al., 2012) (**Figure 7**).

Les protéines Mnks sont activées par la voie des mitogen activated protein kinase (MAPK) et plus particulièrement par les protéines p38^{MAPK} et extracellular regulated kinase (ERK) (Cargnello & Roux, 2011; Hou et al., 2012; Joshi & Platanias, 2012). Cependant il existe des différences entre Mnk1 et Mnk2 : Mnk1 est stimulée par phosphorylation sur les résidus Thr 255 et Thr 385 suite à de nombreux stimuli environnementaux comme par exemple des mitogènes, une irradiation aux UV, des facteurs de croissance ou encore des cytokines, tandis que Mnk2 possède, de manière intrinsèque, une plus grande activité basale et dépend beaucoup moins des stimuli précédemment cités (Landon et al., 2014; Roux & Blenis, 2004). Lorsqu'elles sont activées, les Mnks se lient à une protéine nommée eIF4G qui est déjà associée à la protéine eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) (Pyronnet et al., 1999). On sait que les Mnks peuvent phosphoryler eIF4G, mais l'on ne connait pas encore les conséquences fonctionnelles de cette modification post-traductionnelle (Joshi & Platanias, 2014). eIF4G est une protéine scaffold c'est-à-dire une protéine qui permet de «rapprocher» des partenaires protéiques appartenant à un même processus biologique. Dans ce cas-ci, eIF4G est associée à la protéine eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) qui est une hélicase à ARN permettant de «dérouler» les structures secondaires formées au niveau de l'ARNm qui interféreraient lors de la traduction par les ribosomes (Proud, 2015). eIF4G interagit également avec la protéine eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) et cela est particulièrement intéressant car un des substrats des Mnks est précisément cette protéine. Les Mnks peuvent phosphoryler eIF4E (Ser209), permettant la formation d'un complexe protéique composé d'eIF4A, eIF4G et eIF4E nommé eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F). Le rôle d'eIF4E est de reconnaitre les ARNm coiffés avec un motif de 7méthylguanosine au niveau de l'extrémité 5'non-traduite (untranslated region, UTR) des ARNm. eIF4G pourrait aussi recruter le complexe de préinitiation de la traduction composé, entre autre, de la protéine eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) qui est un facteur protéique et de la petite sous-unité du ribosome 40S. Toutes ces étapes aident donc à l'initiation de la traduction protéique en recrutant le complexe de préinitiation (PIC) (Figure 8).

Ensuite, lorsque la petite sous-unité 40S du ribosome détecte le codon START (AUG) au niveau de l'ARNm, il y a recrutement de la grande sous-unité 60S du ribosome. Ainsi, l'initiation et l'élongation de la traduction peuvent dès lors commencer (Diab et al., 2014).



<u>Figure 9:</u> Schéma illustrant la régulation d'eIF4E. Lorsque 4E-BP est hypophosphorylée, elle se lie à eIF4E. *A contrario*, lorsqu'il y a hyperphosphorylation de la 4E-BP à la suite de stimuli tels que les hormones, facteurs de croissance, mitogènes ou cytokines, on observe une libération d'eIF4E qui peut alors se lier avec eIF4G associ à eIF4A et former ainsi le complexe eIF4F (Gingras, 1999).

Etant donné que les Mnks peuvent phosphoryler eIF4E qui est une protéine impliquée dans la traduction protéique on peut se demander comment elle est régulée. En fait, eIF4E est régulée de trois manières : transcriptionnelle, par interaction avec les protéines eIF4E-Binding Protein (4E-BP) et par modification post-traductionnelle. On peut noter que ce facteur d'initiation est présent à une concentration très faible comparée aux autres facteurs impliqués dans la traduction.

Au niveau transcriptionnel, on remarque que les cellules surexprimant c-Myc (telles que les cellules cancéreuses) possèdent des niveaux d'expression d'eIF4E relativement élevé. En effet, au niveau du promoteur d'eIF4E on retrouve des sites de liaison pour c-Myc (Carroll & Borden, 2013; Proud, 2015; Pyronnet, 2000; Raught & Gingras, 1999). De plus, lors d'une stimulation par des œstrogènes d'une construction génétique composée de la fusion du gène *c-Myc* avec le gène encodant le récepteur aux œstrogènes, on observait une plus grande expression d'eIF4E (Rosenwald et al., 1993). C'est donc l'un des mécanismes qui confèrent un niveau de traduction très élevé aux cellules hyperprolifératives.

Au niveau des interactions protéiques, eIF4E est séquestré par des protéines que l'on nomme eIF4E-Binding Protein (4E-BP). Il existe trois isoformes de 4E-BP qui sont 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3. Il s'agit de répresseurs traductionnels (Gingras et al., 1998; Pyronnet et al., 1999; Raught & Gingras, 1999). Les fonctions précises et spécifiques à chacune des trois isoformes restent encore à être déterminées. Néanmoins, lorsque les 4E-BPs sont hypophophorylées, elles ont une grande affinité pour eIF4E et donc un effet inhibiteur sur la traduction peut être observé. Au contraire, quand ces protéines sont hyperphosphorylées, cela réduit leur affinité pour eIF4E et donc la «libération» de ce facteur de traduction peut être observé (Gingras et al., 1999). Notons que les complexes eIF4E-4EBP1 n'empêchent pas le recrutement de la coiffe de l'ARNm, mais interfèrent avec l'association d'eIF4E avec eIF4G (Gingras et al., 1999). Une des voies de signalisation permettant d'inactiver les 4E-BPs est la voie PI3K/AKT/mTOR. Lors d'un stress, en présence d'un mitogène ou d'une irradiation aux UV, l'activation des Mnks par les MAPK aura lieu et en parallèle, la Phosphatidylinositol-4,5bisphosphate 3-kinase (PI3K) sera aussi activée, ce qui aboutira à l'activation de la protéine mammalian target of rapamycine complex 1 (mTORC1), un acteur moléculaire impliqué dans beaucoup de processus dont la traduction protéique. En effet, mTORC1 pourra inactiver les 4E-BPs en les hyperphosphorylant (Figure 9) (Morita et al., 2013). Ainsi, les Mnks et eIF4E pourront s'associer à eIF4G et initier la traduction.

La phosphorylation d'eIF4E constitue un troisième niveau de régulation. Il est généralement admis qu'une phosphorylation de eIF4E sur le résidu sérine 209 provoque une augmentation de la traduction des ARNm cibles, mais le mécanisme sous-jacent est controversé : certaines études suggèrent que la phosphorylation d'eIF4E permet de réduire son affinité pour la coiffe afin de pouvoir participer à la traduction d'autres ARNm (Joshi & Platanias, 2014), alors que d'autres données montrent que cette protéine forme un complexe plus stable avec le complexe eIF4G lorsqu'elle est phosphorylée par les Mnks (Pyronnet, 2000) ce qui permet d'augmenter son affinité pour la coiffe de l'ARNm (Raught & Gingras, 1999). De plus, eIF4E est moins phosphorylée lors de la mitose, ce qui est cohérent avec le fait que le niveau de traduction pendant cette étape du cycle cellulaire est plus faible. Inversement, le niveau de

phosphorylation d'eIF4E est plus élevé lors d'étapes exigeant un grand niveau de traduction : typiquement les phases G1 et S (Gingras et al., 1999; Pyronnet, 2000). Une hypothèse suggère que la phosphorylation d'eIF4E favoriserait la traduction de certains ARNm qui sont spécifiques à certaines conditions (Diab et al., 2014; Joshi & Platanias, 2014) et en particulier les ARNm codant pour des protéines participant à la croissance cellulaire tels que c-Myc, la cycline D1 ou des protéines antiapoptotiques comme Bcl-2, Mcl-1 et d'autres survivines (Diab et al., 2014). Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été proposées pour expliquer comment une augmentation de la phosphorylation d'eIF4E augmente la traduction de certains ARNm. Tout d'abord, les ARNm ciblés par eIF4E dits «weak» c'est-à-dire faiblement traduits ont une structure particulière constituée d'une 5'UTR longue et riche en G/C ce qui est plus difficile à dérouler pour le complexe eIF4F (Gingras et al., 1999). De plus, ce facteur d'initiation aurait un rôle dans l'export de certains ARNm associés à une croissance cellulaire tels que les transcrits de la cycline B1, D1, E1, c-Myc et l'ornithine décarboxylase (ODC), mais aussi certains ARNm ayant des propriétés anti-apoptotiques comme Human MDM2 (HDM2) (Carroll & Borden, 2013; Culjkovic et al., 2006; Raught & Gingras, 1999; Siddiqui & Borden, 2012). Ces transcrits possèdent une région particulière au niveau du 3'UTR de leur ARNm que l'on nomme eIF4E sensitivity element (4E-SE). eIF4E se lie indirectement à ces séquences 4E-SE (Carroll & Borden, 2013) via une protéine nommée leucine-rich pentatricopeptide repeat protein (LRPPRC) (Topisirovic et al., 2009).

En délétant Mnk1/2 chez des souris, on observait un développement normal sans aucune anomalie morphologique ou reproductive (Joshi & Platanias, 2014; Landon et al., 2014) (Landon et al., 2014) suggérant que ces protéines ne sont pas indispensables pour la survie de l'organisme. De plus, on n'observait aucune phosphorylation d'eIF4E (Diab et al., 2014). Néanmoins, aucune modification de la synthèse protéique globale n'a pu être observée. Cela suggère que les protéines Mnks ne sont pas nécessaires dans des conditions basales (Joshi & Platanias, 2014). Finalement, une surexpression des protéines Mnks chez des fibroblastes immortalisés entraine un effet tumorigénique car elles permettent la transformation des fibroblastes immortalisés en permettant la phosphorylation d'eIF4E. *A contrario*, des fibroblastes embryonnaires de souris délétés pour les Mnk1 et Mnk2 montrent une résistance à la transformation médiée par K-RAS (Joshi & Platanias, 2014).

4.2. La protéine Pdcd4

Programmed cell death 4 (Pdcd4) est une protéine suppresseur de tumeurs dont il existe deux isoformes (Park & Jeong, 2016). La protéine possède 469 résidus d'acides aminés, un poids moléculaire de 64kDa et encodée par le chromosome 10q24 (Asangani et al., 2008; Lankat-Buttgereit & Goke, 2009; Singh et al., 2009). Le gène de *PDCD4* est exprimé de manière ubiquiste mais de manière plus importante au niveau du foie. Dans certains cancers comme l'hépatome, cette protéine se trouve être downrégulée (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009).

Pdcd4 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme car elle possède un NLS et une séquence d'export nucléaire (NES). Cette protéine est uprégulée lors de l'apoptose et se lie aux ARNm (Biyanee, Ohnheiser, et al., 2015; Singh et al., 2009). Concernant sa fonction, cette protéine est impliquée dans le contrôle de la traduction protéique car elle permet d'inhiber la traduction par deux mécanismes : Tout d'abord, Pdcd4 peut interagir avec eIF4A (Biyanee,



Figure 10: Schéma illustrant les deux mécanismes permettant d'inhiber spécifiquement la traduction de certains ARNm. (A) PDCD4 peut inhiber l'activité hélicase d'eIF4A. Un ARNm régulé de cette façon est p53 (B) PDCD4 peut entrainer la formation de structures secondaires dans la région codante de l'ARNm. Ces structures peuvent être stabilisées grâce à la PolyA Binding Protein (PABP). Cela permettra d'inhiber l'élongation des ribosomes. Deux ARNm régulés de cette manière sont c-myb ou A-myb (Biyanee et al., 2015).

Singh, et al., 2015; Singh et al., 2009), qui est une hélicase inclue dans le complexe eIF4F (voir **figure 8** et **figure 10A**). Ce mécanisme est donc dépendant d'eIF4A et on observe une inhibition qui est dose-dépendante (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009). Cependant, en mutant le site de liaison à eIF4A, on n'observe pas de diminution de la traduction de certains ARNm tels que c-myb ou A-myb. Il existe donc une autre façon d'inhiber la traduction qui est indépendante d'eIF4A. En effet, Pdcd4 peut se localiser dans la région codante de certains ARNm, au niveau de régions nommées Pdcd4 response region, et inhiber l'élongation protéique en bloquant les ribosomes car cette protéine provoquerait la formation de structures secondaires au sein de l'ARNm (Biyanee, Ohnheiser, et al., 2015). De plus, elle interagit avec la PolyA Binding Protein (PABP) qui permet de stabiliser ces structures. Ces structures formées suite à l'interaction avec Pdcd4 interférent donc avec le scanning des ribosomes (Biyanee, Singh, et al., 2015) et lors de l'élongation protéique (**Figure 10B**).

Certains ARNm régulés par le mécanisme dépendant d'eIF4A sont ATG5 ou p53 (Song et al., 2013; Wedeken et al., 2011). Pdcd4 inhibe non seulement la traduction de p53, suivant le mécanisme décrit à la **figure 10**, mais aussi son activité. En effet, l'acétylation du résidu lysine 382 de p53 dépendant de la CREB-binding protein (CBP) est inhibé par Pdcd4 par un mécanisme inconnu. Pdcd4 peut aussi se lier à la protéine Hipk2, ce qui inhibe sa liaison avec Daxx (une protéine scaffold). Cela permet de diminuer la phosphorylation de p53 (Ser 46) dépendante de Hipk2 (Kumar et al., 2013). Finalement, Pdcd4 inhibe aussi la transcription d'Hipk2 par un mécanisme encore inconnu (Ohnheiser et al., 2015). Grâce à tous ces mécanismes, Pdcd4 inhibe l'activité de facteur de transcription de p53.

Cependant certaines études montrent que le rôle de suppresseur de tumeur de Pdcd4 semble être dépendant du type cellulaire: dans des cellules neuroendocrines, une abondance protéique élevée de Pdcd4 permet d'induire p21, ce qui permet de diminuer la prolifération grâce à une réduction protéique de CDK4/6 et CDK2. Cela permet d'augmenter la liaison de la protéine rétinoblastome (Rb) au complexe E2F-DP ce qui réprime le promoteur de CDK1/cdc2. Au niveau de cellules HeLa et HCT116, le knock-down de Pdcd4 résulte en une expression des gènes cibles de p53 tels que p21. Cependant, dans d'autres cancers comme la leucémie myéloïdes aigüe, un niveau réduit de Pdcd4 n'altère pas l'expression de p21 (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009).

PDCD4 est régulée à quatre niveaux : épigénétique, transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel.

Au niveau épigénétique, les îlots CpG du promoteur de *PDCD4* peuvent être hyperméthylés par la DNA methyltransferase 1 (DNMT1) et par conséquent, peu ou pas de transcription de l'ARNm correspondant est observé (Wen et al., 2007). On observe d'ailleurs une uprégulation de la DNMT1 au niveau de la plupart des lignées d'hépatocarcinomes (Fan et al., 2009), corrélée à une faible expression de *PDCD4* et une prolifération élevée. De plus, le silençage de la DNMT1 permet d'obtenir une moindre méthylation du promoteur de *PDCD4* ce qui induit une expression accrue de l'ARNm de *PDCD4* (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009) et une moindre prolifération des lignées d'hépatocarcinomes (Fan et al., 2009).

Au niveau transcriptionnel, *PDCD4* est régulée positivement par c-Myb (Singh et al., 2011), un facteur de transcription impliqué dans plusieurs processus au sein de la cellule comme



Figure 11: Représentation schématique des membres de la famille des facteurs de transcription ATF/CREB. Les membres protéiques d'ATF/CREB peut être catégorisé en six sous-groupes selon leur similarité de séquence. Les zones rouges indiquent le domaine bZIP (Vlahopoulos et al., 2008)



Figure 12: Schéma illustrant l'Unfolded Protein Response. Il existe 3 senseurs membranaires du RE qui sont PKR-like ER kinase (PERK), Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) et Activating transcription factor (ATF6) dont le but est de restaurer l'homéostasie protéique (aussi nommée protéostase). Ces trois protéines sont liées à la protéine BiP (aussi nommée GRP78) une protéine chaperone résidant dans la lumière du RE qui maintient PERK, IRE1 et ATF6 sous forme inactive monomérique. Lors d'un stress du réticulum endoplasmique causée par une infection virale, on observe une plus grande proportion de protéines mal repliées qui se lieront davantage à BiP, ce qui permettra de la dissocier de ces trois senseurs. PERK et IRE1 s'homodimérisent et se transphosphorylent. Ensuite, PERK phosphoryle l'eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) et inhibe la synthèse protéique CAP-dépendante. PERK active aussi NRF2 qui permet l'expression de gènes antioxydants. Concernant IRE1, lorsqu'elle est activée, cette enzyme possède une activité d'ARNase et retire un intron d'un ARNm qui n'est pas épissé nommé X box-binding protein 1 (XBP1). Lorsque celui-ci est épissé, il est traduit en une protéine nommée XBP1s qui permettra la transcription de gènes encodant pour des chaperones et des protéines ER-associated degradation(Aad et al.)(Aad et al.). Le dernier senseur de l'UPR est ATF6. Cette protéine est transloquée dans l'appareil de Golgi lors de son activation. Elle est clivée par les protéases S1P et S2P. Ainsi, le facteur de transcription est libéré et transloque dans le noyau pour permettre l'expression des gènes encodant des chaperones, CHOP10 ou XBP1 (Iurlaro and Munoz-Pinedo, 2015).



<u>Figure 13</u>: Schéma illustrant l'Integrated Stress Response (ISR). Lors d'une déprivation d'acides aminés ou d'une inhibition de la traduction mitochondrial, la kinase General control non-derepressible protein 2 (GCN2) sera activée. Lors d'un stress du réticulum endoplasmique (ER), la protéine PKR-like ER kinase (PERK) sera activée. Lors d'une infection virale, la protéine double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) qui reconnaît les double-brins d'ADN sera activée. Enfin, lors d'une déprivation en hème, la protéine Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) sera activée. Lorsque ces quatre kinases sont activées, elles se dimérisent, se transphosphorylent et convergent vers la phosphorylation d'eukaryotuc initiation factor 2 α (eIF2 α) qui inhibera la traduction globale dépendante de la coiffe, mais qui augmentera la traduction indépendante de la coiffe. Un des ARNm dont la traduction est augmentée par ce mécanisme est celui qui code pour Activating Transcription fFctor 4 (ATF4). Celui-ci se fixera sur une séquence d'ADNnommée amino acid response element (AARE) et active l'expression de certains gènes dont C/EBP homolog protein 10 (CHOP10). Ce dernier, à son tour, permettra l'expression d'autres gènes tels que Tribbles homolog 3 (TRIB3), Activating Transcription Factor (ATF3) et Homocysteine-induced endoplamsic reticulum protein (HERP) (Arnould et al., 2015).

par exemple la prolifération (Oh & Reddy, 1999). D'autre part, Pdcd4 interagit avec l'ARNm de c-Myb et inhibe sa traduction, provoquant une boucle de rétroinhibition.

Au niveau post-transcriptionnel, l'ARNm de *PDCD4* est régulée par le microARN 21 (miR-21). Celui-ci lie la partie 3'UTR de l'ARNm de *PDCD4*, entrainant une dégradation du transcrit et donc un niveau protéique réduit de Pdcd4 (Asangani et al., 2008). *PDCD4* est aussi régulée par la protéine Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3), qui interfère avec le splicing et la traduction de l'ARNm de *PDCD4*. Dès lors, une déplétion de la protéine SRSF3 provoque une augmentation au niveau de l'ARNm de *PDCD4* (Park & Jeong, 2016).

Au niveau post-traductionnel, Pdcd4 peut être phosphorylée au niveau des Ser 67 et 457 par la Protein Kinase B (PKB, aussi nommé AKT). Cela permet sa translocation nucléaire et une moindre affinité pour le facteur de transcription Activator protein 1 (AP-1). De ce fait, on observe une perte de l'effet inhibiteur de Pdcd4 sur AP-1. AP-1 peut être formé grâce à 18 combinaisons de protéines appartenant aux familles Jun et Fos (M. R. Young et al., 2003) et est impliqué dans différents processus cellulaire tels que la différenciation ou la prolifération. De plus, Pdcd4 peut aussi être phosphorylée par la S6 Kinase 1 (S6K1) sur le résidu Ser 67 ce qui entraine sa dégradation ultérieure par le protéasome (Dorrello et al., 2006; Kumar et al., 2013; Ohnheiser et al., 2015; Singh et al., 2009). Sa dégradation permet aux cellules de se diviser en réponse à divers stimuli comme par exemple des mitogènes ou des hormones.

<u>ATF4, un facteur de transcription réprimé suite au silençage de MPV17</u>
 <u>5.1. ATF4 et l'integrated stress response (ISR)</u>

Activating transcription factor 4 (ATF4) est une protéine de 49 kDa composée de 351 résidus d'acides aminés. Il s'agit d'un facteur de transcription de type bZIP (Vlahopoulos et al., 2008) (**Figure 11**) qui est impliqué dans l'unfolded protein response (UPR) (**Figure 12**) et plus généralement dans l'integrated stress response (ISR).

De manière générale, les stress d'origine extrinsèque autant physiologiques que pathologiques sont regroupés dans l'integrated stress response (ISR) schématisée à la figure 13. Quatre kinases peuvent être activées lors de stress particuliers. Elles convergent vers la phosphorylation du résidu Ser51 d'eIF2a. eIF2 est une protéine trimérique possédant trois sousunités (α , β et γ). En temps normal, eIF2 γ est associé au GTP et recrute l'ARNt initiateur portant la méthionine. Ces trois éléments forment ainsi un complexe ternaire et se place dans la sousunité 40S du ribosome. Lorsque le codon START est scanné, le GTP est hydrolysé en GDP et eIF2-GDP est libéré. Par la suite, eIF2B, qui est une Guanine Exchange Factor (GEF), permet de remplacer le GDP en GTP. Lors d'un stress, la phosphorylation de la sous-unité a (Ser51) permet d'inhiber un autre cycle de remplacement du GDP par du GTP (Mazor & Stipanuk, 2016; Pakos-Zebrucka et al., 2016). eIF2a phosphorylé permet donc de diminuer la synthèse globale des protéines, mais augmente la traduction de certains ARNm qui possèdent des open reading frame (ORF) courtes comme Activating transcription factor 4 (ATF4), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) ou encore C/EBP homology protein 10 (CHOP10 aussi nommé DDIT3 ou GADD153) (Bu & Diehl, 2016; Iurlaro & Munoz-Pinedo, 2015; Michel et al., 2015). ATF4 se lie sur une séquence d'ADN nommée amino acid response element (AARE) et induit l'expression de CHOP10 ente autre. Ce dernier active à son tour la transcription de Tribbles



<u>Figure 14:</u> Schéma représentant le mode d'action permettant la transcription d'ATF4. KDM4C peut être surexprimer dans certains cancers ou être activé lors d'une déprivation d'acides aminés. Grâce à l' α -cétoglutarate, KDM4C déméthylera au niveau des H3K9 des nucléosomes situés sur le promoteur d'ATF4. Cette déméthylation mènera à une activation d'ATF4 (Zhao et al.,2016).



<u>Figure 15:</u> Représentation schématique des partenaires protéiques d'ATF4 et des différents gènes régulés. ATF4 peut s'hétérodimériser avec plusieurs facteurs de transcription (ATF3, CHOP, TRIB3, C/EBP β et CEBP γ) et se lier à une séquence au niveau de l'ADN nommée amino acid respose element (AARE). ATF4 est ses partenaires permettront l'expression de gènes encodant des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides ou dans la biosynthèse des acides aminés ou des gènes encodant des protéines impliquée dans la traduction, l'UPR ou participant au transport d'acides aminés.

homolog 3 (TRIB3), Activating Transcription Factor (ATF3) et Homocysteine-induced endoplamsic reticulum protein (HERP).

Le gène d'*ATF4* est régulé au niveau épigénétique, par la lysine-specific demethylase 4C (KDM4C, aussi nommée Jumonji domain-containing protein 2C, JMJD2C) possédant une activité déméthylase. Grâce à l' α -cétoglutarate, celle-ci déméthyle les histones H3K9 et H3K36 positionnées au niveau du promoteur d'ATF4 (Chin & Han, 2015; L. C. Young & Hendzel, 2013; Zhao et al., 2016). La déméthylation permet de rendre la chromatine plus accessible pour les facteurs de transcription et donc accroit la transcription d'ATF4 (**Figure 14**). De plus, certains cancers tels que le cancer du sein ou le carcinome squameux montrent une surexpression de KDM4C (Berry & Janknecht, 2013; Chin & Han, 2015; He et al., 2012). Cela permet une plus grande expression d'ATF4 qui est essentiel pour la prolifération de cellules cancéreuses (L. C. Young & Hendzel, 2013). L'importance d'ATF4 sera présentée dans les paragraphes suivants.

ATF4 est aussi régulé au niveau post-traductionnel par ubiquitination. Lorsqu'ATF4 est phosphorylée sur le résidu sérine 219 par une kinase encore inconnue, ce signal permet de recruter l'ubiquitine ligase β TrCP et provoque sa dégradation ultérieure par le protéasome (Lassot et al., 2001).

Concernant ses partenaires protéiques, ATF4 peut former des hétéro- ou homodimères avec d'autres facteurs de transcription comme TRIB3, ATF3, CHOP10, ou des facteurs de transcription de la famille des C/EBP tels que C/EBP β ou C/EBP γ (S. Wang et al., 2015). Ces différents facteurs de transcription régulent fréquemment de manière directe ou indirecte leur expression, suivant des boucles de régulation. Par exemple, ATF4 régule directement l'expression de C/EBP β (S. Wang et al., 2015). Il est aussi important de mentionner qu'ATF4 peut se lier à la protéine p300 qui est une histone acétyltransférase (HAT) permettant de stabiliser ATF4 indépendamment de son activité d'acétyltransférase, il joue un rôle de coactivateur transcriptionnel (Cherasse et al., 2007). p300 peut se lier à ATF4 et inhiber ainsi l'ubiquitination par les β TrCP (Lassot et al., 2005). De plus, ATF4 et p300 peuvent se lier à p300/CBP-associated factor (PCAF) qui est un coactivateur transcriptionnel possédant une activité HAT (Cherasse et al., 2007). Ce dernier permet de stabiliser ATF4 indépendamment de son activité HAT.

Il a été décrit qu'ATF4 régule l'expression de nombreux gènes que l'on peut classer dans différentes catégories fonctionnelles (**Figure 15**) qui sont décrites dans les paragraphes suivants.

Notons qu'ATF5 a une séquence en acides aminés très proche d'ATF4 (Watatani et al., 2007; Yamazaki et al., 2010). Il fait partie de la famille des protéines CREB/ATF (Yamazaki et al., 2010) et régule des processus tels que la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire et l'apoptose. et que ces deux acteurs sont partiellement redondants. En effet, ATF5 régule des gènes cibles d'ATF4 (TRIB3, ATF3, CHOP10) (Dogan et al., 2014; Tyynismaa et al., 2010). De plus, il est également uprégulé en réponse à une déplétion en acides aminés (Watatani et al., 2007; Yamazaki et al., 2010). Ainsi, une déprivation en glutamine permet d'upréguler l'ARNm d'ATF5. Pendant ce manque, l'uprégulation d'ATF5 est due à une stabilisation post-transcriptionnelle de l'ARNm et non à une induction de sa transcription (Watatani et al., 2007).


Figure 16: Schéma représentant la voie du tétrahydrofolate (THF). La sérine est produite à partir de glucose à travers plusieurs étapes de la glycolyse. La sérine peut être importée dans la mitochondrie et réagir avec le THF grâce à l'action du SHMT2 pour produire le 5,10-méthylene-THF. Ensuite, MTHFD2/2L pourra produire le 10-formyl-THF. A la fin, cela sera transformé en formylméthionine, utile lors de la traduction mitochondriale, ou en formate par MTHFD1L. Le formate sera exporté de la mitochondrie et sera transformé par MTHFD1 pour produire du 10-formyl-THF qui servira à la synthèse de purines.

La sérine peut aussi être utilisée dans le cytosol et réagir avec le THF grâce à l'action de la SHMT1 pour produire du 5,10méthylene-THF qui servira lors de la synthèse de dTMP. Le 5,10-méthylene-THF pourra être transformé successivement en 5,10méthenyl-THF et 10-formyl-THF par MTHFD1. Cependant, la voie cytosolique du mTHF produit principalement du déoxythymidine monophosphate (dTMP).

MTHFD2 est exprimé dans les cellules prolifératives tels que les cellules non-différenciées, les cellules embryonnaires ou les cellules transformées alors que MTHFD2L est epxrimé est exprimée dans les tissus adultes. Ces deux enzymes possèdent les activités 5,10-methylene-THF déshydrogénase et 5,10-methenyl-THF cyclohydrolase.

MTHFD1L possède l'activité 10-formyl-THF synthétase. MTHFD1 est une enzyme trifonctionnelle et dispose de trois activités modifié de Momb et al., 2013; Nikkanen et al., 2016).

<u>Abréviations</u> :3PG, 3Phosphoglycérate ; PHGDH, phosphoglycérate déshydrogénase ; 3POHPyr, 3-Phosphohydroxypyruvate ; PSAT1, Phosphosérine aminotransférase 1 ; PSer, Phosphosérine ; PSPH, Phosphosérine phosphatase ; SHMT1, sérine hydroxyméthyl transférase 1 ; SHMT2, sérine hydroxyméthyl transférase 2 ; THF, tétrahydrofolate ; MTHFD, méthylene tétrahydrofolate déshydrogénase ; NAD, nicotinamide adénine dinucleotide ; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; fMet, formylméthionine ; dTMP, deoxythymidine monophosphate.



Figure 17: Schéma représentant la synthèse d'asparagine au sein de la cellule. L'asparagine synthétase (ASNS) synthétise l'asparagine à partir d'aspartate, d'ATP et de glutamine.

5.2. ATF4 et la voie du tétrahydrofolate (THF)

Il a été démontré qu'ATF4 se fixait en amont de gènes codant pour des enzymes impliqués lors du métabolisme des nucléotides tels que la méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase 2 (*MTHFD2*), la méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase 1L (*MTHFD1L*) (S. Wang et al., 2015) ainsi que de la sérine hydroxyméthyl transférase 2 (*SHMT2*). MTHFD2 et MTHFD1L font partie de la voie métabolique nommée la voie du tétrahydrofolate (mammalian tetrahydrofolate pathway, mTHF). Cette voie métabolique est compartimentalisée en deux parties : une partie mitochondriale composée des enzymes MTHFD2 (bifonctionnelle) et MTHFD1L (monofonctionnelle) et une partie cytosolique constitué de l'enzyme trifonctionnelle MTHFD1. Ces deux parties permettent la synthèse du formate, un donneur d'unité 1C qui alimentent la voie de synthèse des bases puriques. Cependant, il est reconnu que les cellules cancéreuses reposent beaucoup plus sur la partie mitochondriale lors de la synthèse de purines. Ainsi, MTHFD2 est une enzyme essentielle pour générer des nucléotides (Tibbetts & Appling, 2010) (**Figure 16**).

5.2.1. ATF4 et la biosynthèse d'acides aminés

ATF4 contrôle également l'expression de plusieurs gènes encodant des enzymes impliquées dans la synthèse de certains acides aminés comme l'asparagine et la sérine. En effet, ATF4 induit l'expression de la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), ainsi que de la phosphosérine aminotransférase (PSAT) et de la phosphosérine phosphatase (PSPH). Ces trois enzymes font partie de la voie de synthèse de la sérine (Figure 16). De plus, ATF4 permet 14 expression de l'asparagine synthétase (ASNS) qui synthétise de l'asparagine à partir d'aspartate et d'un groupement donneur provenant de la glutamine (Figure 17) (Han et al., 2013; Harding et al., 2003; S. Wang et al., 2015). Notons qu'ATF5 peut aussi réguler l'expression du gène ASNS. ATF5 peut s'hétérodimériser avec d'autres protéines de la famille bZIP tels qu'ATF4 ou d' autres protéines bZIP (Al Sarraj et al., 2005) et permettre la transcription du gène encodant l'ASNS en se fixant à des séquences nommées nutrient-sensing response element (NSRE) (Al Sarraj et al., 2005). En plus de son rôle constitutif dans les protéines, elle contribue au transport de tous les autres acides aminés et préférentiellement la sérine, thréonine et tous les acides aminés non-polaires (Krall et al., 2016). Cette enzyme est importante lors de la prolifération de cellules cancéreuses car le fait de réaliser un knock-down de l'ASNS provoque une diminution de la prolifération des cellules MDA-MB-231, HeLa et A431. Ce déficit de prolifération provoqué par le knock-down de l'ASNS est partiellement restauré lors d'une supplémentation en asparagine dans des cellules LPS2 (liposarcome) (Krall et al., 2016).

5.2.2. ATF4 et la traduction protéique

L'expression de la majorité des ARNt synthétases est régulée par ATF4 et CHOP, mais ATF4 peut réguler à lui seul certains gènes d'ARNt synthétases. ATF4 se lie au niveau de séquences composites C/EBP-ATF Response Element (CARE) et permet de recruter CHOP (Shan et al., 2016). De plus, ATF4 et CHOP régulent l'expression de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction qui sont eukaryotic initiation factor 2 sous-unité 2 (*eIF2s2*) eukaryotic initiation factor 3 sous-unité c (*eIF3c*), eukaryotic initiation factor 4 gamma 2 (*eIF4g2*), eukaryotic initiation factor 5 (*eIF5*) (Han et al., 2013; Harding et al., 2003).



Figure 18: Représentation schématique du cycle de la méthionine. La méthionine est convertie en SAM par la S-adénosylméthionine synthase (aussi connue comme la méthionine adénosyltransférase (MAT)) grâce à un procédé ATP-dépendant. Le SAM qui est un donneur de groupe méthyl utilisé par une grande famille de méthyltransférase SAM-dépendante pour la méthylation de l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides. Le cycle du folate (qui est soutenu par des unités 1C dérivé de la sérine) aide à maintenir le niveau cellulaire d'ATP grâce à la synthèse *de novo* des purines. Le produit intermédiaire des réactions des méthyltransférases, le S-adénosylhomocystéine (SAH), est convertie en homocystéine, un précurseur pour la synthèse de cystéine et de glutathion grâce à la voie de transsulfuration. Le 5,10-méthyléne-tétrahydrofolate (5,10-methylene-THF) dérivé du cycle de folate peut être converti de manière irréversible par la méthylènetétrahydrfolate réductase (MTHFR) en 5-méthyl-THF, qui peut ensuite donner son groupe méthyl à l'homocystéine grâce à la réaction de la méthionine synthase (MS) pour produire la méthionine et le THF, un procédé qui utilise la vitamine B12 comme cofacteur. La choline peut aussi contribuer à la reméhylation de l'homocystéine via la génération de la bétaine, qui est convertie en diméthylglycine (DMG) grâce à la réaction catalysée par la bétaine-homocystéine S-méthyltransférase (BHMT). La DMG peut contribuer à générer des unités 1C au cycle du folate mitochondrial. (Yang and Vousden, 2016).



Figure 19: Schéma représentant l'import de certains acides aminés par les transporteurs SLC7A11, SLC7A5 et SLC1A5. SLC7A11 (aussi nommé xCT) permet d'importer de la cystine en échange de glutamate. La cystine sera oxydée et est utilisée pour la synthèse du glutathion. SLC7A5 (aussi nommé LAT1) permet d'importer plusieurs acides aminés qui sont utilisés lors de la synthèse protéique ou lors de la synthèse des purines et pyrimidines. SLC3A2 est une protéine chaperone essentielle pour l'activité de transport de SLC7A11 et SLC7A5. SLC1A5 permet le transport d'autres acides aminés qui sont utilisés lors de la synthèse protéique ou lors de la synthèse met le transport d'autres acides aminés qui sont utilisés lors de la synthèse protéique ou lors de la synthèse des purines (modifié d'après Broër et al., 2016).

5.2.3. ATF4 et les transporteurs d'acides aminés

Les tumeurs ont une demande accrue en acides aminés afin de soutenir leur prolifération intense. Ainsi, les cellules cancéreuses ont besoin de s'approvisionner en acides aminés essentiels (Thr, Lys, Met, Phe, Trp, Val, Leu et Ile) car elles ne peuvent les synthétiser. Cependant, les acides aminés dits non-essentiels et donc synthétisés de manière endogène, peuvent aussi devenir limitants car la demande peut excéder leur capacité de synthèse de ces acides aminés. Il n'est donc pas surprenant que les cellules cancéreuses uprégulent ces transporteurs vu leur demande accrue en acides aminés.

Les fonctions des acides aminés sont multiples. Bien entendu, ils servent d'abord à la traduction protéique, mais également à de nombreuses voies anaboliques. Par exemple, la glutamine, la glycine ou l'aspartate peuvent être utilisée afin de synthétiser les bases puriques et pyrimidiques (voir **Figure 2**) (Bhutia et al., 2015; Bhutia & Ganapathy, 2016). D'autre part, la glutamine permet également de générer du glutamate, précurseur d'un métabolite important du cycle de Krebs grâce aux réactions anaplérotiques, il s'agit de l' α -cétoglutarate (Altman et al., 2016). La sérine peut être utilisée dans la voie mitochondriale ou cytosolique du tetrahydrofolate (THF), ce qui permet la synthèse de glycine (voir **Figure 15**). La sérine peut aussi être utilisée afin de synthétiser la cystéine dans la voie de transsulfuration afin d'alimenter le cycle de la méthionine nécessaire à la méthylaton de l'ADN et à la biosynthèse de phospholipides (**Figure 18**). Enfin, la glutamine, l'arginine et la leucine servent aussi de molécules de signalisation permettant d'activer mTOR qui est un acteur qui permet d'augmenter la traduction protéique.

Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que les cellules cancéreuses surexpriment beaucoup de transporteurs d'acides aminés. Plusieurs d'entre eux sont sous le contrôle du facteur de transcription ATF4 (S. Wang et al., 2015). Ces transporteurs sont par exemple SLC1A5, SLC7A5, SLC38A1 (aussi connu sous le nom de SNAT1), SLC7A11, et SLC7A1 (aussi nommé CAT1).

5.2.3.1.<u>SLC7A5 (LAT1)</u>

Il s'agit d'un transporteur passif d'acides aminés de type L (Leucine-preferring) et non couplé avec un gradient ionique (Bhutia et al., 2015; Fotiadis et al., 2013) (**Figure 19**). Il est constitué de 507 résidus d'acides aminés (Pochini et al., 2014) et possède une grande affinité pour les acides aminés ramifiés (Val, Ile et Leu) ainsi que les acides aminés de plus haut poids moléculaire (Tyr, Trp, Phe, Gln, Asn et Met) (Pochini et al., 2014). Ce transporteur est un échangeur d'acides aminés où l'influx d'acides aminés est couplé avec l'efflux d'un autre acide aminé (Bhutia et al., 2015; Fotiadis et al., 2013). On observe une surexpression de cette protéine dans la plupart des cancers (Bhutia et al., 2015) car il joue un rôle crucial dans la survie et la croissance tumorale (Fotiadis et al., 2013). Le promoteur du gène encodant ce transporteur possède des séquences de liaison de c-Myc et la surexpression de cet oncogène est corrélé à une plus grande expression de ce transporteur au niveau de carcinome hépatocellulaire (Kondoh et al., 2007).

SLC7A5 fonctionne en coopérant avec un autre transporteur d'acides aminés : en effet, afin d'importer la leucine, SLC7A5 fonctionne avec SLC1A5 (ASCT2) qui importe la glutamine et exporte le glutamate (Bhutia et al., 2015; Bhutia & Ganapathy, 2016). La glutamine importée

est alors exportée par SLC7A5 en échange de leucine, qui est un activateur de mTOR. De plus, SLC3A2 (4F2hc) coopère avec SLC7A5 et SLC7A11. SLC3A2 est une protéine chaperone qui ne possède pas de fonction de transport et qui forme un hétérodimère avec SLC7A5 (Bhutia et al., 2015). Elle est indispensable pour le recrutement des transporteurs en membrane plasmique et donc pour leur fonction de transport. Notons que SLC3A2 est aussi une cible de c-Myc (Bhutia et al., 2015).

5.2.3.2.SLC7A11 (xCT)

SLC7A11 (aussi nommé xCT) est un transporteur de cystine (cystéine réduite) (voir **Figure 19**). L'import est couplé à un efflux de glutamate (Bhutia et al., 2015; Fotiadis et al., 2013; Huang et al., 2005). C'est un échangeur obligatoire indépendant du Na⁺ (Bhutia et al., 2015; Fotiadis et al., 2013). Ce transporteur est aussi directement régulé par c-Myc.

La première fonction de ce transporteur est de maintenir l'homéostasie rédox de la cellule car la cystéine est l'acide aminé limitant lors de la synthétise de glutathion un élément essentiel de l'arsenal antioxydant (Bhutia et al., 2015; Fotiadis et al., 2013; Huang et al., 2005). De plus, le glutamate libéré dans l'environnement peut stimuler la signalisation au glutamate au niveau des cellules cancéreuses via les récepteurs mGluR/iGluR. Ainsi, le ratio Glu/Gln pourrait être un indicateur de l'agressivité des cancers (Bhutia et al., 2015).

Tout comme SLC7A5, SLC7A11 coopère avec SLC1A5. SLC1A5 importe la glutamine qui sera convertie en glutamate par la glutaminase, ce qui permet l'import de cystine via SLC7A11 en exportant le glutamate (Bhutia et al., 2015; Bhutia & Ganapathy, 2016). De plus, la glutaminase I est aussi induite par c-Myc.

Ce transporteur permet aussi de réaliser le cycle cystine/cystéine : SLC7A11 importe la cystine qui est par après réduite. Une partie est utilisée pour la synthèse de glutathion et l'autre partie est sécrétée dans le milieu, qui est réoxydé en cystine. Cela permet de créer un environnement réducteur qui est impliqué dans la chémorésistance de certains cancers. Néanmoins, on n'a pas encore identifié le transporteur impliqué dans la sécrétion de cystéine, mais l'on pense que SLC1A5 est le meilleur candidat vu que SLC7A11 et SLC1A5 sont coexprimés à haut niveau dans les cancers (Bhutia et al., 2015; Huang et al., 2005). De plus, SLC3A2 (4F2hc) coopère avec SLC7A11. Tout comme SLC7A5, SLC3A2 forme un hétérodimère avec SLC7A11, permettant son recrutement en membrane plasmique et donc son activité de transporteur (Huang et al., 2005).

5.2.3.3.<u>SLC1A5 (ASCT2)</u>

SLC1A5 est un transporteur composé de 541 résidus d'acides aminés (Pochini et al., 2014). Il permet le transport d'alanine, sérine, cystéine, thréonine et glutamine couplé au Na⁺ (Bhutia & Ganapathy, 2016; Fotiadis et al., 2013) (voir **Figure 19**). C'est un échangeur obligatoire d'acides aminés où l'import d'acides aminés est couplé avec un efflux de Na⁺ ainsi que d'acides aminés. De plus, SLC1A5 est une cible de c-Myc, ce qui permet un couplage optimal entre SLC1A5 et SLC7A5.

Ce transporteur est décrit comme étant un transporteur net de glutamine (van Geldermalsen et al., 2016), un acide aminé permettant d'activer mTORC1 qui est un acteur important pour la prolifération des cellules cancéreuses.

La réduction protéique d'ASCT2 par interférence ARN permet d'empêcher la prolifération de plusieurs cancers (mélanome, cancer de la prostate cancer des poumons...).



<u>Figure 20</u>: Schéma représentant le rôle du transporteur SNAT1 dans la prolifération cellulaire. SNAT1 permet l'import de plusieurs acides aminés dont la glutamine. La glutamine peut être utilisée lors de la glutaminolyse. Ce processus débute avec la conversion de la Gln en Glu par la glutaminase. Puis, le glutamate est importé dans la mitochondrie et peut être transformé en α -cétoglutarate soit par la glutamate déshydrogénase (GDH), soit par réactions de transamination. Il existe deux transaminases mitochondriales : la première est la glutamate-oxaloacétate transaminase 2 (GOT2) qui permet de synthétiser de l'aspartate à partir d'acide oxaloacétique (AOA). La seconde est la glutamate-pyruvate transaminase 2 (GPT2) qui permet de synthétiser de l'alanine à partir de pyruvate. Enfin, l' α -cétoglutarate peut continuer dans le cycle de Krebs qui permet de synthétiser de l'oxaloacétate. L'oxaloacétate peut être transformé en Asp grâce à la GOT2. L'aspartate pourra être utilisé lors de la synthèse de purines (modifié d'après Broër et al., 2016).



Figure 21: Schéma représentant le rôle du transporteur SLC7A1 dans la prolifération cellulaire. SLC7A1 permet de transporter de l'arginine, de l'ornithine et de la lysine. L'ornithine et l'arginine peuvent être utilisées dans le cycle de l'urée. Le cycle de l'urée débute dans la mitochondrie avec la condensation du carbamoyl-phosphate (Carbamoyl-P) sur l'ornithine catalysée par l'ornithine transcarbamoylase (OTC). Cele permet de produire de la citrulline qui sera exporté dans le cytosol. La citrulline sera convertie en argininosuccinate par l'argininosuccinate synthétase (ASS). Par après, l'argininosuccinate sera transformé en arginine par l' argininosuccinate lyase (ASL). L'arginine est convertie en ornithine grâce à l'arginase. Ensuite, l'ornithine est convertie en putrescine (le précurseur des polyamines) par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est transformé en spermidine par la spermidine synthase (SPDS). La spermidine est convertie en spermine par la spermine synthase (SPDS). La spermidine est convertie en spermine par la spermine synthase (SPDS). La spermide est convertie en spermine par la spermine synthase (SPDS). La spermine est la spermidine par la spermidine sont les polyamines permettant l'hypusination (une modification post-traductionnelle) de l'eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) qui est une protéine essentielle pour la prolifération. Cette modification permet son activité lors de l'initiation et l'élongation protéique (modifié d'après Broër et al., 2016 ; Landau et al., 2010).

Dans des cellules du cancer du sein, la réduction protéique d'ASCT2 est suffisante pour induire une diminution de la prolifération (van Geldermalsen et al., 2016).

En effet, l'activité de SLC1A5 et la disponibilité en glutamine affectent des processus cellulaires tels que la translocation lysosomale de mTORC1, l'activation des caspases, le clivage de PARP et l'autophagie. De plus, certains acides aminés ne sont plus transportés tels que l'alanine, la sérine, la thréonine et l'asparagine. La déplétion de ces acides aminés pourrait aussi avoir des effets néfastes sur la division cellulaire tant au niveau de la traduction globale que dans certains processus nécessitant des acides aminés spécifiques tel que la synthèse de purines (van Geldermalsen et al., 2016).

5.2.3.4.<u>SNAT1 (SLC38A1/ATA1)</u>

SNAT1 est un transporteur de la famille de transporteurs du système N composé de 486 résidus d'acides aminés (Pochini et al., 2014). Il permet l'import d'asparagine, glycine, proline, alanine, sérine, cystéine, glutamine, histidine et méthionine (Broer et al., 2016). SNAT1 est décrit comme étant un transporteur principal de glutamine qui est un acide aminé essentiel pour les cellules cancéreuses. Ce transporteur a été montré comme étant surexprimé dans certains cancers comme le gliome, le cholangiocarcinôme hilaire ou le carcinome hépatocellulaire (K. Wang et al., 2013), mais de manière plus générale dans 947 lignées cellulaires. Il a d'ailleurs été suggéré que SNAT1 est important pour la glutaminolyse (Broer et al., 2016). La glutaminolyse permet de générer des intermédiaires du cycle de Krebs tel que l'a-cétoglutarate par des réactions de transamination ou par l'action de la glutamate déshydrogénase. Cela permettra de générer de l'oxaloacétate qui pourra servir à synthétiser de l'aspartate qui est un acide aminé essentiel lors de la synthèse de nucléotides (Figure 20) (Altman et al., 2016). De plus, SNAT1 est surexprimé dans les tissus prénéoplasiques et dans les tissus néoplasiques du foie tant au niveau du transcrit qu'au niveau protéique. Ensuite, interférer avec l'expression de ce transporteur permet d'observer une moindre survie de cellules HepG2, ainsi qu'une moindre prolifération de cellules MDA-MB-231 (Kondoh et al., 2007; K. Wang et al., 2013).

5.2.3.5.<u>SLC7A1 (CAT1)</u>

SLC7A1 est exprimé ubiquitairement et constitutivement dans tous les tissus adultes à l'exception du foie (Abdelmagid et al., 2011; Fotiadis et al., 2013). Au niveau de cellules d'hépatocarcinome comme les cellules Huh7, le microARN-122 (miR122) supprime sa traduction en se liant au niveau du 3'UTR de l'ARNm permettant sa dégradation. Seuls certains stimuli comme un stress oxydant ou une déprivation en acides aminés permettent de lever cette répression.

Il s'agit d'un transporteur d'arginine, de lysine et d'ornithine (Abdelmagid et al., 2011). L'arginine est importante pour la prolifération de certaines cellules cancéreuses telles que les cellules HCT116 (lignées humaines de cellules du cancer du côlon) (Lu et al., 2013). En effet, l'arginine peut être catabolisée en ornithine par l'arginase qui est surexprimée dans certains cancers. A son tour, l'ornithine peut être transformée en putrescine (un précurseur de polyamine) par l'ornithine décarboxylase (ODC) (Pegg, 2009). La putrescine pourra être transformée en spermidine et puis en spermine (Soda, 2011) (**Figure 21**). Cette voie de synthèse de polyamines serait importante pour la prolifération cellulaire car des études montrent que le niveau de polyamines est plus élevé dans les cellules cancéreuses (Lu et al.,

2013; Soda, 2011). Le fait de priver des cellules en arginine altère la prolifération et cet effet est encore plus marqué lorsque l'on déprive en arginine des cellules cancéreuses déficientes en argininosuccinate synthétase (ASS) (Lu et al., 2013) qui est une enzyme permettant de synthétiser l'arginine de manière endogène. Cela signifie que ces cellules sont uniquement dépendantes du transport d'arginine (Lu et al., 2013).

Une autre façon de synthétiser de l'arginine de manière endogène est le catabolisme de l'arginine par la nitric oxide synthase (NOS). Cette enzyme permet de synthétiser de la citrulline qui peut être transformé en arginine grâce à l'ASS et l'argininosuccinate lyase (ASL).

II. Objectif du mémoire

Mpv17 est documenté comme une protéine appartenant à la MMI et associée au maintien de l'ADNmt. En effet, lorsque cette protéine est mutée, des personnes sont atteintes de MDDS (Spinazzola et al., 2006).

Des données obtenues précédemment au laboratoire ont montré un taux de prolifération plus faible dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses suite au silençage de *MPV17* par rapport aux cellules contrôles transduites avec un shARN non-cible (shNT). A l'heure actuelle, aucune étude n'a été publiée concernant le rôle de Mpv17 dans des cellules cancéreuses. Ce mémoire a donc deux objectifs :

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les partenaires protéiques de Mpv17 en utilisant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle Blue-Native. Malgré plusieurs tentatives, la technique de Blue-Native s'est révélée difficile d'un point de vue technique car nous n'avons pas pu localiser Mpv17 par Western Blot sur le gel de seconde dimension (voir présentation du mémoire première partie). Cette approche n'a pas été poursuivie, afin de nous concentrer sur d'autres pistes plus prometteuses.

Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre par quel(s) mécanisme(s) une downregulation de Mpv17 provoque une diminution de la prolifération. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à plusieurs acteurs moléculaires susceptibles d'expliquer la moindre prolifération des cellules transduites. Le modèle expérimental sélectionné des cellules Hep3B soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant l'ARNm de *MPV17* (shMPV17)

Premièrement, nous caractériserons le phénotype mitochondrial en évaluant le contenu en ADNmt de cellules transduites avec shMPV17 puisque des mutations dans le gène *MPV17* entrainent des MDDS suite à des mutations (Spinazzola et al., 2006). Si la downrégulation de Mpv17 permet d'observer une déplétion de l'ADNmt, cela suggérerait que les sous-unités impliquées dans les OXPHOS ne seraient plus produites de manière stoechiométrique. Cela causerait des réactions OXPHOS moins efficaces, ce qui pourrait expliquer la moindre prolifération.

Ensuite, nous travaillerons sur base de données obtenues préalablement au laboratoire suite à un screening d'acteurs moléculaires qui sont impliqués dans le cycle cellulaire et potentiellement affectés par le silençage de *MPV17*, nous chercherons à confirmer les variations d'abondance de Mnk1 et Pdcd4. Nous avons donc cherché à confirmer la réduction d'abondance protéique de ces acteurs et nous évaluerons l'impact de leur réduction au sein de la cellule car ces deux protéines régulent la traduction d'ARNm spécifiques impliqués dans la prolifération.

Enfin, il a été montré récemment au laboratoire que l'abondance protéique d'ATF4 est fortement réduite dans les cellules transduites avec shMPV17. Nous chercherons à comprendre comment la réduction de cette protéine peut modifier la prolifération. En effet, ATF4 régule un grand nombre de gènes participant à plusieurs voies métaboliques. Ainsi, une diminution de l'expression de ces gènes et potentiellement de leur abondance protéique pourrait expliquer, en partie, la moindre prolifération des cellules transduites avec shMPV17.

Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Méthode

Les cellules Hep3B (ATCC HB-8064) sont cultivées dans du milieu RPMI (Life technologies; #21875-034) supplémenté avec 10% de sérum de veau fétal (SVF) (Life technologies, #10270-106) pour la culture de routine. Elles sont passées approximativement tous les deux jours à l'aide de trypsine-EDTA (Life technologies, #25300-054)

2. Transduction lentivirale

Principe

La transduction lentivirale permet d'introduire du matériel génétique dans la cellule et d'intégrer le transgène dans l'ADN de la cellule hôte. Le transgène que nous introduisons contient un shARN, qui, une fois exprimé permettra de réduire l'abondance d'une protéine cible à long-terme en ciblant en dégradant son ARNm. De plus, les cellules transduites sont sélectionnées grâce un marqueur de sélection. Dans notre cas, il s'agit de la puromycine qui est un antibiotique nucléosidique mimant l'extrémité 3' d'un aminoacyl-ARNt et qui permet de détruire les cellules n'ayant pas été transduites en inhibant la synthèse protéique (Azzam & Algranati, 1973).

Méthode

Pour la transduction lentivirale les cellules Hep3B sont ensemencées dans une T25 à une densité de 16000-18000 cellules/cm². Les cellules sont transduites avec des lentivirus shARN non-target (shNT) et shARN ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17) (Addgene 19070) (MOI=25) dans du milieu frais et de la protamine sulfate (0,06 mg/mL). Les cellules transduites avec un shNT constitue la condition contrôle de cette études. Le jour suivant, toutes les cellules subissent un passage et sont placées dans des T75. Les cellules non-transduites sont cultivées comme dans le point 2.2.1., alors que les cellules transduites sont sélectionnées dans du RPMI contenant 10% de SVF et supplémenté avec de la puromycine (2,5µg/mL). Cette étape de sélection se passe pendant six jours. Les cellules sont passées pendant ces six jours en fonction de leur prolifération. Après cette période de sélection, la puromycine est enlevée et est remplacé par du milieu simple pendant deux jours. Ensuite, les cellules sont ensemencées à une densité de 600000 cellules par T75 où elles prolifèrent pendant quatre jours. Finalement, les cellules sont récupérées sous forme de culots secs afin d'en extraire l'ADN mitochondrial, l'ARN et les protéines pour les expériences ultérieures. Pour les culots secs, les cellules sont rincées avec du PBS. Elles sont ensuite grattées dans 1 mL de PBS et centrifugées pendant trois minutes à 1000 rpm.

3. Western Blot

Principe:

Le Western Blot est une technique qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et d'évaluer leur abondance de manière semi-quantitative, à l'aide d'anticorps spécifiques. Concrètement, les protéines sont extraites et dénaturées avec du SDS qui impose une charge négative sur toutes les protéines et du β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures. Par après, les protéines seront séparées selon leur poids moléculaire grâce à un gel composé de polyacrylamide en appliquant différence de potentiel. Ensuite, un transfert sera réalisé pour que les protéines du gel puissent être transférées sur une membrane. Enfin, un anticorps primaire reconnaissant un épitope particulier d'une protéine cible est utilisé et un anticorps secondaire couplé d'un fluorochrome et reconnaissant l'anticorps primaire permettra d'amplifier le signal.

Extraction protéique RIPA

Méthode

Les cellules sont rincées et les protéines extraites dans 200 uL de tampon RIPA [25mM Tris (Merck Milipore, #1.08382.0500), 150mM NaCl (Merck Milipore, 1.06404.1000), 1% NP40 (AMRESCO, M158-50ML), 1% deoxycholate (DOC), 0,1% SDS (MP, 811030)] contenant le protease inhibitor cocktail (PIC, Roche #118361450001) et le phosphatase inhibitor buffer (PIB, 25mM Na₃VO₄ (Sigma #S-6508), 250mM 4-(PNPP, Sigma-N-3254), 250mM β-glyceroposphate nitrophenylphosphate (VWR #27874295), 125mM NaF (Merck #6449), pH 7,6). Les cellules sont ensuite grattées et récupérées. Après 10 minutes de lyse sur glace, les échantillons sont soniqués trois fois pendant 10 secondes (amplitude 50) puis, centrifugés à 4°C à 13000 rpm (Sigma1-15PK). Le surnageant est récupéré et le contenu protéique est dosé grâce au dosage de Pierce qui se réalise avec le réactif de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Prod #22660) contenant l'Ionic Detergent Compatibility Reagent (IDCR, Thermo Scientific Prod# 22663) et un spectrophotomètre (Bio-Rad x Mark Microplate Spectrophotometer). Enfin, les différents échantillons peuvent être aliquotés et conservés à -80°C.

SDS-PAGE

Méthode

Les gels précoulés 12% Protean TGX (Bio-Rad # 456-1044). Ils sont rincés avec du tampon de migration 1X [Tris 0,025 mM (Merck Milipore, #1.08382.0500), Glycine 0,192 M (Merck Milipore, #1.04201.1000), SDS 3,5M (MP, #811030)] et placés dans le dispositif permettant la migration. Le tampon de migration 1X est d'abord placé au centre pour recouvrir le gel et ensuite est placé tout autour du gel. Un volume de 20µg de protéines est mis en présence du volume approprié de tampon de charge 5X [0,143 M Tris-HCl pH 6,8 ; 0,2M SDS (MP, #811030) ; 2M β-mercaptoéthanol (Sigma, #63700)] afin d'obtenir une concentration finale 1X en tampon de charge. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant cinq minutes afin de dénaturer et réduire les protéines. Ensuite, les échantillons sont centrifugés brièvement et chargés sur le gel ainsi que l'étalon protéique qui est le SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Thermo Fisher Scientific, REF LC5925). L'électrophorèse est faite à 120V durant 1h.

Primary Antibody	Clonality	Company	Catalog#	Dilution
ASNS	Polyclonal	Proteintech	14681-1-AP	1/1000
α-Tubulin	Monoclonal	Sigma-Aldrich	T5168-5ML	1/10000
β-Actin	Monoclonal	Sigma-Aldrich	A5441-2ML	1/10000
ATF4	Monoclonal	Cell Signaling	11815	1/1000
4E-BP1	Monoclonal	Cell Signaling	9644	1/1000
MNK1	Monoclonal	Cell Signaling	2195	1/1000
MTHFD2	Polyclonal	Proteintech	12270-1-AP	1/1000
mTOR	Polyclonal	Cell Signaling	2972	1/1000
PDCD4	Monoclonal	Cell Signaling	9535	1/1000
PeIF2a	Polyclonal	Cell Signaling	9721	1/1000
PeIF4E	Polyclonal	Cell Signaling	9741	1/1000
PmTOR	Polyclonal	Cell signaling	2971	1/1000
Рр7086К	Polyclonal	Cell Signaling	9205	1/1000

Tableau 2: Anticorps primaires utilisés en Western Blot.

Secundary Antibody	Clonality	Company	Catlog #	Dilution
IRDYE680RD	Monoclonal	LI-COR	926-6807	1/10000
IRDYE800RD	Monoclonal	LI-COR	926-32210	1/10000

Tableau 3: Anticorps secondaires utilisés en Western Blot.

Nu-PAGE

Méthode

Les Nu-PAGE sont des électrophorèses adaptées pour la résolution de protéines de plus haut poids moléculaire telles que mTOR ou de plus petites protéines. Un volume de $20\mu g$ de protéines est mis en présence du volume approprié du tampon de charge 1X à partir de tampon de charge Lauryl dodecylsulfate [LDS, sample Buffer 4X (Life technologies, ref NP0007), DTT 1M (Sigma, D0632)]. Les échantillons sont chauffés à 70°C pendant 10 minutes afin de réduire et dénaturer les protéines, spinnés brièvement et chargés sur un gel précoulé 3-8% de type NuPAGE qui est placé dans un dispositif permettant la migration (Invitrogen xCell SureLock Mini-Cell, #EI0001). Deux tampons de migration SDS sont préparés : 50mL SDS Running Buffer Tris-Acetate 20X (Life Technologies, LA0041) est dilué dans 950 mL d'eau milliQ. La deuxième solution est constituée de 200mL de la première solution et 500 μ L Nu-PAGE antioxidants (Thermo Fisher Scientific, NP0005). La migration est faite à 200V durant 45 minutes.

Transfert

Méthode

Après un SDS-PAGE

Les papiers Wattman, les éponges, la membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF, Merck Millipore, #IPFL00010) et le gel du SDS-PAGE sont pré-incubés dans du tampon de transfert [25mM Tris (Merck Milipore, 1.08382.0500), 150mM glycine (Merck Milipore, 1.04201.1000), 20% méthanol (Merck Milipore, 1.07018.2511)] puis le montage et placé dans l'appareil de transfert liquide (Bio-Rad Mini Protean Tetra System, #1658006) maintenu au frais. Le transfert liquide dure 1 heure à 100V.

Après un Nu-PAGE

200 mL de tampon de transfert sont préparés avec 10mL de tampon de transfert Nu-PAGE 20X (Life Technologies, NP0006), 20mL methanol (Merck Milipore, 1.07018.2511), 200µL d'antioxydants NuPAGE (Thermo Fisher Scientific, NP0005).

Les papiers Wattman, les éponges, la membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF, Merck Millipore, #IPFL00010) et le gel du Nu-PAGE sont pré-incubés dans du tampon de transfert puis le montage et placé dans l'appareil de transfert semi-sec (GE Healthcare, TE 77 PWR). Le transfert se déroule pendant 2 hours à 1 mA/cm².

Détection de l'antigène

Méthode

La membrane est bloquée dans du PBS-Licor (Westburg, Li 927-40010) pendant 1 heure. L'anticorps primaire et secondaire sont dilués dans du Licor-Tween 20 0,1% (Bio-Rad, #1706531). Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont résumés dans la **Tableau 2**.

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire overnight. Le jour suivant, la membrane est rincée trois fois avec du PBS-Tween 20 0,1%. Les anticorps secondaires (**Tableau 3**) sont utilisés pendant 1 heure. Après, la membrane est rincée à nouveau trois fois pendant 5 minutes avec du PBS-Tween20 0,1% et deux fois avec du PBS et séchée à 37°C. Par après, elle est scannée avec la machine Odyssey (LICOR). La quantification a été faite avec les programmes Image J ou Odyssey. La normalisation est faite en fonction du contrôle

Gene	Forward primer	Reverse primer
ASNS	5' GAG GCT TCT GAG GGA ACT CT 3'	5' TCT GGT GGC AGA GAC AAG TA 3'
ATF3	5' GGA GCC TGG AGC AAA ATG ATG 3'	5' AGG GCG TCA GGT TAG CAA AA3'
ATF5	5' GGC ACC AAG GCG AAA GT 3'	5' TCC GCT CCC ACC TTC TTT 3'
Becline	5'GGG ACT GTA GGC TGG GAA CTA TGC 3'	5'CCC TCA TCA CAG GGC TCT CTC CA 3'
DDIT3	5' GCA AGA GGT CCT GTC TTC AGA TG 3'	5' CTC AGT CAG CCA AGC CAG AGA 3'
HERP	5' ATT TAG ACC GAG GCC GGT TC 3'	5' CAG GAT CAG TGC CTT CCT GTA 3'
MNK1	5'AAA CCT ATA GAG ATG GGC AGT 3'	5' CAC CTT GAA CTT TGG CAT A 3'
MTHFD1	5'GCG CCA GCA GAA ATC CTG A 3'	5'AGG TAC TTG CTC CTT CAA CTG 3'
MTHFD1L	5'TGC TCT ACA ATG CCT GTT CC 3'	5' AAG GGG AAT CTC TTC TGG CT 3'
MTHFD2	5'CTG CGA CTT CTC TAA TGT CTG C 3'	5'CTC GCC AAC CAG GAT CAC A 3'
MT-ND2	5'TGT TGG TTA TAC CCT TCC CGT ACT A 3'	5'CCT GCA AAG ATG GTA GAG TAG ATG A 3'
PDCD4	5'TCC TAG AGC ACC ACA GTT GG 3'	5'AGC CTG CAC ACA ATC TAC AG 3'
PHGDH	5' GCGC GAA AGT GCA CAT CAG T 3'	5' GCA GAG CGA ACA ATA AGG C 3'
PSAT	5' CGT TCA CCC TAA ACT TGG GA 3'	5' AGT CAA ACT CCA CAC CAT GC 3'
PSPH	5' GAC TCA TAG CAG AGC AAC CC 3'	5' CCT GAA CAT TTC GCT CCT GT 3'
SHMT1	5' ATG ACA AGA TGC TGG CAC AA 3'	5'AAT CAG CTC CAA TCC AAC CC 3'
SHMT2	5' GCA TGA GAG AGG TGT GTG AT 3'	5' TGA GTA GTG GTG GTG ACG AT 3'
SLC1A5	5' CCA TCA TCC TCG AAG CAG TC 3'	5' GAG CGT CAC CTT CTA CAT TGA 3'
SLC7A5	5' CCC TCC ATC CTC TCC ATG AT 3'	5' TAG AGC AGC GTC ATC ACA CA 3'
SLC7A1	5' TGC CTG TGT TGT GTT GGT CTT AC 3'	5' GGT CTG CTG GAT CTA ACT CG 3'
SLC7A11	5' TGC TGG GCT GAT TTA TCT TCG 3'	5' GAA AGG GCA ACC ATG AAG AGG 3'
SNAT1	5' GGA TTT TGG GAC TCG CCT CCT TT 3'	5'TTT CAT ACA CCA TGC AGC CT 3'
TRIB3	5' CGT GAT CTC AAG CTG TGT CG 3'	5' AGT TTC TTC CTC TCA CGG TC 3'
Tubuline	5'CCC GAG GGC ACT ACA CCA 3'	5'CAG GGA GGT GAA CCC AGA AC 3'

Tableau 4 : Primers utilsés en PCR quantitative en temps réel.

de charge sélectionné (α -tubuline or β -actine). Finalement, en fonction du Western Blot réalisé, les résultats sont exprimés comme un pourcentage par rapport aux cellules nontransduites ou par rapport aux cellules transduites par les lentivirus portant le transgène shNT.

4. RT-PCR en temps réel

Méthode

Quatre jours après l'ensemencement à une densité de 600000 cellules par T75, les cellules sont rincées avec du PBS, puis grattées directement dans du tampon RLT. L'ARN est extrait avec le kit RNeasy MINI avec digestion à la DNase et le Qiacube (Qiagen).

L'ARN extrait est ensuite quantifier avec un spectrophotomètre nanodrop (Isogen). Les absorbances à 230, 260, 280 nm sont contrôlés car le rapport260/280 indique la contamination par des protéines et le rapport 260/230 indique la contamination par des sels. Finalement, l'ARN est conservé à -80°C.

Avant la rétrotranscription, la paillasse et le matériel sont nettoyés avec du sodium dodecylsulfate (SDS, Merck Millipore #1.06022 .100), ainsi que le matériel afin de travailler dans des conditions «RNase-free». La transcription inverse est réalisée avec le Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE, Ref 04896866001) suivant les instructions du fournisseur. Un volume correspondant à 2 µg d'ARN est prélevé des échantillons d'ARN extraits précédemment et est complété par de l'eau RNase-free afin d'obtenir 12µL finaux. A cela, on ajoute 1µL d'oligodT afin d'initier la rétrotranscription des ARNm polyadénylés et on incube pendant 10 minutes à 65°C. Après, un mix composé de 2µL de dNTP, 0,5µL de transcriptase inverse, 4µL de tampon de la transcriptase inverse 5X et 0,5µL d'inhibiteurs de RNase est rajouté sur glace aux échantillons. Les échantillons sont incubés pendant une heure à 50°C. Ensuite, les échantillons sont incubés 5 minutes à 85°C. Les échantillons sont centrifugés brièvement et sont conservés à -20°C avant d'être utilisés en qPCR. Pendant cette manipulation, des contrôles négatifs sont préparés afin de juger de la qualité de la transcription inverse. Un contrôle «eau» composé uniquement d'eau (12µL) subit la manipulation classique de la transcription inverse, alors qu'un blanc composé d'ARN subit la même manipulation, mais avec un mix dépourvu de transcriptase inverse et remplacée par de l'eau RNase-free.

La qPCR est réalisée avec le SYBR Select Master Mix (Life technologies, #4472908) et l'ADNc dilué 50X. Un mix est préparé pour les différents gènes testés. Les primers forward et reverse sont utilisés à une dilution finale de 300nM (**Tableau 4**). 20 μ L de mix sont déposés dans les puits et 5 μ L d'ADNc dilués y sont ajoutés. On réalise des duplicats techniques pour les différents gènes testés. Lorsque les mix et les ADNc sont déposés dans la plaque, celle-ci est scellée et centrifugée une minute à 800rpm (ThermoIEC, CL3R). La plaque est mise dans la machine Viia 7 (Thermo Fisher Scientific, #4453534). Les résultats sont calculés comme une expression relative d'ARN. Le Δ CT est calculé (Δ CT= CTmean_{gène} cible-CTmean_{gène de ménage}) ainsi que le $\Delta\Delta$ CT(= Δ CT traité condition cible- Δ CT_{condition non-traité}). Finalement, le niveau d'expression d'ARNm est calculé avec la formule 2^{- $\Delta\Delta$ CT</sub>.}

5. <u>Extraction d'ADN et évaluation du nombre de copie d'ADN mitochondrial</u> <u>Méthode</u>

Afin d'évaluer le nombre de copies d'ADN mitochondrial, le Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Ref A120) est utilisé selon le protocole du fournisseur sur les culots secs. Tout d'abord, 600 µL de solution de lyse nucléaire est ajouté sr le culot. Ensuite, 3 µL de RNase sont ajoutés au lysat et incubés pendant 30 minutes à 37°C. 200 µL de tampon de précipitation protéique sont ajoutés sur le lysat. Il est vortexé et gardé sur glace pendant cinq minutes. Puis, le lysat est centrifugé à 13000 g pendant 4 minutes (si le culot n'est pas compact, on recommence cette étape jusqu'à ce qu'il le soit). Le surnageant est récupéré et est déposé dans 600 µL d'isopropanol (Merck Millipore, 1.09634.1000) afin de faire précipiter les protéines. Le mélange est homogénéisé par inversion et subit une centrifugation à 13000 g pendant une minute. Le surnageant est récupéré et mis dans 600 µL d'éthanol 70% (VWR, #84857.360). Une autre centrifugation durant une minute à 13000 g est réalisée. L'éthanol est décanté et le culot est laissé à sécher pendant 15 minutes sous hotte chimique. Finalement, l'ADN est réhydraté dans 100 µL de solution de réhydratation d'ADN à 65°C pendant une heure. A la fin de cette étape, une brève centrifugation est réalisée et l'ADN extrait est quantifié avec un spectrophotomètre nanodrop (Isogen, ND-1000). Les échantillons sont conservés à -20°C avant d'être utilisés.

Le contenu en ADN mitochondrial est évalué par qPCR grâce au gène mitochondrial *MT-ND2* (mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2) et normalisé par rapport au gène nucléaire *BECN1* (becline). Un volume correspondant à 500 ng d'ADN est prélevé et mis dans 15 µL finaux. Cet ADN est dilué 10 X.

Un mix pour les chaque gène testé est composé de 2 μ L d'eau milliQ, 2 μ L de primer forward ainsi que 2 μ L de primer reverse dilués à une concentration de 3 μ M (à partir du stock de primers concentrés à 27 μ M) et de 10 μ L de SYBR Select Master Mix (Life Technologies, Ref 4472908). Par après, 16 μ L de mix sont déposés dans les puits ainsi que 4 μ L d'ADN dilués 10X. Les primers forward et reverse sont donc utilisés à une concentration finale de 300nM (**Tableau 4**) et la qPCR est réalisée avec la machine ViiA7 (Thermo Fisher Scientific). On réalise des duplicats techniques pour les différents gènes testés. Le contrôle négatif «eau» utilisé est constitué de 16 μ L des différents mix et de 4 μ L d'eau milliQ. Lorsque les mix et l'ADN sont déposés dans la plaque, celle-ci est scellée et centrifugée une minute à 800 rpm. La plaque est mise dans la machine Viia 7. Finalement, le gène cible est normalisé par rapport au gène contrôle *BECN1*. Ensuite les Δ CT sont calculés comme décrit ci-dessus et le nombre de copie d'ADN mitochondrial est estimé avec la formule 2*2^{- Δ CT} (données obtenues précédemment au sein du laboratoire, thèse PhD d'A.Wanet) et représente les valeurs absolues des réplicats (Wanet et al, 2014).

6. Transfection des cellules Hep3B

Méthode

Le tampon siARN 5X est dilué dans le volume adéquat d'eau RNase free afin d'obtenir du tampon siARN 1X. Ensuite, le siARN reçu est resuspendu dans le volume adéquat de tampon de siARN 1X afin d'obtenir une concentration stock de 20µM. Par après, le siARN est aliquoté et conservé à -20°C avant son utilisation. Les cellules Hep3B sont ensemencées en plaque six puits à une densité cellulaire de 16000 cellules/cm². Le lendemain, les cellules sont soit non-transfectées (NT), soit transfectées avec un siARN qui ne cible aucun ARNm (siNT, Dharmacon, D-001810-10-20) ou avec un siARN qui cible l'ARNm de MTHFD2 (siMTHFD2, Dharmacon, J-009349-12). Pour ce faire, deux tubes sont préparés pour chaque condition. Dans un tube, le volume adéquat de siNT ou de siMTHFD2 sont ajoutés à 997,5µL de milieu Opti-MEM pour obtenir une concentration de 50nM. Dans l'autre tube, 10µL d'agent transfectant DharmaFECT (Dharmacon, T-2001-03) est ajouté à 990 µL de milieu Opti-MEM (Life technologies, 31985-047). Puis, après avoir préparé les deux tubes pour chaque condition, on attend cinq minutes à température ambiante. Ensuite, les contenus des deux tubes sont rassemblés dans un seul et les deux tubes sont laissés à température ambiante pendant 20 minutes afin de laisser les complexes se former. Par après, le volume approprié de milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF est additionné au milieu contenant l'agent transfectant, l'Opti-MEM et le siARN. Les siARN sont donc utilisés à une concentration finale de 10 nM. Enfin, le milieu des cellules est décanté pour rajouter du milieu frais pour les cellules non-transfectées ou du milieu complet contenant le siNT ou le siMTHFD2 aux cellules correspondantes. Après deux jours d'incubation, des culots secs sont préparés et seront extraits avec un tampon de lyse de type RIPA (voir extraction protéique RIPA).

7. <u>Supplémentations des cellules Hep3B transduites et évaluation de la</u> prolifération cellulaire

CyQUANT Cell Proliferation Assay

Principe

Le test CyQUANT permet de déterminer la densité cellulaire en culture. Cette technique permet de réaliser des tests de prolifération.

Contrairement au test MTT qui repose sur l'activité métabolique en permettant la conversion du sel de tétrazolium en un composé chromogène nommé formazan, le CyQUANT est plus rapide et permet de ne pas se baser sur l'activité métabolique des cellules. Cette technique est réalisée grâce à une sonde fluorescente verte qui possède une forte fluorescence lorsqu'elle est liée aux acides nucléiques. Les cellules sont d'abord lysées et la sonde peut être ajoutée pour évaluer directement la fluorescence.

Méthode

Lorsque les cellules Hep3B sont transduites, les cellules NT, shNT et shMPV17 sont ensemencées à une densité de 667 cellules/cm². Les cellules sont mises en culture dans du milieu RPMI avec 1% SVF contenant du milieu RPMI supplémenté avec 1mM ou 5mM de formate (Sigma, #71539-500G). Les conditions contrôles sont constituées de milieu RPMI avec 1% de SVF. Après quatre jours de prolifération, les cellules sont rincées avec du PBS et conservées à -80°C avant de les utiliser lors du CyQUANT assay (Life technologies, #C7026).

500µL de tampon de lyse avec RNase 1X (180mM NaCl, 1mM EDTA, 0,02mg/L RNase, tampon de lyse 1X) sont déposés dans chaque puits pendant 1h à température ambiante à 400 rpm. Puis, les amas de cellules sont dissociés en pipettant (10 up and down). La sonde fluorescente est diluée 100X et préparée dans du tampon de lyse sans RNase, NaCl et EDTA. Dans une plaque multipuits NUNC, 35μ L de lysat sont déposés avec 165μ L de sonde. En parallèle, une courbe d'étalonnage est réalisée. L'ADN standard est dilué à une concentration de 1µg/mL dans du tampon de lyse avec RNase. Ensuite, 100μ L de tampon avec RNase sont déposés dans les puits avec le volume adéquat de tampon de lyse sans RNase ainsi que le volume d'ADN standard dilué à 1µg/mL correspondant à une concentration finale de 0, 10, 50, 100, 250, 500 ng/mL. Finalement, la plaque est placée dans un fluorimètre (Thermo Fisher Scientific #5210470) et est lue à une excitation de 485nm et une émission de 520nm. Les mesures sont lues deux fois.

Résultats et discussion



<u>Figure 22</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance protéique de Mpv17. Les cellules Hep3B ont été soit, non-transduites (NT) ou transduites avec un shARN non-target (shNT) ou un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17) L'abondance de Mpv17 a été normalisée par l'abondance de la tubuline. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01) significativement différent par rapport au shNT.

Nombre de copies d'ADNmt dans les cellules Hep3B



<u>Figure 23:</u> Effet du silençage de MPV17 sur le nombre de copies d'ADN mitochondrial (ADNmt) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été non-transduites (NT) ou transduites avec un shARN non-target (shNT) ou un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17), ou dans des cellules non-transduites (NT). Le nombre de copies d'ADNmt par cellule a été déterminé par qPCR sur le gène *MT-ND2* (NADH-ubiquinone oxidorectase chain 2) encodé par le génome mitochondrial normalisé par rapport au gène nucléaire *BECN1* (Beclin-1). Les résultats représentent la moyenne des 4 réplicats indépendants \pm SD. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent des shNT.



<u>Figure 24:</u> (A) Abondance relative d'ADNmt de MPV17 dans des fibroblastes prolifératifs ou quiescents provenant de patients mutés pour MPV17 (P1-P5) ou de patients « contrôles » (C1-C2). La quantité d'ADNmt est exprimée en valeurs relative à la moyenne des contrôles. (B) Nombre de copies d'ADNmt dans les fibroblastes quiescents contrôles et MPV17-déficients. Les données sont exprimées comme des moyennes \pm SEM de n=8 (Test de T-student : *** P<0,001) (Dalla-Rosa et al., 2016).

IV. Résultats et discussion

1. Effet du silençage de MPV17 sur le nombre de copies d'ADN mitochondrial

Etant donné que la mutation du gène *MPV17* chez les humains et le KO de *MPV17* chez les souris induisent des MDDS, nous avons d'abord analysé l'effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance de l'ADNmt. Les cellules Hep3B étaient soit non-transduites (NT), ou transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou bien avec un shARN ciblant *MPV17* (shMPV17) et l'abondance de l'ADNmt a été mesurée par qPCR en ciblant un gène mitochondrial qui est *MT-ND2* et un gène nucléaire qui est la *BECN1* (Becline). L'efficacité du silençage de *MPV17* a été évaluée à 83% au niveau protéique (Figure 22).

Le nombre de copies d'ADNmt est diminué significativement, de 12%, dans les cellules silencées pour MPV17, par comparaison avec les cellules transduites avec le shNT (**Figure 23**), suggérant que Mpv17 contribue modérément au maintien de l'ADNmt. Ce résultat peut sembler contradictoire avec les données publiées par Dalla Rosa et son équipe (Dalla Rosa et al., 2016), qui ont montré que la diminution d'ADNmt dans les fibroblastes humains déficients pour Mpv17 n'était significative que lorsque les fibroblastes étaient quiescents. Cependant, un examen attentif de ces données montre que parmi les lignées fibroblastiques dérivées de 5 patients souffrant de MDDS, certaines montrent une diminution du contenu en ADNmt de l'ordre de 10% (**figure 24**) (Dalla Rosa et al., 2016), mais cette diminution n'atteint pas le seuil de significativité. Outre le fait que notre analyse concerne des cellules cancéreuses humaines silencées pour MPV17 et non des fibroblastes humains normaux mutés pour MPV17, les résultats que nous avons obtenus ne sont donc pas en totale contradiction avec cette publication.

Rappelons également que des hépatocytes de souris *MPV17^{-/-}* présentant une déplétion sévère de l'ADNmt (96%) ne présentent pas de phénotype particulier, à l'exception d'une déficience hépatique lors d'un régime cétogène (Viscomi et al., 2009). On peut donc s'interroger, au-delà de l'aspect statistique, sur la pertinence biologique d'une diminution de 12% du contenu en ADN dans les cellules Hep3B silencées pour *MPV17*. Afin de savoir si ce résultat est pertinent au niveau biologique et pourrait expliquer la moindre prolifération des cellules shMPV17, un test de respirométrie pourrait être réalisé sur les cellules transduites avec shMPV17 ou shNT. Ceci permettrait également d'évaluer une conséquence fonctionnelle d'une éventuelle modification de la mitochondrie indépendante de l'abondance de l'ADNmt. S'il s'avère que les cellules shMPV17 possèdent une moindre activité respiratoire, l'expression des 13 gènes de l'ADNmt encodant les protéines impliquées dans les OXPHOS sera évaluée au niveau transcrit et protéique. A l'inverse, si les cellules silencées pour *MPV17* ne montrent pas de diminution de la respiration cellulaire basale ni de la capacité respiratoire de réserve, cela suggère que le rôle de Mpv17 dans la prolifération des cellules Hep3B fait intervenir des mécanismes qui ne dépendent pas des OXPHOS.



Figure 25: Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de la protéine Mnk1 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT) soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abundance de MNK1 été évalué par Western Blot sur 5 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification des Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la protéine Mnk1 a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules non-transduites. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants ± SD. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent des shNT.



Figure 26:Effet du silençage de MPV17 sur la phosphorylation de la protéine eIF4E (Ser209) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT) soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) La phosphorylation d'eIF4E a été évaluée par Western Blot dans trois réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la forme phosphorylée de eIF4E a été normalisée par rapport à l'abondancce de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules tranduites avec le shNT. Le test statistique réalisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants ± SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 25:</u> Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de la protéine Mnk1 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT) soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abundance de MNK1 été évalué par Western Blot sur 5 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification des Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la protéine Mnk1 a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules non-transduites. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent des shNT.



<u>Figure 26:</u>Effet du silençage de MPV17 sur la phosphorylation de la protéine eIF4E (Ser209) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT) soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) La phosphorylation d'eIF4E a été évaluée par Western Blot dans trois réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline est utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la forme phosphorylée de eIF4E a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules tranduites avec le shNT. Le test statistique réalisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif).

Enfin, il n'est pas impossible que la réduction protéique de Mpv17 affecte la mitochondrie indépendamment du maintien de l'ADNmt car il a été montré que Sym1 et la protéine Mpv17 murine participeraient à la morphogénèse des crêtes mitochondriales (Dallabona et al., 2010). Si la protéine humaine Mpv17 joue un rôle similaire, il serait intéressant d'investiguer l'architecture des crêtes mitochondriales. Cependant, le rôle morphogénétique de Sym1 et Mpv17 murin a uniquement été mis en évidence lors d'une délétion du gène SYM1 ou MPV17 respectivement. Etant donné que l'ADNmt, contenu dans le nucléoïde, est associé à la membrane mitochondriale interne, cela pourrait signifier que les délétions de Mpv17 pourraient résulter en une sévère déplétion suite à son rôle morphogénétique non-rempli. De plus, les mutations de Mpv17 pourraient inhiber cette action et mener à des déplétions par ce mécanisme. Néanmoins, on pourrait supposer que lors du silencage de Mpv17 dans les cellules Hep3B, assez de protéines sont présentes et permettraient une morphogénèse des crêtes qui est suffisante, mais qui impacterait légèrement l'abondance de l'ADNmt, ce qui pourrait peut-être expliquer la faible déplétion d'ADNmt dans ces cellules. Cela revient à poser la question si les déplétions d'ADNmt causées par des mutations ou des délétions de MPV17 sont dépendantes ou non de sa fonction morphogénétique.

2. Effet du silençage de MPV17 sur des acteurs traductionnels

2.1. La protéine Mnk1

Sur base de nos résultats RPPA (voir point 3. de l'introduction), nous avons sélectionné Pdcd4 et Mnk1 comme candidats putatifs pouvant jouer un rôle lors du silençage de *MPV17* sur le taux de prolifération cellulaire. L'abondance protéique de Pdcd4 et Mnk1 a été évaluée par Western Blot dans les cellules Hep3B. La **figure 25** montre une forte réduction (50%) significative de l'abondance de Mnk1 dans les cellules transduites avec shMPV17 par rapport au shNT, ce qui confirme les résultats de RPPA. Notons aussi que la réduction de l'abondance protéique de Mnk1 a été montrée dans des cellules Huh7 transduites avec shMPV17 (données non-montrées). De plus, le niveau de l'ARNm de *MNK1* diminue aussi dans les cellules Hep3B transduites avec shMPV17 comparées aux cellules shNT (données non montrées). Ainsi donc, la réduction protéique de Mnk1 lors du silençage de *MPV17* pourrait limiter la prolifération en réduisant la phosphorylation d'eIF4E.

Cependant, une diminution de l'abondance d'une kinase ne signifie pas nécessairement que l'activité de l'enzyme est réduite. Par conséquent, l'activité de Mnk1 dans les cellules Hep3B silencées pour *MPV17* a été recherchée indirectement en évaluant l'abondance de la forme phosphorylée d'eIF4E qui est une des cibles de Mnk1.

La **figure 26** montre une diminution de l'abondance de la forme phosphorylée d'eIF4E dans les cellules transduites avec shMPV17 comparées aux cellules transduites avec shNT, bien que cette réduction ne soit pas significative à cause d'une grande variabilité entre les cinq réplicats indépendants. Par conséquent, des réplicats additionnels seront testés afin d'atteindre potentiellement le seuil de significativité. Si cela est confirmé, une réduction de l'état de phosphorylation d'eIF4E dans les cellules silencées pour *MPV17* signifierait une plus faible traduction de certains ARNm spécifiques participant à la prolifération (c-Myc, Cycline D1).



<u>Figure 27</u>: Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de la protéine 4E-BP1 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). L'abondance de 4E-BP1 a été évaluée par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. La bande supérieure est considérée comme la protéine 4E-BP1 hyperphosphorylée (isoforme γ), la bande intermédiaire est la protéine qui est phosphorylée de manière intermédiaire (isoforme β) et la plus basse est la forme hypophosphorylée de 4E-BP1(isoforme α).

Comme expliqué au point 4.1. de l'introduction, l'activité de eIF4E est non seulement influencée par son niveau de phosphorylation, mais également par son degré d'interaction avec 4E-BP1. Pour rappel, 4E-BP1 hypophosphorylée séquestre eIF4E, exerçant donc un effet inhibiteur sur la traduction. Au contraire, une hyperphosphorylation de 4E-BP1 diminue son affinité pour eIF4E.

Afin d'évaluer indirectement la disponibilité d'eIF4E dans le cytosol, le statut de phosphorylation de 4E-BP1 a été évalué. Les cellules transduites avec shMPV17 ne présentent pas de modification du niveau de phosphorylation de 4E-BP1 (**Fig 27**), suggérant que la séquestration d'eIF4E n'est pas modifiée. Ce résultat signifierait qu'une quantité identique de protéine eIF4E est libérée dans les cellules shMPV17 par rapport aux cellules transduites avec le shNT. De plus, l'export de certains ARNm pro-malins tels que les cyclines B1, D1 ou l'ODC devrait être identique comparé aux cellules transduites avec le shNT. Néanmoins, une quantification directe de l'abondance de la protéine eIF4E serait nécessaire pour corréler cela avec le statut de phosphorylation de 4E-BP1.

En résumé, le silençage de *MPV17* n'affecte pas la disponibilité de eIF4E, contrôlée par la phosphorylation de 4E-BP1. Par contre, le niveau de phosphorylation de eIF4E semble diminuer dans les cellules silencées pour *MPV17*, bien que de manière non significative. Si cette diminution se confirme par l'analyse de réplicats supplémentaires, cela suggère une diminution de la traduction de certains ARNm. Il faut toutefois mentionner qu'un élément d'analyse manque encore pour compléter le tableau, à savoir une quantification directe de l'abondance totale de la protéine eIF4E. En effet, ce n'est que si l'abondance globale de eIF4E est comparable dans les cellules transduites avec le shMPV17 et le shNT que nous pourrons conclure à une diminution de l'activité de Mnk1, associée à une diminution d'abondance de la kinase.

Néanmoins, Mnk1 possède d'autres substrats qui n'ont pas été investigué dans cette étude. Il s'agit de heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1), cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), Sprouty et polypyrimidine tract-binding protein-associated factor (PSF) (Joshi & Platanias, 2014).

Les hnRNP sont des protéines impliquées dans la stabilité de l'ARNm et/ou dans l'épissage (Geuens et al., 2016). PSF est aussi une protéine régulant l'épissage de l'ARNm et aussi la traduction protéique (Yarosh et al., 2015). Par conséquent, il serait intéressant de tester le niveau de phosphorylation de PSF et hnRNPA1. En fonction des résultats obtenus, les substrats de ces protéines qui auraient un lien avec la prolifération cellulaire pourrait être investiguer. Par exemple, la protéine hnRNPA1 régule la dégradation d'I κ B α (Sahu et al., 2014) permettant la libération de NF κ B. Ce dernier est un acteur possédant beaucoup de fonctions au sein de la cellule telles que la survie, la différenciation, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Il a été montré que la surexpression d'I κ B α (un répresseur de NF κ B) peut altérer la prolifération de cellules HeLa à cause d'un retard dans la transition G1/S (Kaltschmidt et al., 1999), alors que des souris déficientes pour I κ B α montraient une prolifération augmentée de la glande mammaire. Ainsi, il serait intéressant de contrôler ces protéines au sein de cellules transduites avec shMPV17.



<u>Figure 28:</u> Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de la protéine Pdcd4 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de PDCD4 a été évalué par Western Blot dans 5 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge (B) Quantification des Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la protéine Pdcd4 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Les test statistiques utilisé sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. * (p<0.05) significativement différent des shNT.



<u>Figure 29:</u> Effet du silençage de MPV17 sur la phosphorylation de la protéine p70S6K (Thr389) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit transduites avec un shARN non-target (shNT), ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de la phosphorylation de p70S6K a été évalué par Western Blot dans 5 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la forme phosphorylée de p70S6K a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec un shARN non-cible. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 28:</u> Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de la protéine Pdcd4 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de PDCD4 a été évalué par Western Blot dans 5 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge (B) Quantification des Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la protéine Pdcd4 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Les test statistiques utilisé sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. * (p<0.05) significativement différent des shNT.



<u>Figure 29</u>: Effet du silençage de MPV17 sur la phosphorylation de la protéine p70S6K (Thr389) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit transduites avec un shARN non-target (shNT), ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de la phosphorylation de p70S6K a été évalué par Western Blot dans 5 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : l'abondance de la forme phosphorylée de p70S6K a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec un shARN non-cible. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif).

2.2. La protéine Pdcd4

Concernant le second acteur traductionnel qui a été mis en évidence par l'analyse RPPA, Pdcd4, nous avons tout d'abord voulu évaluer son abondance dans les cellules Hep3B silencées ou non pour *MPV17*. La **figure 28** montre une réduction protéique significative de Pdcd4 (38%) lorsque l'on compare les cellules transduites avec shNT et shMPV17, ce qui confirme les résultats RPPA. Notons aussi que la réduction de l'abondance protéique de Pdcd4 a été montré dans des cellules Huh7 transduites avec shMPV17 (données non-montrées). En plus, l'abondance de l'ARNm de *PDCD4* est aussi réduite dans cette condition (données non montrées). Cette donnée est logique avec la littérature qui décrit que cette protéine est fréquemment downrégulée dans les hépatomes (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009).

La signification biologique de la downrégulation de Pdcd4 dans les cellules silencées pour *MPV17* reste encore à établir. En effet, la downrégulation de Pdcd4 a été décrite comme permettant la traduction de certains ARNm tel que p53 dans les cellules HeLa (Wedeken et al., 2011) qui permet une augmentation de la protéine p21 (Bitomsky et al., 2008) menant à un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, dans les cellules Hep3B, on n'observe pas d'expression de p53 fonctionnelle à cause d'une délétion homozygote s'étendant depuis l'exon 7 jusqu'à l'exon 11 du gène *TP53* (Vona et al., 2000), ce qui mène à une protéine non-fonctionnelle. Ainsi, les gènes cibles de p53 tels que p21 ne sont pas exprimés, mais d'autres ARNm impliqués dans la régulation de la prolifération comme c-Myb ou a-Myb pourraient ne plus être réprimés suite à la diminution de l'abondance protéique de Pdcd4. Par conséquent, ils pourraient être davantage exprimés, ce qui serait contradictoire avec le phénotype de diminution de prolifération.

Afin de déterminer quel acteur pourrait expliquer la réduction protéique de Pdcd4, les p70S6Ks ont été investiguées. Les S6K sont activées lors de stimuli comme des mitogènes. Cela permet la phosphorylation de 4 résidus sérines (S411, S418, S421 et S424), ce qui permet d'exposer la Thr389 qui est phosphorylée par mTORC1 (Tavares et al., 2015). Les S6Ks permettent différents processus cellulaires dont la synthèse protéique (Tavares et al., 2015).

Vu que les p70S6K1 peuvent phosphoryler PDCD4 ce qui conduit à sa dégradation dépendant du protéasome (Dorrello et al., 2006). Il était intéressant de contrôler l'abondance de la forme phosphorylée de cette protéine. La **figure 29** montre qu'il n'y a pas de changements significatifs de la phosphorylation de p70S6K (Thr389) entre les deux conditions, malgré une tendance à l'augmentation chez des cellules transduites avec shMPV17. Des réplicats supplémentaires devraient être analysés pour déterminer si cette tendance devient significative, auquel cas l'activation de p70S6K pourrait expliquer la dégradation de Pdc44 dans les cellules Hep3B. Il faut toutefois mentionner qu'un élément d'analyse manque encore pour compléter le tableau, à savoir une quantification directe de l'abondance totale de la protéine p70S6K. En effet, si l'abondance globale de la protéine p70S6K est réduite dans les cellules transduites avec le shMPV17 par rapport au shNT, nous pourrons conclure qu'il existe une augmentation du niveau de phosphorylation de p70S6K dans les cellules shMPV17, associée à la diminution de l'abondance protéique de Pdc44.



<u>Figure 30</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance protéique et du transcrit d'ATF4 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance d'ATF4 a été évaluée par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : l'abondance protéique d'ATF4 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT.



<u>Figure 31:</u>Effet du silençage de *MPV17* sur la phosphorylation de la protéine eIF2 α (Ser 51) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été transduites avec un shARN contrôle (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de la phosphorylation d'eIF2 α a été évalué par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubiline a été utilisé comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : la phosphorylationde eIF2 α a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubiline et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec un shNT. Le test utilisé est un T-test non-pairé. Les résults représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants ± SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 32</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur la phosphorylation de la protéine mTOR (Ser2448) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) La phosphorylation de mTOR a été évalué par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification de la phosphorylation de la protéine mTOR. L'abondance de la forme phosphorylée de mTOR a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec shNT. Le test utilisé est un T-test non-pairé. Les résulats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (nonsignificatif).



<u>Figure 30</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance protéique et du transcrit d'ATF4 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance d'ATF4 a été évaluée par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A): l'abondance protéique d'ATF4 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.01), significativement différent par rapport au shNT.



<u>Figure 31:</u>Effet du silençage de *MPV17* sur la phosphorylation de la protéine eIF2 α (Ser 51) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été transduites avec un shARN contrôle (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de la phosphorylation d'eIF2 α a été évalué par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubiline a été utilisé comme contrôle de charge. (B) Quantification du Western Blot présenté en (A) : la phosphorylation de eIF2 α a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubiline et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec un shNT. Le test utilisé est un T-test non-pairé. Les résulats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants ± SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 32:</u> Effet du silençage de *MPV17* sur la phosphorylation de la protéine mTOR (Ser2448) dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) La phosphorylation de mTOR a été évalué par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification de la phosphorylation de la protéine mTOR. L'abondance de la forme phosphorylée de mTOR a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage des cellules transduites avec shNT. Le test utilisé est un T-test non-pairé. Les résulats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (nonsignificatif).

3. Effet du silençage de MPV17 sur ATF4 et les gènes-cibles d'ATF4

3.1. Expression d'ATF4 et niveau protéique

Il a été démontré que mTORC1 pouvait réguler ATF4, un régulateur transcriptionnel du gène MTHFD2, codant pour une enzyme clef de la synthèse du formate qui alimente la biosynthèse de purines. En effet, lors d'une utilisation de fibroblastes embryonnaires murins Wild type (WT) traités avec de l'insuline ou des fibroblastes embryonnaires murins délétés pour Tuberous sclerosis 2 (TSC2-/-), Ben-sahra et al. observaient une forte induction de l'expression du gène MTHFD2. Cela était corrélé avec une plus grande incorporation de glycine marquée radioactivement (¹⁴C glycine) dans la voie de synthèse de novo des purines (Ben-Sahra et al., 2016). De plus, lors de l'utilisation d'inhibiteurs de mTORC1 (Torin et rapamycine), une diminution de l'expression de MTHFD2 est observée. Par après, ils ont analysé l'impact d'une réduction de l'abondance protéique de certains facteurs de transcription régulés par mTORC1. Seule la déplétion de l'abondance protéique d'ATF4 permettait d'observer une moindre expression ainsi qu'une moindre abondance protéique de MTHFD2 (Ben-Sahra et al., 2016). Ce gène encode une enzyme clef dans la synthèse du formate utilisé lors de la biosynthèse de purines. Etant donné que Mpv17 pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des nucléotides (Dalla Rosa et al., 2016), voir point 2.2. de l'introduction), il nous a semblé intéressant d'investiguer le niveau protéique d'ATF4 chez les cellules shMPV17.

Les **figures 30 A et B** montrent une diminution significative du niveau protéique d'ATF4 (60%) dans les cellules shMPV17.

Dans des situations de stress, l'abondance de la protéine ATF4 est fréquemment régulée par le biais d'une augmentation de la traduction de son ARNm, suite à une phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction $eIF2\alpha$ (voir introduction point 5.1.). Nous avons donc évalué le niveau de phosphorylation d'eIF2a par Western Blot. La figure 31 montre que le niveau de phosphorylation d'eIF2a n'est pas modifié en réponse au silençage de MPV17. La réduction protéique d'ATF4 ne peut pas être expliquée par une diminution de PeIF2a ce qui suggère qu'un autre mécanisme inconnu est à l'œuvre. Etant donné qu'il a été démontré que mTORC1 peut contrôler l'abondance protéique d'ATF4 par un mécanisme indépendant de PeIF2a encore inconnu, l'activité de mTORC1 a été évaluée dans les cellules shMPV17. C'est d'ailleurs la voie de transduction qui a été mise en évidence dans la publication de Ben-Sahra lors d'une stimulation de fibroblastes murins avec de l'insuline ou lors d'une délétion de TSC2^{-/-} (Ben-Sahra et al., 2016). La figure 32 montre l'activité de mTORC1 (évalué par la phosphorylation de la sérine 2448) qui est non-modifiée dans les cellules shMPV17. Cela signifierait que la réduction d'ATF4 n'est pas médiée par une modification de l'activité de mTORC1. De plus, ce résultat serait cohérent avec le niveau protéique inchangé de Pp70S6K et le niveau de phosphorylation de 4E-BP1. En effet, mTORC1 n'est pas hyper- ou hypoactivé, ce qui est reflété par le niveau de phosphorylation de ces cibles en aval tels que p70S6K et 4E-BP1.

Comme la diminution d'abondance de ATF4 dans les cellules silencées pour MPV17 ne peut pas s'expliquer par le mécanisme classique dépendant du niveau de phosphorylation de eIF2a, nous avons analysé l'abondance du transcrit d'ATF4.

Niveau d'expression de l'ARNm d'ATF4 dans les cellules Hep3B



<u>Figure 33:</u> Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance du transcrit d'ATF4 dans les cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm d'ATF4 a été évalué par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants. L'abondance de l'ARNm d'ATF4 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT.

Niveau d'expression de l'ARNm d'ATF5 dans les cellules Hep3B



<u>Figure 34:</u>Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance du transcrit d'ATF5 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm d'ATF5 a été évalué par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 35:</u> Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance des transcrits de gènes marqueurs de l'ISR. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de DDIT3 (A), ATF3 (B), HERP (C) et TRIB3 (D) a été évalué par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants \pm SD. NS (nonsignificatif) par rapport au shNT. Afin de déterminer si la réduction de l'abondance protéique d'ATF4 est corrélée à une réduction du niveau de l'ARNm d'ATF4, une RT-qPCR a été réalisée. Le niveau de l'expression de l'ARNm n'est pas modifié de manière significative dans les trois conditions expérimentales (**Fig 33**), bien qu'on observe une tendance à la baisse dans les cellules silencées pour MPV17.

A ce niveau, aucune des pistes suivies autant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionel ne peut expliquer la diminution de l'abondance de la protéine ATF4 dans les cellules Hep3B. Néanmoins, d'autres modifications d'ATF4 permettraient d'expliquer la réduction du niveau protéique d'ATF4. Par exemple, cette protéine pourrait être moins stabilisée par la p300 et ou PCAF suite à une réduction protéique de cette même protéine, ce qui conduirait à une plus grande dégradation d'ATF4 par le protéasome via l'ubiquitine ligase β TrCP (Lassot et al., 2005; Lassot et al., 2001). D'autres travaux ont montré qu'il existait un mécanisme indépendant du senseur GCN2 et de la protéine eIF2 α , mais qui converge vers la traduction CAP-indépendante d'ATF4 lors d'une déprivation d'acides aminés essentiel (His, Arg et Met) sur des fibroblastes embryonnaires murins *GCN2^{-/-}* ou possédant une protéine eIF2 α non-phosphorylable sur le résidu Ser51 (eIF2 $\alpha^{A/A}$) (Mazor & Stipanuk, 2016). Dans notre cas, ce type de mécanisme pourrait expliquer la diminution du niveau protéique d'ATF4.

Il a été décrit qu'ATF5 pouvait remplacer ATF4 et donc réguler certains gènes cibles d'ATF4 (Dogan et al., 2014; Tyynismaa et al., 2010). Par conséquent, nous avons évalué par RT-qPCR le niveau d'expression de son ARNm (**Fig 34**). Comme nous pouvons l'observer, il n'y a pas de diminution significative de l'abondance du transcrit d'ATF5. Cela signifie deux choses : premièrement, suite à ce résultat, nous pouvons nous concentrer sur la réduction protéique d'ATF4. D'autre part, lors de l'analyse de l'expression de certains gènes régulés par ATF4, nous devrons prendre en compte cette donnée. Si nous n'observons pas de variation du niveau d'expression de certains gènes, cela pourrait être dû à un effet compensatoire dû à ATF5.

3.2. Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes participant à l'ISR

Vu qu'ATF4 est connu pour son rôle dans l'ISR, (integrated stress response : voir point de 5.1. de l'introduction et la **figure 12** de l'introduction) et que celle-ci peut être déclenchée par un dysfonctionnement mitochondrial (Michel et al., 2015), nous avons évalué par RT-qPCR le niveau d'expression de certains gènes cibles qui sont *DDIT3* (*CHOP10*), *HERP*, *ATF3* et *TRIB3* (**Fig 35**). On peut observer qu'il n'y a aucune différence significative de l'expression de ces quatre gènes lorsque l'on compare les cellules transduites avec un shARN contrôle et celles transduites avec shMPV17. Cela est surprenant pour le niveau d'expression de DDIT3 (**Fig 35A**) car il s'agit d'un gène directement régulé par ATF4.

De plus, alors que le niveau d'expression d'ATF3 entre les cellules shNT et shMPV17 (**Fig 35B**) n'est pas non plus modifié, nous observons une claire tendance à la baisse dans les cellules silencées pour MPV17 en ce qui concerne le niveau d'expression des ARNm de *HERP* et *TRIB3* (**Figure 35C et D**) entre les cellules shNT et shMPV17, bien que celle-ci soit non-significative. Ce gène étant régulé par le dimère ATF4-DDIT3 (Bi et al., 2015; Han et al., 2013; S. Wang et al., 2015), nous nous attendions à une expression plus faible de ceux-ci



<u>Figure 36:</u> Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance protéique et du transcrit et de la protéine MTHFD2 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de l'ARNm de MTHFD2 a été évalué par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm de MTHFD2 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif). (B) L'abondance protéique de MTHFD2 a été évaluée par Western Blot. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contôle de charge. (C) Quantification du Western Blot présenté en (B) : l'abondance protéique de MTHFD2 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT.



<u>Figure 37:</u> Confirmation de l'identité de la bande correspondante à MTHFD2 dans lles Western Blots réalisés sur les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17), soit transfectées avec un siARN ciblant MTHFD2 (siMTHFD2) ou transfectées avec un siARN sans cible (siNT) ou laissée nontransfectées (NT). L'abondance protéique de MTHFD2 a été évaluée par Western Blot. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.



<u>Figure 38:</u> Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance des transcrits de gènes impliqués dans la voie métabolique mitochondriale du THF. Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de SHMT2 (A) et MTHFD1L (B) a été évaluée par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p-value<0.0001) significativement différent par rapport au shNT.


<u>Figure 36:</u> Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance protéique et du transcrit et de la protéine MTHFD2 dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de l'ARNm de MTHFD2 a été évalué par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm de MTHFD2 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 5 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif). (B) L'abondance protéique de MTHFD2 a été évaluée par Western Blot. L'abondance de l'actine a été utilisée comme contôle de charge. (C) Quantification du Western Blot présenté en (B) : l'abondance protéique de MTHFD2 a été normalisée par rapport à l'abondance de l'actine et exprimée comme un pourcentage de cellules non-transduites. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants± SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT.



<u>Figure 37:</u> Confirmation de l'identité de la bande correspondante à MTHFD2 dans lles Western Blots réalisés sur les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont été soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17), soit transfectées avec un siARN ciblant MTHFD2 (siMTHFD2) ou transfectées avec un siARN sans cible (siNT) ou laissée nontransfectées (NT). L'abondance protéique de MTHFD2 a été évaluée par Western Blot. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.



<u>Figure 38:</u> Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance des transcrits de gènes impliqués dans la voie métabolique mitochondriale du THF. Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de SHMT2 (A) et MTHFD1L (B) a été évaluée par RT-qPCR dans 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), **** (p-value<0.0001) significativement différent par rapport au shNT.

au sein des cellules silencées pour *MPV17*, ce qui aurait suggéré une moindre capacité à restaurer la protéostase dans le cas d'un stress induisant l'ISR.

3.3. <u>Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqués dans le métabolisme</u> <u>des nucléotides</u>

Etant donné qu'une réduction de l'abondance protéique d'ATF4 a été observée, nous avons évalué le niveau d'expression d'une de ces cibles qui est directement impliquée dans la la voie du tétrahydrofolate, et donc la synthèse des nucléotides, *MTHFD2* (Ben-Sahra et al., 2016; S. Wang et al., 2015). On peut observer une diminution significative de 28% de l'expression de l'ARNm de *MTHFD2* (**Fig 36A**), ainsi que de son niveau protéique dans les cellules shMPV17 (43%) comparées aux cellules shNT (**Fig 36B et C**). Ainsi, la réduction de l'expression de *MTHFD2* dans les cellules shMPV17 peut être corrélée avec la réduction de l'abondance de la protéine ATF4 dans ces cellules.

Nous avons donc considéré qu'une diminution protéique de MTHFD2, qui suggère une moindre synthèse nucléotidique, représentait un bon candidat pour expliquer la diminution de la prolifération cellulaire dans les cellules Hep3B silencées pour MPV17. Cependant, avant de poursuivre, nous avons voulu confirmer que la bande pointée dans le Western Blot de la **figure 36** correspondait bien à MTHFD2, car l'anticorps utilisé révèle plusieurs bandes, tant dans les cellules Hep3B que dans les cellules Huh7 (résultats non montrés de M. Canonne). Pour ce faire, une transfection de cellules Hep3B a été réalisée avec un siRNA dirigé contre MTHFD2, les protéines des cellules transfectées ont été extraites et analysées par Western Blot aux côtés de protéines extraites de cellules shNT et shMPV17. On peut observer un moindre signal au niveau de la condition siMTHFD2 (à 38 kDa) (**Figure 37**). Cela permet de confirmer que la bande quantifiée auparavant (voir **Figure 36**) correspond bien à MTHFD2.

De plus, d'autres acteurs de la voie du mTHF, également régulés par ATF4 (S. Wang et al., 2015) ont été analysés : il s'agit de SHMT2 et MTHFD1L. SHMT1 et SHMT2 agissent en amont de la voie du mTHF et catalysent la même réaction, mais dans des compartiments différents : SHMT1 est localisée dans le cytosol alors que SHMT2 et MTHFD1L sont actives dans la mitochondrie. On peut observer à la **figure 38**, une réduction significative de l'abondance de l'ARNm de SHMT2 (48%) dans les cellules silencées pour *MPV17* (**Fig 38A**, contrairement à l'ARNm de MTHFD1L (**Fig 38B**). La réduction d'abondance de l'ARNm de *SHMT1* et *SHMT2* peut être corrélée par la réduction du niveau protéique d'ATF4.

A Niveau d'expression de l'ARNm de SHMT1 dans les cellules Hep3B

B Niveau d'expression de l'ARNm de MTHFD1 dans les cellules Hep3B





<u>Figure 39</u>: Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance de transcrits de de gènes impliqués dans la voie cytosolique mitochondriale du THF dans les cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de SHMT1 (A) et MTHFD1 (B) a été évaluée par RT-qPCR dans 4 ou 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif).



<u>Figure 40:</u> Effet de la supplémentation en formate sur la prolifération des cellules Hep3B. Les cellules Hep3B ont soit été nontransduites (NT), soit transduites avec un shARN non-target (shNT) ou avec un shARN dirigé contre MPV17 (shMPV17). Les cellules ont été incubées dans 1% SVF (CTL) supplémenté avec 1mM ou 5mM de formate. La prolifération des cellules a été évaluée après 96 heures de prolifération avec le kit CyQUANT. Les résultats représentent les valeurs absolues obtenue sur un réplicat.



En outre, le niveau de l'expression de l'ARNm de SHMT1 et MTHFD1, qui n'ont pas été montrées comme étant régulées par ATF4, a aussi été analysé. SHMT1 et MTHFD1 sont des protéines cytosoliques aussi impliquées dans la voie du THF et catalysant les mêmes réactions que SHMT2 et MTHFD2. On peut observer à la **figure 39A**, une réduction significative de l'abondance de l'ARNm de SHMT1 (23%), mais aucune réduction de l'expression de l'ARNm de MTHFD1 (**Figure 39B**) au niveau des cellules shMPV17.

Tout d'abord, une confirmation par Western Blot serait intéressante afin de corréler ou non ces données avec leur abondance protéique respective. Ensuite, on peut remarquer que l'expression de plusieurs enzymes mitochondriales est réduite, alors que l'expression des enzymes cytosoliques n'est pas impactée. La réduction protéique de MTHFD2 (observée à la **figure 37**) semble intéressante car cette enzyme est connue comme étant celle qui produit majoritairement du formate dans les cellules cancéreuses (Nilsson et al., 2014; Tibbetts & Appling, 2010). Ainsi, les cellules silencées pour MPV17 synthétiseraient moins de formate et cette déficience serait spécifique à la mitochondrie. Enfin, les cellules transduites avec shMPV17 synthétiseraient une moindre quantité de dTMP suite à la réduction d'expression de *SHMT1*. Ainsi, la diminution de synthèse de purines et dTMP pourrait expliquer en partie la moindre prolifération de ces cellules

L'ensemble de ces résultats suggère une possible synthèse de purines amoindrie dans les cellules silencées pour MPV17 ce qui pourrait expliquer au moins en partie la moindre prolifération. Cette hypothèse est renforcée par le fait que MTHFD2 est une enzyme fréquemment surexprimée dans les cancers et essentielle pour la prolifération cellulaire (Momb et al., 2013; Nilsson et al., 2014; Tibbetts & Appling, 2010). Afin de tester cette hypothèse, une supplémentation avec du formate a été réalisée afin d'en évaluer l'impact sur la capacité proliférative des cellules silencées pour MPV17. La figure 40 montre qu'une supplémentation du milieu de culture avec 1mM ou 5mM de formate pendant quatre jours ne permet pas de restaurer, même partiellement, la prolifération des cellules transduites avec shMPV17. Ce résultat a été confirmé par des comptages manuels permettant de calculer le taux de doublement (données non montrées). Cependant, bien que les conditions de supplémentation que nous avons utilisées correspondent à celles qui ont permis de restaurer la prolifération dans des fibroblastes embryonnaires murins KO pour Tuberous sclerosis 2 (TSC2^{-/-}) déplétés en MTHFD2 par interférence ARN, nous ne sommes pas certains que le formate est importé dans les cellules, ce qui pourrait par ailleurs expliquer le fait que la prolifération n'est pas restaurée chez les cellules shMPV17. Pour s'en assurer, nous pourrions utiliser du formate marqué radioactivement ou lié à un fluorophore. Si le formate est bien importé de manière comparable entre les cellules shNT et shMPV17, cela suggèrerait qu'un autre mécanisme que la synthèse de formate serait responsable de la diminution de prolifération caractérisant les cellules silencées pour MPV17. Une diminution de l'expression d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des purines et/ou de pyrimidines pourrait constituer une hypothèse intéressante, que nous pourrions tester en effectuant un test de supplémentation avec des déoxynucléosides.

Notons que l'absence d'effet de la supplémentation en formate est en accord avec une étude réalisée sur avec leucémie myéloïde aigue knock-down pour MTHFD2 (Pikman et al., 2016). Dans laquelle une expérience de supplémentation avec 1 ou 10mM de formate, ne

A Niveau d'expression de l'ARNm de PHGDH dans les cellules Hep3B





С

Niveau d'expression de l'ARNm de PSPH dans les cellules Hep3B



<u>Figure 41</u>: Effet du silençage de MPV17 sur l'abondance des transcrits de gènes impliqués dans la synthèse de sérine. Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec des shARN non-cible (shNT) ou avec des shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de PHGDH (A), PSAT (B) et PSPH (C) a été évaluée par RT-qPCR dans 4 ou 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les tests statistiques utilisés sont des T-test non-pairés. Les résultats représentent la moyenne des réplicats indépendants \pm SD. NS (nonsignificatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT.

B

permettait pas de restaurer la prolifération des cellules silencées pour MTHFD2 (Pikman et al., 2016). Ceci suggère que MTHFD2 pourrait jouer un rôle indépendant de la synthèse de formate. Effectivement, le tétrahydrofolate synthétisé au sein de la mitochondrie grâce à l'activité de MTHFD2 permet également de synthétiser du formylméthionine, qui est l'acide aminé chargé sur l'ARNt initiateur utilisé lors de la traduction mitochondriale (voir **Figure 2**). Dès lors, une diminution de l'abondance de MTHFD2 pourrait entrainer une moindre synthèse de protéines encodées par l'ADN mitochondriale. Par conséquent, le niveau protéique des 13 sous-unités encodées par le génome mitochondriale serait intéressant à analyser. Cela permettrait aussi de confirmer la première hypothèse exposée au point 3.1.

Finalement, il a été démontré qu'en mutant le domaine possédant l'activité déshydrogénase de MTHFD2, des cellules HCT116 pouvait encore proliférer (Gustafsson Sheppard et al., 2015). En outre, il a été montré que MTHFD2 se localise également au niveau du noyau et serait lié à de l'ADN nouvellement synthétisé (Gustafsson Sheppard et al., 2015). Par conséquent, la fonction enzymatique de MTHFD2 et donc la synthèse de formate ou de formylméthionine ne sont peut-être pas les plus importantes dans le contexte de prolifération des cellules cancéreuses.

3.4. <u>Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqués dans la biosynthèse</u> <u>d'acides aminés</u>

Vu que le silençage de *MPV17* altère l'abondance protéique d'ATF4, nous avons voulu comprendre l'effet de cette réduction d'abondance en testant des gènes cibles impliqués dans la synthèse d'acides aminés. En effet, ATF4 régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la sérine en permettant l'expression de *PHGDH*, *PSAT* et *PSPH* (S. Wang et al., 2015) (voir **Figure 15**) dont nous avons évalué l'expression par des RT-qPCR. La **figure 41** montre une diminution significative de l'abondance de l'ARNm de *PHGDH* (50%) et *PSAT* (43%) (**Figure 41A et B**), mais pas de *PSPH* (**Figure 41C**) lorsque l'on compare les cellules transduites avec shNT et shMPV17. Nous avons aussi pu observer une diminution de l'abondance de ces trois transcrits dans des cellules Huh7 transduites avec shNT ou shMPV17 ce qui est intéressant car les cellules Huh7 transduites avec shMPV17 montrent une prolifération plus affectée que les cellules Hep3B.

Une analyse du niveau protéique par Western Blot et de l'activité de ces enzymes serait intéressante afin de corréler cela avec les résultats obtenus. Néanmoins, si on suppose que la réduction de l'ARNm est corrélée à une réduction de leur niveau protéique et de leur activité, cela suggérerait une déficience au niveau de la biosynthèse de la sérine. La sérine est non seulement un acide aminé nécessaire à la synthèse des protéines, mais également un métabolite essentiel à de nombreuses voies métaboliques tels que la synthèse de purines, le métabolisme du folate, la synthèse de phospholipides (Yang & Vousden, 2016). Cependant, il faut mentionner que le milieu RPMI dans lequel sont incubées les cellules Hep3B contient une grande concentration de sérine (286 μ M). Cela signifierait que même si la cellule synthétise moins de sérine, elle pourrait compenser ce manque grâce à un plus grand import de sérine. Cependant, il est possible que l'import de sérine soit également déficient dans les cellules silencées pour *MPV17*. En effet, il a été démontré par Krall et ses collègues que

A Niveau d'expression de l'ARNm d'ASNS dans les cellules Hep3B n=4 Niveau dexpression relative p-value=0,0020 1.0 0.5 0.0 Shirt JANRY IT 4 B С Réplicat 1 Réplicat 2 Réplicat 3 Niveau protéique de l'ASNS dans les cellules Hep3B NS 200 Niveau d'expression relative (%) shMPV17 shMPV17 shMPV17 n=3 shNT shNT p-value=0,8831 shNT 150 PM 100 ASNS 64 kDa 50 Tubuline 55 kDa ANY JANRY IT

<u>Figure 42</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance du transcrit et de la protéine Asparagine synthétase (ASNS). Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de l'ARNm de l'ASNS a été évaluée par RT-qPCR dans 4 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm de l'ASNS a été normalisée par le l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les résultats représentent la moyenne des 4 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT. (B) L'abondance protéique de L'ASNS a été évaluée par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contôle de charge. (C) Quantification du Western Blot présenté en (B) : l'abondance protéique de l'ASNS a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) par rapport à shNT.



<u>Figure 42</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance du transcrit et de la protéine Asparagine synthétase (ASNS). Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de l'ARNm de l'ASNS a été évaluée par RT-qPCR dans 4 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance de l'ARNm de l'ASNS a été normalisée par le l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les résultats représentent la moyenne des 4 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) significativement différent par rapport au shNT. (B) L'abondance protéique de L'ASNS a été évaluée par Western Blot dans 3 réplicats indépendants. L'abondance de la tubuline a été utilisée comme contôle de charge. (C) Quantification du Western Blot présenté en (B) : l'abondance protéique de l'ASNS a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline et exprimée comme un pourcentage. Le test statistique utilisé est un T-test non-pairé. Les résultats représentent la moyenne des 3 réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif) par rapport à shNT. l'asparagine peut servir comme acide aminé échangeur afin d'importer tous les autres acides aminés, et préférentiellement la sérine (Krall et al., 2016). Or l'asparagine est synthétisée par l'aspparagine synthétase (ASNS) dont l'expression est également régulée par ATF4.

Par conséquent le moindre taux de prolifération des cellules transduites avec shMPV17 pourrait être dû à une réduction de l'expression l'*ASNS*. Nous avons donc testé l'expression de l'*ASNS* par RT-qPCR (**Fig 42A**). Une réduction significative de l'abondance de l'ARNm de l'*ASNS* (55%) est observée lorsque l'on compare les cellules shMPV17 par rapport au shNT. Nous avons aussi pu observer une diminution de l'abondance de cet ARNm dans des cellules Huh7 silencées pour *MPV17* (données non montrées).

Cette réduction du niveau d'expression de l'ARNm de l'ASNS pourrait signifier qu'il y a une réduction au niveau de l'abondance protéique. Par conséquent, nous avons analysé par Western Blot l'abondance protéique de l'ASNS. La **figure 42 B et C** ne montre pas de diminution de l'abondance protéique de l'ASNS. Cependant l'activité de cette protéine serait intéressante à évaluer, même dans un contexte où l'abondance de la protéine n'est pas modifiée. En effet l'activité de cette enzyme pourrait être réduite suite à un manque de glutamine, substrat de l'ASNS (voir **Figure 16** de l'introduction). C'est l'une des raisons pour lesquelles nous nous sommes intéressés aux différents transporteurs d'acides aminés qui importent de la glutamine entre autres.



<u>Figure 43</u>: Effet du silençage de *MPV17* sur l'abondance des transcrits encodant des transporteurs d'acides aminés. Les cellules Hep3B ont soit été non-transduites (NT), soit transduites avec un shARN non-cible (shNT) ou avec un shARN ciblant MPV17 (shMPV17). L'abondance de l'ARNm de SNAT1 (A), SLC1A5 (B), SLC7A5(C), SLC7A11(D) et SLC7A1 (E) a été évaluée par RT-qPCR dans 4 ou 5 réplicats indépendants de cellules Hep3B. L'abondance des ARNm a été normalisée par l'abondance de l'ARNm de la tubuline. Les résultats représentent la moyenne des réplicats indépendants \pm SD. NS (non-significatif* (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.01) significativement différent par rapport au shNT.

3.5. <u>Effet de la répression d'ATF4 sur des gènes impliqué dans le transport</u> <u>d'acides aminés</u>

Plusieurs gènes-cibles d'ATF4 encodent des transporteurs impliqués dans l'import d'acides aminés ont été analysés. Nous avons donc analysé par RT-qPCR l'abondance des ARNm de *SLC7A11*, *SLC7A1*, *SLC7A5*, *SNAT1* et *SLC1A5*. La **figure 43** montre que l'on observe une réduction significative du niveau d'expression de l'ARNm de SLC7A11 (55%), SLC7A1 (36%), SLC1A5 (49%) et SNAT1 (23%), mais pas du niveau d'expression de l'ARNm de SLC7A5. Notons que des résultats obtenus de cellules Huh7 (hépatome) transduites avec shNT ou shMPV17 montrent une diminution du niveau d'expression de *SLC1A5* et *SNAT1* (données non montrées). Ces réductions d'abondance d'ARNm pourraient être corrélées avec la diminution protéique d'ATF4.

Tout d'abord, il faudrait déterminer par Western Blot le niveau d'abondance protéique des transporteurs exprimés différentiellement (**Fig 43 A, B, D et E**). Par après, si l'on peut observer un moindre niveau protéique de ces transporteurs, cela signifierait potentiellement que l'on aurait un moindre influx de 12 acides aminés (voir **Figure 11**). Cela aurait un effet, sur différents processus au sein de la cellule tels que la traduction globale, la synthèse de phospholipides, mais aussi la synthèse de purines et pyrimidines induisant un moindre taux de prolifération. Cette hypothèse est soutenue par un article de Ye et al. montrant qu'une déplétion du niveau protéique d'ATF4 grâce à un knock-down induit une déprivation en acides aminés causant une moindre prolifération cellulaire. La prolifération pouvait être restaurée par l'ajout d'acides aminés non essentiels, via une supplémentation en Asn ou une surexpression de l'ASNS (Ye et al., 2010).

Néanmoins, si la diminution de l'expression et/ou de l'activité des transporteurs était confirmée dans les cellules silencées pour MPV17, cela devrait déclencher une activation du senseur GCN2 suite à la présence d'ARNt non-chargés et devrait aboutir à la phosphorylation d'eIF2 α qui permet une augmentation de la traduction d'ATF4. Or dans notre modèle, aucune différence de phosphorylation d'eIF2 α n'a pu être observée (voir **Fig 31**) et une déplétion du niveau protéique d'ATF4 a pu être mise en évidence (voir **Fig 30A et B**), ce qui va à l'encontre de cette hypothèse. Plutôt qu'une déplétion globale en acides aminés, la diminution de certains d'entre eux pourrait induire une réponse cellulaire spécifique.

Par exemple, la cystéine qui est transportée par SLC7A11 sert à synthétiser du glutathion et permet ainsi de participer à l'homéostasie rédox de la cellule. Le fait d'avoir potentiellement moins de transporteurs pourrait induire une moindre synthèse de glutathion ce qui mènerait à une plus grande concentration intracellulaire de ROS. Cela pourrait impacter la prolifération suite à des dommages causés par ces ROS au niveau de l'ADN, des protéines, des sucres et des lipides.

La réduction de l'ARNm de SLC1A5 observée dans notre étude est intéressante car une réduction protéique de SLC1A5 (73% après 24h) via une approche d'ARN interférent dans des cellules SK-Hep (hépatome) mène à une apoptose rapide (Fuchs et al., 2004). Ces cellules sont caractérisées comme étant très dépendantes envers la glutamine. De plus, ce transporteur est surexprimé dans toutes les lignées d'hépatomes et pas dans des hépatocytes. Cependant, une réduction protéique de ce transporteur chez des cellules 143B (ostéosarcôme) et des cellules HeLa (adénocarcinome cervical) n'a pas d'impact sur la prolifération suite à l'augmentation compensatoire de l'expression d'un transporteur de glutamine qui est SNAT2 et plus modérément SNAT1 (Broer et al., 2016). Ainsi, la réduction potentielle du niveau protéique de SLC1A5 dans les cellules Hep3B transduites avec shMPV17 pourrait mener à une uprégulation de SNAT2 qui agirait comme un mécanisme de compensation. Signalons cependant que dans notre modèle, le niveau de transcrit de *SNAT1* est diminué dans les cellules silencées pour *MPV17*, et non augmenté comme cela devrait être le cas s'il y avait une compensation.

Concernant le transporteur SLC7A1, la réduction de ce transporteur permet d'inhiber la prolifération de cellules du cancer du côlon (Lu et al., 2013). En effet, l'arginine importée permet la prolifération grâce à la synthèse de polyamines. De plus, Lu et ses collègues ont pu montrer que ce transporteur était surexprimé chez des patients atteints de cancer du côlon, qui présentent en outre une réduction de la concentration sérique d'arginine (Lu et al., 2013). Une réduction protéique de ce transporteur via une approche d'ARN interférent a permis d'observer une diminution de l'import d'arginine chez des cellules MCF-7 et T47D. De plus, les cellules MCF-7, qui sont très dépendantes en arginine possédaient une moindre viabilité (50% après 6 jours de transfection) et une augmentation de l'apoptose (Abdelmagid et al., 2011). Dans notre cas, les cellules Hep3B possèdent une moindre abondance de l'ARNm de SLC7A1 qui, si elle est confirmée au niveau protéique, pourrait mener à un moindre import d'arginine et d'ornithine, deux métabolites nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses. Le mécanisme de prolifération semble être dépendant de la synthèse de polyamines permettant l'hypusination de l'eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A), ce qui permet son activité de facteur d'initiation (Landau et al., 2010). Par conséquent, dans les cellules transduites avec shMPV17, la moindre synthèse de polyamines suite à une potentielle réduction protéique de SLC7A1 pourrait impacter la prolifération à cause d'une moindre activité de eIF5A qui est un acteur important dans la prolifération des cellules cancéreuses (Landau et al., 2010).

Un article récent a permis de montrer que la délétion de $C/EBP\gamma$ (l'un des partenaires protéiques qui s'hétérodimérise avec ATF4 et qui est régulée par ATF4 dans ces cellules) dans des fibroblastes murins permettait d'observer une moindre prolifération ainsi qu'une réduction de l'abondance de certains ARNm comme SLC7A11, MTHFD2 et SLC1A5 entre autres (Biever et al., 2015; Huggins et al., 2015). Ils ont pu aussi mettre en évidence que ces fibroblastes délétés C/EBPy montrent une uprégulation de gènes impliqués dans l'homéostasie par exemple Heme Oxygenase 1 (HMOX1), NAD(P)H Dehydrogenase rédox comme Quinone 1 (NQO1). De plus, une augmentation de la protéine Nuclear Factor (erythroidderived 2)-like 2 (NFE2L2 aussi nommé NRF2) a pu être observée. Cela suggère que ces cellules possèdent une plus grande concentration de ROS intracellulaires. L'addition d'un antioxydant tel que la N-acétylcystéine (NAC) permet d'observer une réduction du niveau d'expression des gènes mentionnés ci-dessus, ainsi qu'une restauration de la prolifération cellulaire. Une analyse transcriptomique des cellules $C/EBP\gamma^{\prime}$ a révélé une downrégulation de plusieurs voies métaboliques qui semblent également impactées dans les cellules silencées pour MPV17, à savoir, le métabolisme des purines, des pyrimidines, la voie du folate ou le métabolisme des acides aminés. Plus précisément, certains ARNm tels que MTHFD2. SHMT1, SHMT2, SLC7A11 et SLC1A5 sont aussi downrégulés cette étude Cependant, le métabolisme des ROS et du glutathion sont les voies métaboliques les plus impactées dans les

cellules C/EBP $\gamma^{-/-}$. Rappelons que les transporteurs *SLC1A5* et *SLC7A11* permettent d'importer entre autre de la cystine qui est essentiel lors de la synthèse de glutathion. De plus, la réduction d'abondance des ARNm *SHMT1* et *SHMT2* pourraient aussi indiquer une moindre synthèse de glycine, un acide aminé important pour la synthèse de glutathion. Il a aussi été montré que dans des fibroblates murins délétés pour *ATF4*, une réduction du niveau de l'expression de l'ARNm de *SLC3A2* et du *Glycine transporter 1* (Glyt1) a pu être observée (Harding et al., 2003). Enfin, SLC3A2 permet de recruter en membrane plasmique les transporteurs SLC7A11 et SLC7A5 permettant ainsi leur activité de transport.

En bref, il semblerait que le silençage de *MPV17* soit une sorte de « phénocopie » du KO de *C/EBP* γ , un partenaire d'ATF4. Comme ces auteurs ont pu mettre en évidence le rôle majeur de la synthèse du glutathion dans ces cellules et restaurer partiellement la prolifération cellulaire par l'ajout de NAC, une supplémentation avec de la NAC sur des cellules Hep3B transduites pourrait être envisagée afin d'observer si la prolifération est restaurée au moins partiellement. Si la supplémentation fonctionne nous caractériserons l'aspect du stress oxydatif dans les cellules transduites, ainsi que le niveau d'expression de *C/EBP* γ , la protéine chaperone SLC3A2 et le transporteur Glyt1. De plus, afin de comprendre pourquoi les cellules shMPV17 possèdent un taux de prolifération plus faible, un test permettant la détection des ROS pourrait être réalisé.

Conclusions et perspectives

V. Conclusion et perspectives

1. <u>Impact du silençage de MPV17 sur le nombre de copies d'ADN</u> mitochondrial

MPV17 est associée au MDDS, la fonction de cette protéine est encore inconnue. Cependant, certaines hypothèses ont montré que Mpv17 appartenait à un complexe de 600kDa et serait impliquée dans la voie de recyclage mitochondriale des nucléotides qui est importante dans les cellules quiescentes, mais pas dans les cellules prolifératives (Dalla Rosa et al., 2016). Par conséquent, le fait de démontrer que MPV17 est impliqué dans le contrôle de la prolifération constitue une découverte originale. Beaucoup de questions restent sans réponses tels que : « quels sont les partenaires de MPV17 » ou « comment MPV17 pourrait réguler la prolifération cellulaire». Malgré cela, quelques hypothèses quant à sa fonction cellulaire ont pu émerger.

La première hypothèse que nous avons posée pour expliquer la moindre prolifération des cellules silencées pour MPV17 est une possible déplétion de l'ADNmt dans ces cellules cancéreuses et par conséquent une diminution des réactions OXPHOS. Nos résultats suggèrent que l'abondance de l'ADN mitochondrial n'est pas fortement modifiée dans les cellules transduites avec shMPV17 (une réduction moyenne de 12% a été observée suite à l'analyse des quatre réplicats indépendants). Cela nous mène à la conclusion que l'abondance de l'ADNmt est modifiée modérément dans la lignée de cellules transduites avec shMPV17. Comme discuté plus haut (voir point 1. de la partie résultats et discussion), ce résultat semble être en désaccord avec la littérature car les cellules guiescentes déficientes en Mpv17 dérivées de patients présentent une déplétion d'ADNmt alors que les fibroblastes prolifératifs dérivés de patients déficients en MPV17 ne présentent pas de réduction du nombre de copies d'ADN mitochondrial (Dalla Rosa et al., 2016). Néanmoins, lorsque l'on examine ces données plus profondément, on observe que parmi les lignées fibroblastiques dérivées de 5 patients souffrant de MDDS, certaines montrent une diminution du contenu en ADNmt de l'ordre de 10%, mais que cette diminution n'atteint pas le seuil de significativité. Il n'est donc pas surprenant que les cellules cancéreuses silencées pour MPV17 diffèrent au niveau de l'abondance de leur ADNmt dû à leur nature intrinsèque proliférative. Afin de comprendre si ce résultat est biologiquement pertinent, on pourrait réaliser des analyses de respirométrie permettant de mesurer la respiration cellulaire au niveau de cellules silencées pour MPV17. Par après, si le test de respirométrie montre qu'il y a une réduction de l'efficacité des OXPHOS au sein des cellules shMPV17, on pourrait envisager de tester les 13 sous-unités strictement codées par l'ADNmt au niveau de l'abondance de leur ARNm et confirmé ceux qui montrent une réduction par Western Blot. De plus, il serait aussi intéressant d'investiguer le niveau d'expression de certains ARNm régulés par ATF4 (étant donné que l'abondance protéique d'ATF4 est réduit dans les cellules transduites avec shMPV17). Ces ARNm encodent des sous-unités du complexes I qui sont NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex assembly factor 5 (NDUFAF2), NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 4 (NDUFS4) et NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 7 (NDUFS7) ou une sous-unité appartenant au complexe V qui est ATP synthase proton-transporting mitochondrial F(0) complex subunit C2 (ATP5G2) impliquées dans les réactions OXPHOS (S. Wang et al., 2015). Cela permettrait d'observer une quelconque dysfonction des OXPHOS

dû à une moindre abondance d'ARNm et potentiellement à un moindre niveau protéique de ces protéines.

Finalement, étant donné que Dallabona et son équipe ont pu remarquer que les cellules de levures *Saccharomyces cerevisiae* sym1 Δ possédaient des mitochondries gonflées avec peu de crêtes mitochondriales et une matrice mitochondriale peu dense (Dallabona et al., 2010), il serait intéressant de réaliser une microscopie électronique à transmission sur les cellules transduites avec le shMPV17 afin d'observer les crêtes mitochondriales. De plus, cela serait une autre manière de confirmer si la déplétion de Mpv17 jouerait un rôle sur la morphogénèse des crêtes mitochondriales et donc par conséquent sur l'efficacité des réactions OXPHOS.

2. Impact du silençage de MPV17 sur les acteurs traductionnels

La seconde hypothèse qui pourrait expliquer la moindre prolifération des cellules transduites avec shMPV17 était basée sur un screening réalisé sur des cellules Hep3B et A549 silencées pour MPV17. Ce screening RPPA ciblait 297 protéines associées au cycle cellulaire. Trois candidats impliqués dans la traduction sont ressortis de cette analyse : Mnk1, Pdcd4 et Rps6ka1. Vu que ces trois protéines participent à la traduction, cela suggérait que la réduction du taux de prolifération au niveau des cellules shMPV17 pourrait être due à une diminution globale de la traduction ou à une réduction de la traduction de certains ARNm impliqués dans la prolifération cellulaire.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer une forte réduction de l'abondance protéique de Mnk1 dans les cellules transduites avec shMPV17. Notons que la diminution protéique de Mnk1 a aussi été montré dans des cellules Huh7, mais pas dans les A549 (données non-montrées). Cependant, la plus faible abondance de cette kinase n'est pas corrélée à une réduction de la phosphorylation d'eIF4E, ce qui suggère que la traduction de certains ARNm participant à la prolifération tels que c-Myc ou la cycline D1 n'est pas modifiée. Ainsi, l'abondance de c-Myc pourrait être intéressante à investiguer afin de répondre à la question concernant l'altération de l'abondance de certaines protéines participant à la prolifération. De plus, il semble qu'une abondance protéique identique de eIF4E est présente dans les cellules silencées pour *MPV17*. Cependant, une quantification directe du niveau protéique de eIF4E semble intéressante à réaliser car cela permettrait d'observer l'activité réelle de Mnk1. Néanmoins, Mnk1 possède d'autres substrats qui n'ont pas été investigué dans cette étude. Il s'agit de hnRNPA1, cPLA2, Sprouty et PSF (Joshi & Platanias, 2014). Il serait intéressant d'investiguer leur phosphorylation respective afin d'observer si l'activité de Mnk1 est identique lorsque l'on compar les cellules shNT et shMPV17.

Nous avons aussi confirmé la réduction du niveau protéique de Pdcd4 au niveau des cellules silencées pour *MPV17*. Ce résultat concernant la diminution de l'abondance de la protéine Pdcd4 est original car différents cancers sous-expriment cette protéine. De plus, il a été rapporté que dans l'hépatome, cette protéine est souvent downrégulée (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009) et la diminution protéique de Pdcd4 est associée à la progression et l'invasion des tumeurs (Ohnheiser et al., 2015). La réduction de l'abondance de la protéine Pdcd4 est robuste car une autre lignée cellulaire (Huh7) transduites avec shNT ou shMPV17 montrent aussi ce même résultat. Cela signifie que Pdcd4 doit jouer un rôle dans la prolifération cellulaire bien que nous ne connaissons par les conséquences fonctionnels de cette réduction d'abondance

protéique. En effet, Pdcd4 permet de déclencher l'apoptose en régulant la traduction de p53 (Kumar et al., 2013). Ce dernier peut contrôler l'expression de p21 ce qui mène à un arrêt du cycle cellulaire (Bitomsky et al., 2008). Nos résultats montrent que, bien que l'abondance de Pdcd4 soit réduite dans les cellules transduites avec shMPV17, elle ne peut pas être expliquée par une augmentation de la phosphorylation de p70S6K. Cela suggère qu'un autre mécanisme est responsable de la réduction protéique de PDCD4, tel qu'une augmentation de miR21, qui est connu pour réguler l'ARNm de PDCD4 (Bitomsky et al., 2008). Les analyses du niveau protéique de p53 et de p21 ne peuvent être réalisées sur les cellules Hep3B car comme dit plus haut, une mutation perte de fonction du gène *TP53* est connue dans ces cellules (Vona et al., 2000). Néanmoins, afin d'observer indirectement son activité, nous pourrions analyser par Western Blot des protéines régulées par Pdcd4 comme A-myb ou c-Myb.

Afin de comprendre si la moindre prolifération des cellules transduites avec shMPV17 est due à une réduction des niveaux protéiques de Mnk1 et Pdcd4, une expérience de complémentation avec des vecteurs d'expression contenant l'ADNc de *PDCD4* ou *MNK1* pourrait être réalisée. Le but serait de retrouver un niveau identique de protéines Mnk1 et Pdcd4 par rapport aux cellules shNT. On pourrait ainsi déterminer quelles protéines semblent être impliquées de manière prédominante dans la prolifération cellulaire.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur Mnk1 et Pdcd4, cependant, il serait intéressant d'étudier le niveau protéique d'une autre cible qui est ressortie lors de l'analyse RPPA. Il s'agit de Rps6ka1 (aussi nommée Rsk1) qui est une autre protéine impliquée dans la traduction. Cette protéine appartient à la famille des Ribosomal protein S6 kinase (Rps6k) (Tavares et al., 2015). Cette famille est constituée des S6K1, composées des p70-, p85- et p31-S6K1 (aussi nommée Rps6kb1), des S6K2, composées des p56- et p54-S6K2 (aussi connu sous le nom de Rps6kb2) et des RSK qui ont un poids moléculaire de 90kDa dont il en existe quatre isoformes (RSK1-4) (Anjum & Blenis, 2008; Poomakkoth et al., 2016; Romeo et al., 2012).

Les Rsk1-3 sont exprimés de manière ubiquitaire (Romeo et al., 2012), mais Rps6ka1 est exprimée de manière plus importante dans certains organes connus pour avoir des cellules très prolifératives (foie, poumon, thymus, epithélium olfactif et épithélium intestinal).

Ces protéines peuvent être activées par des facteurs de croissance ou des cytokines (Frodin & Gammeltoft, 1999) et jouer un rôle dans la traduction protéique de différentes manières : elles peuvent phosphoryler la protéine TSC2 qui inhibe la protéine Ras homolog enriched in brain (Rheb). Ce dernier peut activer mTOR qui phosphorylera les S6K1. Celle-ci peut phosphoryler eIF4B et donc augmenter la traduction protéique. Rsk1 et Rsk2 peuvent aussi phosphoryler RAPTOR (un constituant de mTORC1), ce qui permet d'augmenter l'activité de mTORC1 (Lara et al., 2013). En outre, les Rsk participent à la traduction protéique en phosphorylant spécifiquement certains sites de la rps6 (Ser235 et Ser236) de la sous-unité 40S du ribosome (Romeo et al., 2012) mais aussi eIF4B permettant ainsi dese lier à eIF4A et d'augmenter son activité hélicase d'eIF4A via son activité de cofacteur (Lara et al., 2013). Les Rsk phosphorylent aussi l'eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K), ce qui permet de lever l'inhibition sur l'eukaryotic elongation factor 2 (eEF2).

Enfin, l'étude de Cmc2 serait aussi intéressant car cette protéine semble être importante lors de l'assemblage du cytochrome c oxidase (Horn et al., 2008). Cela pourrait indiquer que les cellules transduites avec shMPV17 possèderaient des réactions OXPHOS altérées ce qui pourrait mener à une moindre production d'ATP ainsi qu'une plus grande génération de ROS, expliquant, en partie, la moindre prolifération de ces cellules.

3. Impact du silençage de MPV17 sur ATF4 et ses gènes-cibles

Nous avons émis l'hypothèse que la réduction de la prolifération dans les cellules silencées pour MPV17 pourrait être due, au moins partiellement, à une réduction de synthèse de purines. Cette hypothèse est basée sur une publication récente (Ben-Sahra et al., 2016) montrant que mTORC1 peut permettre la synthèse de purines en régulant ATF4. Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes que l'on peut classer dans différentes catégories fonctionnelles (**Figure 15**) : il s'agit par exemple de gènes encodant des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides aminés, d'enzymes participant à la synthèse de nucléotides, de protéines impliquées dans l'ISR ou encore de protéines impliquées dans le transport d'acides aminés.

ATF4 régule l'expression de gènes participant au cycle du tétrahydrofolate comme *MTHFD2*, *MTHFD1L* et *SHMT2*. MTHFD2 est une enzyme clef de la voie du mTHF (**Fig 16**) qui est fréquemment surexprimée dans les cancers (Momb et al., 2013; Nilsson et al., 2014). Cette enzyme est requise pour la synthèse de formate qui est un composant essentiel lors de la biosynthèse des bases puriques. De plus, il a été démontré que les purinosomes colocalisent avec les mitochondries (French et al., 2016). Les purinosomes sont des complexes protéiques composés d'enzymes impliquées dans la voie de synthèse *de* novo des purines. De plus, l'inhibition de mTORC1 mène à une réduction du nombre de purinosomes et de leur colocalisation mitochondriale (Ma & Jones, 2016). Cela démontre qu'il existe un lien entre la mitochondrie et la synthèse de purines. Nos résultats montrent que nous avons une réduction de l'abondance protéique d'ATF4 dans les cellules transduites avec shMPV17. Néanmoins, ni une diminution de la phosphorylation d'eIF2 α , ni celle de mTORC1 ne peut expliquer cette réduction. Cela suggère que l'abondance protéique d'ATF4 est diminuée dans les cellules silencées pour *MPV17* par un mécanisme encore inconnu.

Nous avons aussi pu montrer que l'abondance de la protéine et le niveau d'expression de l'ARNm de *MTHFD2* sont tous les deux downrégulés dans les cellules transduites avec shMPV17. De plus, la réduction de l'abondance de l'ARNm de *SHMT2* et *SHMT1* a pu être mise en évidence. La réduction de l'abondance de l'ARNm de *SHMT2* est corrélée à la plus faible abondance de la protéine ATF4 dans ces mêmes cellules. Toutes ces données suggèreraient que la cellule synthétise moins de formate ainsi que moins de 5,10-méthylène-THF. Cela impacterait la synthèse des purines et de dTMP. Notons aussi qu'aucune diminution de l'abondance de l'ARNm de *MTHFD1L* n'a pu être observée.

Nous avons posé l'hypothèse d'une déficience de synthèse en formate. Cette hypothèse se basait sur le fait que l'on observe une diminution d'expression de *MTHFD2*, ainsi qu'une diminution de l'abondance protéique de MTHFD2 dans les cellules Hep3B transduites avec shMPV17. De plus, une publication montrait que l'addition de formate permettait aux cellules $TSC2^{-1-}$ déplétées en MTHFD2 de restaurer la prolifération (Ben-Sahra et al., 2016). Par conséquent, une supplémentation en formate a été réalisée. Cependant, la supplémentation en formate ne semble pas restaurer, même en partie, la prolifération. Il faut noter que cette



<u>Figure 44:</u> Origine de l'atome circulaire des purines. Lors de la synthèse des purines, certaines molécules sont nécessaires. Il s'agit de la glutamine, la glycine, l'aspartate, le formate sous la forme du N10-formyltétrahydrofolate et le CO_2 (Biochemistry, 5th edition).



Figure 45: Cycle de la sérine et du folate. Le métabolisme du folate se passe dans la mitochondrie et le cytosol ; Dans la plupart des cellules, la sérine est catabolisée premièrement par la sérine hydroxyméthyltransférase 2 (SHMT2) pour générer la glycine et le 5,10-méthylène-tetrahydrofolate (5,10-méthylène-THF). Le système de clivage de la glycine (dont la glycine déshydrogénase (GLDC) est le composant majeur) contribue aussi à la production de cet intermédiaire du folate. L'oxydation du 5,10-méthylène-THF par méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase 2 (MTHFD2) or MTHFD2-like (MTHFD2L) produit le 10-formyl-THF. MTHD2L (qui peut utiliser du NAD+ or NADP+) est exprimé dans la plupart des tissus adultes, alors que les cellules cancéreuses expriment préférentiellement MTHFD2 qui dépend du NAD+. L'oxydation du 5,10-méthylène-THF par MTHFD2 permet de générer du NADH. L'unité 1C du 10-formyl-THF peut êre converti en formate grâce à la réaction catalysée par MTHFD1L et permet de générer de l'ATP à partir d'ADP ou être catabolisé par la 10formyl-THF déshydrogsnase (ALDH1L2) et libérer du CO2 en générant du NADPH. De plus, le 10-formyl-THF est nécessaire pour la formylation de l'initiateur mitochondrial N-formylméthionine-tRNA (fMET-tRNA). Le formate peut être transporté vers le cytosol et utilisé comme substrat pour l'enzyme trifonctionnelle MTHFD1, qui produit le 10-formyl-THF pour la synthèse de novo des purines et le 5,10-méthylène-THF pour la synthèse du thymidylate et la reméthylation de l'homocystéine lors du cycle de la méthionine. L'enzyme cytosolique ALDH1L1 qui dégrade le 10-formyl-THF est fréquemment réprimée dans les cellules cancéreuses. La plupart des cellules utilisent par défaut la directionalité mitochondrie-cytosol, mais quand la voie mitochondriale est inhibée, la voie cytosolique peut fonctionner à l'envers pour soutenir la synthès des nucléotides et la prolifération. Les lignes en pointillées représentent le transport entre le cytosol et la mitochondrie MTHFR, méthylènetétrahydrofolate réductase; TYMS, thymidylate synthase.

expérience doit être répétée au moins deux fois afin de pouvoir déterminer si la supplémentation en formate a un effet sur la prolifération des cellules Hep3B transduites avec shMPV17. Néanmoins, si la supplémentation en formate sur les réplicats additionels ne permet pas de restaurer la prolifération, il est possible que des voies métaboliques en aval de la voie du THF comme la synthèse de novo des purines soit impactée lors du silençage de MPV17. En effet, le formate n'est qu'un composant parmi plusieurs lors de la synthèse des purines (Figure 44). En effet, si la cellule possède une déficience de synthèse ou d'import de glutamine, de glycine ou d'aspartate, l'activité de certaines enzymes participant à la voie de novo de synthèse des purines pourrait être réduite. Par conséquent, le fait de supplémenter en formate ne permettrait pas d'observer une restauration de la prolifération des cellules shMPV17. Afin d'éviter ce problème, des supplémentations en déoxynucléosides peuvent être réalisées. Néanmoins, lors de supplémentation en déoxynucléosides de cellules Huh7 transduites avec shMPV17, la prolifération n'est pas restaurée. Cela suggèrerait trois raisons : premièrement, notre hypothèse n'est pas la bonne et un autre mécanisme encore inconnu est à l'œuvre. Deuxièmement, le formate et les déoxynucléosides pourraient ne pas être importés dans la cellule à cause d'une réduction protéique de transporteurs de formate et déoxynucléosides, ce qui expliquerait pourquoi ces supplémentation ne restaurent pas la prolifération de cellules transduites avec shMPV17. Afin de tester cela, on pourrait utiliser du formate ou des déoxynucléosides marqués radioactivement ou liés à des fluorochromes et mesurer leur importation dans notre modèle expérimentale. Enfin, il est possible que les supplémentations en formate ou en déoxynucléosdides ne restaurent pas la prolifération suite au fait que les cellules transduites avec shMPV17 sont déficientes pour plusieurs voies de synthèse. Le fait d'en suppléer une pourrait ne pas restaurer la prolifération de ces cellules.

ATF4 régule l'expression de gènes de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse de sérine tels que PHGDH, PSAT et PSPH (Zhao et al., 2016). Nous avons pu montrer une réduction de l'abondance de l'ARNm de PHGDH et de PSAT, alors qu'aucune diminution de l'abondance de l'ARNm de PSPH n'a pu être mise en évidence. Il existerait donc une déficience de la synthèse en sérine dans les cellules transduites avec le shMPV17 suite à une potentielle réduction du niveau protéique corrélée avec la réduction de l'abondance de l'ARNm de PHGDH et PSAT. Cela signifierait que la cellule pourrait synthétiser encore moins de formate (Figure 45). Cependant, même si la cellule produit moins de sérine, elle peut en importer à partir du milieu de culture. En effet, les cellules Hep3B sont incubées avec 300µM de sérine et pourraient donc compenser son défaut de synthèse endogène. Cependant, il est possible que l'import de sérine soit également déficient dans les cellules silencées pour MPV17. En effet, il a été démontré par Krall et ses collègues que l'asparagine peut servir comme acide aminé échangeur afin d'importer tous les autres acides aminés, et préférentiellement la sérine (Krall et al., 2016). Par conséquent, nous avons d'abord testé le niveau d'expression de l'ASNS qui est régulé par ATF4. Nous avons pu mettre en évidence une réduction de l'ARNm de l'ASNS dans les cellules shMPV17 par rapport aux cellules shNT. Cependant, cette réduction du niveau d'expression n'est pas corrélée au niveau protéique. Cela suggérerait que les cellules transduites avec shMPV17 synthétisent autant d'asparagine qui servirait, entre autre, à importer de la sérine et d'autres acides aminés. Cependant, ATF4 régule aussi l'expression d'enzymes participant au transport d'acides aminés. Il semblait donc intéressant d'investiguer ces transporteurs étant donné que l'activité de l'ASNS dépend de la glutamine et de l'aspartate présent dans la cellule. Nous avons pu montrer que le niveau d'expression de l'ARNm de plusieurs transporteurs était réduit. Si le niveau protéique est aussi réduit, cela pourrait résulter en une réduction de l'import de certains acides aminés dont la sérine, la glutamine et l'asparagine. Toutes ces données suggèrent que la réduction de prolifération dans des cellules transduites avec shMPV17 pourrait être causée par un moindre apport d'acides aminés et une moindre synthèse d'acides aminés qui se surimposerait à cela. Cependant, une réduction du niveau protéique de ces transporteurs ne signifie pas nécessairement une diminution de leur activité. De plus, ces transporteurs réalisent des imports et des exports d'acides aminés donc, même si leur activité est impactée, il y aurait moins d'import d'acides aminés, mais aussi moins d'export, ce qui n'expliquerait pas la moindre prolifération des cellules transduites avec shMPV17.

Enfin, un article récent a montré que la délétion dans des fibroblastes murins, de $C/EBP\gamma$, un partenaire protéique d'ATF4, provoque une diminution de la prolifération ainsi qu'une réduction de l'abondance de certains ARNm qui sont, entre autres, *MTHFD2*, *SLC7A11* et *SLC1A5*. La restauration de la prolifération pouvait être obtenue grâce à l'ajout de N-acétylcystéine suggérant que la diminution de la prolifération est due au stress oxydatif. Dans ce mémoire, nous avons pu montrer une moindre prolifération des cellules Hep3B transduites avec shMPV17, ainsi qu'une réduction d'abondance des mêmes ARNm cités ci-dessus. Cela suggèrerait que la moindre prolifération des cellules shMPV17 pourrait être due à un stress oxydatif. Afin de tester cette hypothèse, une supplémentation en NAC sera testée. Dans le cas où elle permet de restaurer, au moins partiellement, la prolifération, l'aspect stress oxydatif sera analysé.

Afin de déterminer si la réduction protéique d'ATF4 et les conséquences au niveau de l'expression de ces gènes-cibles peut expliquer la moindre prolifération des cellules shMPV17, nous pourrions réaliser une transfection avec un vecteur d'expression contenant l'ADNc d'*ATF4*. Le but serait de retrouver un niveau identique de protéines ATF4 par rapport aux cellules shNT. On pourrait ainsi déterminer si la moindre prolifération est bien due à la forte réduction du niveau protéique de ce facteur de transcription. Si la prolifération n'est pas restaurée, cela ne signifie pas que la réduction de l'abondance protéique d'ATF4 n'est pas impliquée dans la réduction de la prolifération. Dans le cas contraire, si la restauration est restaurée,

L'étude d'autres gènes cibles d'ATF4 serait intéressante car ce facteur de transcription est décrit pour réguler l'expression de gènes codant pour l'ASS, le transporteur SLC3A2 et le transporteur SLC43A1 (LAT3) (S. Wang et al., 2015). Le premier gène code pour une enzyme impliquée dans le cycle de l'urée. Cela serait intéressant car nous avons pu observer dans les cellules shMPV17 possède une réduction du niveau d'expression du transporteur SLC7A1, qui permet l'import entre autre de l'ornithine et de l'arginine. Une réduction de l'expression de l'ASS pourrait indiquer un moindre niveau protéique de cette enzyme et donc une moindre de synthèse de polyamines résultant en une réduction de prolifération chez les cellules transduites avec shMPV17.

La protéine SLC3A2 serait intéressante à investiguer car elle est régulée par ATF4 et elle permet l'activité des transporteurs SLC7A11 et SLC7A5. Ainsi donc, même si le niveau

protéique de ces transporteurs n'est pas modifié, l'activité de ceux-ci pourrait être modifiée suite à une réduction du niveau d'expression de *SLC3A2* et potentiellement à une diminution protéique. Cela résulterait en une diminution de l'import de certains acides aminés.

La protéine LAT3 est un transporteur qui permet l'import facilité de valine, leucine, isoleucine, phénylalanine et méthionine. Ce transporteur est exprimé dans le foie, le pancréas et les muscles squelettiques (Bodoy et al., 2013). Certains cancers uprégulent LAT3 afin de permettre l'import constant de Leu qui est un activateur de mTORC1 permettant ainsi la croissance cellulaire.

Finalement, une analyse protéomique permettrait d'observer des potentielles variations du niveau protéique de certaines protéines impliquées dans d'autres voies métaboliques. Cela nous donnerait d'autres pistes à suivre et éventuellement une confirmation ou non des différentes hypothèses présentées, mais toujours en cours d'investigation.

En conclusion, la réduction de la prolifération dans les cellules Hep3B transduites avec shMPV17 que nous pouvons observer peut être due à trois processus, qui ne sont pas mutuellement exclusifs : la diminution de la traduction d'ARNm impliqués dans le contrôle de la prolifération, une réduction de synthèse de purines et/ou une déficience de l'activité OXPHOS. Aucune hypothèse ne peut être exclue en ce moment. En effet, nos expériences suggèrent que le contenu en ADNmt n'est que peu affecté lors de la réduction de l'abondance protéique de Mpv17 dans les cellules Hep3B, mais on ne peut exclure d'autres effets délétères qui se passeraient au niveau de la mitochondrie lors du silençage de *MPV17*. C'est pour cela qu'analyser la respiration cellulaire pourrait aider à répondre à cette question. Bien que l'hypothèse liée à Mnk1 et Pdcd4 mérite d'être poursuivie, nous nous sommes concentrés sur l'hypothèse de l'altération de la synthèse des purines car elle nous apparaissait comme la plus prometteuse, mais pour l'instant, aucune des supplémentations testées n'a permis de restaurer la prolifération.

Bibliographie

- Abdelmagid, S. A., Rickard, J. A., McDonald, W. J., Thomas, L. N., & Too, C. K. (2011). CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of nitric oxide synthases for the survival of human breast cancer cell lines. J Cell Biochem, 112(4), 1084-1092. doi:10.1002/jcb.23022
- Al Sarraj, J., Vinson, C., & Thiel, G. (2005). Regulation of asparagine synthetase gene transcription by the basic region leucine zipper transcription factors ATF5 and CHOP. *Biol Chem*, 386(9), 873-879. doi:10.1515/BC.2005.102
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. Nat Rev Cancer, 16(10), 619-634. doi:10.1038/nrc.2016.71
- Anjum, R., & Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, 9(10), 747-758. doi:10.1038/nrm2509
- Antonenkov, V. D., Isomursu, A., Mennerich, D., Vapola, M. H., Weiher, H., Kietzmann, T., & Hiltunen, J. K. (2015). The Human Mitochondrial DNA Depletion Syndrome Gene MPV17 Encodes a Non-selective Channel That Modulates Membrane Potential. *J Biol Chem*, 290(22), 13840-13861. doi:10.1074/jbc.M114.608083
- Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., & Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15), 2128-2136. doi:10.1038/sj.onc.1210856
- Azzam, M. E., & Algranati, I. D. (1973). Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(12), 3866-3869.
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 351(6274), 728-733. doi:10.1126/science.aad0489
- Berry, W. L., & Janknecht, R. (2013). KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res*, 73(10), 2936-2942. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4300
- Bhutia, Y. D., Babu, E., Ramachandran, S., & Ganapathy, V. (2015). Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res*, 75(9), 1782-1788. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3745
- Bhutia, Y. D., & Ganapathy, V. (2016). Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1863(10), 2531-2539. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.12.017
- Bi, S. J., Wang, C. Y., Zhang, J., Lv, Z. P., & Li, Y. X. (2015). Atorvastatin up-regulates TRIB3 independent of ATF4-CHOP pathway in atherosclerotic patients. *Int J Clin Exp Med*, 8(11), 21635-21640.
- Biever, A., Valjent, E., & Puighermanal, E. (2015). Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front Mol Neurosci*, 8, 75. doi:10.3389/fnmol.2015.00075
- Bijarnia-Mahay, S., Mohan, N., Goyal, D., & Verma, I. C. (2014). Mitochondrial DNA depletion syndrome causing liver failure. *Indian Pediatr*, *51*(8), 666-668.
- Bitomsky, N., Wethkamp, N., Marikkannu, R., & Klempnauer, K. H. (2008). siRNAmediated knockdown of Pdcd4 expression causes upregulation of p21(Waf1/Cip1) expression. Oncogene, 27(35), 4820-4829. doi:10.1038/onc.2008.115
- Biyanee, A., Ohnheiser, J., Singh, P., & Klempnauer, K. H. (2015). A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdcd4: inhibition of translation elongation. Oncogene, 34(11), 1384-1392. doi:10.1038/onc.2014.83

Biyanee, A., Singh, P., & Klempnauer, K. H. (2015). Translation, Pdcd4 and eIF4A. Oncoscience, 2(9), 731-732.

- Blakely, E. L., Butterworth, A., Hadden, R. D., Bodi, I., He, L., McFarland, R., & Taylor, R.
 W. (2012). MPV17 mutation causes neuropathy and leukoencephalopathy with multiple mtDNA deletions in muscle. *Neuromuscul Disord*, 22(7), 587-591. doi:10.1016/j.nmd.2012.03.006
- Bodoy, S., Fotiadis, D., Stoeger, C., Kanai, Y., & Palacin, M. (2013). The small SLC43 family: facilitator system 1 amino acid transporters and the orphan EEG1. *Mol Aspects Med*, *34*(2-3), 638-645. doi:10.1016/j.mam.2012.12.006
- Bottani, E., Giordano, C., Civiletto, G., Di Meo, I., Auricchio, A., Ciusani, E., . . . Zeviani, M. (2014). AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol Ther*, 22(1), 10-17. doi:10.1038/mt.2013.230
- Broer, A., Rahimi, F., & Broer, S. (2016). Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells. J Biol Chem, 291(25), 13194-13205. doi:10.1074/jbc.M115.700534
- Bu, Y., & Diehl, J. A. (2016). PERK Integrates Oncogenic Signaling and Cell Survival During Cancer Development. J Cell Physiol. doi:10.1002/jcp.25336
- Camara, Y., Gonzalez-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J., Caballero, A., Hirano, M., & Marti, R. (2014). Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet*, 23(9), 2459-2467. doi:10.1093/hmg/ddt641
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
- Carroll, M., & Borden, K. L. (2013). The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer. J Interferon Cytokine Res, 33(5), 227-238. doi:10.1089/jir.2012.0142
- Cherasse, Y., Maurin, A. C., Chaveroux, C., Jousse, C., Carraro, V., Parry, L., . . . Bruhat, A. (2007). The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic Acids Res, 35*(17), 5954-5965. doi:10.1093/nar/gkm642
- Chin, Y. W., & Han, S. Y. (2015). KDM4 histone demethylase inhibitors for anti-cancer agents: a patent review. *Expert Opin Ther Pat, 25*(2), 135-144. doi:10.1517/13543776.2014.991310
- Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*, 41(3), 261-273. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.001
- Copeland, W. C. (2012). Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. Crit Rev Biochem Mol Biol, 47(1), 64-74. doi:10.3109/10409238.2011.632763
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., & Borden, K. L. (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol*, 175(3), 415-426. doi:10.1083/jcb.200607020
- Dalla Rosa, I., Camara, Y., Durigon, R., Moss, C. F., Vidoni, S., Akman, G., . . . Spinazzola,
 A. (2016). MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA
 Replication in Mitochondria. *PLoS Genet*, 12(1), e1005779.
 doi:10.1371/journal.pgen.1005779
- Dallabona, C., Marsano, R. M., Arzuffi, P., Ghezzi, D., Mancini, P., Zeviani, M., . . . Donnini, C. (2010). Sym1, the yeast ortholog of the MPV17 human disease protein, is a stressinduced bioenergetic and morphogenetic mitochondrial modulator. *Hum Mol Genet*, 19(6), 1098-1107. doi:10.1093/hmg/ddp581

- Diab, S., Kumarasiri, M., Yu, M., Teo, T., Proud, C., Milne, R., & Wang, S. (2014). MAP kinase-interacting kinases--emerging targets against cancer. *Chem Biol*, 21(4), 441-452. doi:10.1016/j.chembiol.2014.01.011
- Dogan, S. A., Pujol, C., Maiti, P., Kukat, A., Wang, S., Hermans, S., . . . Trifunovic, A. (2014). Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart. *Cell Metab*, 19(3), 458-469. doi:10.1016/j.cmet.2014.02.004
- Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., & Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314(5798), 467-471. doi:10.1126/science.1130276
- El-Hattab, A. W., Li, F. Y., Schmitt, E., Zhang, S., Craigen, W. J., & Wong, L. J. (2010). MPV17-associated hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: new patients and novel mutations. *Mol Genet Metab*, 99(3), 300-308. doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.003
- El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics*, 10(2), 186-198. doi:10.1007/s13311-013-0177-6
- Fan, H., Zhao, Z. J., Cheng, J., Su, X. W., Wu, Q. X., & Shan, Y. F. (2009). Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 15(16), 2020-2026.
- Fellman, V., & Kotarsky, H. (2011). Mitochondrial hepatopathies in the newborn period. Semin Fetal Neonatal Med, 16(4), 222-228. doi:10.1016/j.siny.2011.05.002
- Fotiadis, D., Kanai, Y., & Palacin, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 139-158. doi:10.1016/j.mam.2012.10.007
- French, J. B., Jones, S. A., Deng, H., Pedley, A. M., Kim, D., Chan, C. Y., ... Benkovic, S. J. (2016). Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria. *Science*, 351(6274), 733-737. doi:10.1126/science.aac6054
- Frodin, M., & Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*, 151(1-2), 65-77.
- Fuchs, B. C., Perez, J. C., Suetterlin, J. E., Chaudhry, S. B., & Bode, B. P. (2004). Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(3), G467-478. doi:10.1152/ajpgi.00344.2003
- Garone, C., Rubio, J. C., Calvo, S. E., Naini, A., Tanji, K., Dimauro, S., . . . Hirano, M. (2012). MPV17 Mutations Causing Adult-Onset Multisystemic Disorder With Multiple Mitochondrial DNA Deletions. Arch Neurol, 69(12), 1648-1651. doi:10.1001/archneurol.2012.405
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*. doi:10.1007/s00439-016-1683-5
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., & Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, 12(4), 502-513.
- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68, 913-963. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.913
- Gustafsson Sheppard, N., Jarl, L., Mahadessian, D., Strittmatter, L., Schmidt, A., Madhusudan, N., . . . Nilsson, R. (2015). The folate-coupled enzyme MTHFD2 is a nuclear protein and promotes cell proliferation. *Sci Rep*, 5, 15029. doi:10.1038/srep15029

- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., . . . Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, 15(5), 481-490. doi:10.1038/ncb2738
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., . . . Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, *11*(3), 619-633.
- He, Y., Korboukh, I., Jin, J., & Huang, J. (2012). Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 44(1), 70-79. doi:10.1093/abbs/gmr109
- Horn, D., Al-Ali, H., & Barrientos, A. (2008). Cmc1p is a conserved mitochondrial twin CX9C protein involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol Cell Biol*, 28(13), 4354-4364. doi:10.1128/MCB.01920-07
- Hou, J., Lam, F., Proud, C., & Wang, S. (2012). Targeting Mnks for cancer therapy. Oncotarget, 3(2), 118-131. doi:10.18632/oncotarget.453
- Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., & Sadee, W. (2005). Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*, 65(16), 7446-7454. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4267
- Huggins, C. J., Mayekar, M. K., Martin, N., Saylor, K. L., Gonit, M., Jailwala, P., . . . Johnson, P. F. (2015). C/EBPgamma Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Mol Cell Biol*, 36(5), 693-713. doi:10.1128/MCB.00911-15
- Iurlaro, R., & Munoz-Pinedo, C. (2015). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* doi:10.1111/febs.13598
- Joshi, S., & Platanias, L. C. (2012). Mnk Kinases in Cytokine Signaling and Regulation of Cytokine Responses. *Biomol Concepts*, 3(2), 127-139. doi:10.1515/bmc-2011-0057
- Joshi, S., & Platanias, L. C. (2014). Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J Biol Chem*, 5(3), 321-333. doi:10.4331/wjbc.v5.i3.321
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hehner, S. P., Droge, W., & Schmitz, M. L. (1999). Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. *Oncogene*, 18(21), 3213-3225. doi:10.1038/sj.onc.1202657
- Karasawa, M., Zwacka, R. M., Reuter, A., Fink, T., Hsieh, C. L., Lichter, P., . . . Weiher, H. (1993). The human homolog of the glomerulosclerosis gene Mpv17: structure and genomic organization. *Hum Mol Genet*, 2(11), 1829-1834.
- Kondoh, N., Imazeki, N., Arai, M., Hada, A., Hatsuse, K., Matsuo, H., . . . Yamamoto, M. (2007). Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues. *Int J Oncol*, 31(1), 81-87.
- Krall, A. S., Xu, S., Graeber, T. G., Braas, D., & Christofk, H. R. (2016). Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat Commun*, 7, 11457. doi:10.1038/ncomms11457
- Krauss, J., Astrinidis, P., Frohnhofer, H. G., Walderich, B., & Nusslein-Volhard, C. (2013). transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biol Open*, 2(7), 703-710. doi:10.1242/bio.20135132
- Kumar, N., Wethkamp, N., Waters, L. C., Carr, M. D., & Klempnauer, K. H. (2013). Tumor suppressor protein Pdcd4 interacts with Daxx and modulates the stability of Daxx and the Hipk2-dependent phosphorylation of p53 at serine 46. Oncogenesis, 2, e37. doi:10.1038/oncsis.2012.37
- Landau, G., Bercovich, Z., Park, M. H., & Kahana, C. (2010). The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for

translation initiation and elongation. J Biol Chem, 285(17), 12474-12481. doi:10.1074/jbc.M110.106419

- Landon, A. L., Muniandy, P. A., Shetty, A. C., Lehrmann, E., Volpon, L., Houng, S., . . . Gartenhaus, R. B. (2014). MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nat Commun*, 5, 5413. doi:10.1038/ncomms6413
- Lankat-Buttgereit, B., & Goke, R. (2009). The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell*, 101(6), 309-317. doi:10.1042/BC20080191
- Lara, R., Seckl, M. J., & Pardo, O. E. (2013). The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity. *Cancer Res*, 73(17), 5301-5308. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4448
- Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R., & Margottin-Goguet, F. (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. J Biol Chem, 280(50), 41537-41545. doi:10.1074/jbc.M505294200
- Lassot, I., Segeral, E., Berlioz-Torrent, C., Durand, H., Groussin, L., Hai, T., . . . Margottin-Goguet, F. (2001). ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*, 21(6), 2192-2202. doi:10.1128/MCB.21.6.2192-2202.2001
- Liu, Z., & Butow, R. A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. Annu Rev Genet, 40, 159-185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613
- Lollgen, S., & Weiher, H. (2015). The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): lessons from homologs in different species. *Biol Chem*, *396*(1), 13-25. doi:10.1515/hsz-2014-0198
- Lu, Y., Wang, W., Wang, J., Yang, C., Mao, H., Fu, X., . . . Chen, B. (2013). Overexpression of arginine transporter CAT-1 is associated with accumulation of L-arginine and cell growth in human colorectal cancer tissue. *PLoS One*, 8(9), e73866. doi:10.1371/journal.pone.0073866
- Luo, L. F., Hou, C. C., & Yang, W. X. (2013). Nuclear factors: roles related to mitochondrial deafness. *Gene*, 520(2), 79-89. doi:10.1016/j.gene.2013.03.041
- Ma, E. H., & Jones, R. G. (2016). CELL GROWTH. (TORC)ing up purine biosynthesis. Science, 351(6274), 670-671. doi:10.1126/science.aaf1929
- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., . . . Cohen, N. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 29(3), 337-341. doi:10.1038/ng746
- Mazor, K. M., & Stipanuk, M. H. (2016). GCN2- and eIF2alpha-phosphorylationindependent, but ATF4-dependent, induction of CARE-containing genes in methionine-deficient cells. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-016-2318-9
- Meyer zum Gottesberge, A. M., Massing, T., & Hansen, S. (2012). Missing mitochondrial Mpv17 gene function induces tissue-specific cell-death pathway in the degenerating inner ear. *Cell Tissue Res*, 347(2), 343-356. doi:10.1007/s00441-012-1326-7
- Michel, S., Canonne, M., Arnould, T., & Renard, P. (2015). Inhibition of mitochondrial genome expression triggers the activation of CHOP-10 by a cell signaling dependent on the integrated stress response but not the mitochondrial unfolded protein response. *Mitochondrion*, 21, 58-68. doi:10.1016/j.mito.2015.01.005
- Momb, J., Lewandowski, J. P., Bryant, J. D., Fitch, R., Surman, D. R., Vokes, S. A., & Appling, D. R. (2013). Deletion of Mthfd11 causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 549-554. doi:10.1073/pnas.1211199110

- Morita, M., Gravel, S. P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., . . . Sonenberg, N. (2013). mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*, 18(5), 698-711. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.001
- Mounolou, J. C., Jakob, H., & Slonimski, P. P. (1966). Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes in buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 24(2), 218-224.
- Nilsson, R., Jain, M., Madhusudhan, N., Sheppard, N. G., Strittmatter, L., Kampf, C., . . . Mootha, V. K. (2014). Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun*, 5, 3128. doi:10.1038/ncomms4128
- Nogueira, C., Almeida, L. S., Nesti, C., Pezzini, I., Videira, A., Vilarinho, L., & Santorelli, F. M. (2014). Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion. *Ital J Pediatr*, 40, 34. doi:10.1186/1824-7288-40-34
- Oh, I. H., & Reddy, E. P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 18(19), 3017-3033. doi:10.1038/sj.onc.1202839
- Ohnheiser, J., Ferlemann, E., Haas, A., Muller, J. P., Werwein, E., Fehler, O., . . . Klempnauer, K. H. (2015). Programmed cell death 4 protein (Pdcd4) and homeodomain-interacting protein kinase 2 (Hipk2) antagonistically control translation of Hipk2 mRNA. *Biochim Biophys Acta*, 1853(7), 1564-1573. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.008
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016).
 The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17(10), 1374-1395.
 doi:10.15252/embr.201642195
- Parini, R., Furlan, F., Notarangelo, L., Spinazzola, A., Uziel, G., Strisciuglio, P., . . . Zeviani, M. (2009). Glucose metabolism and diet-based prevention of liver dysfunction in MPV17 mutant patients. *J Hepatol*, 50(1), 215-221. doi:10.1016/j.jhep.2008.08.019
- Park, S. K., & Jeong, S. (2016). SRSF3 represses the expression of PDCD4 protein by coordinated regulation of alternative splicing, export and translation. *Biochem Biophys Res Commun*, 470(2), 431-438. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.019
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61(9), 880-894. doi:10.1002/iub.230
- Pikman, Y., Puissant, A., Alexe, G., Furman, A., Chen, L. M., Frumm, S. M., . . . Stegmaier, K. (2016). Targeting MTHFD2 in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*, 213(7), 1285-1306. doi:10.1084/jem.20151574
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., & Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem*, 2, 61. doi:10.3389/fchem.2014.00061
- Pontarin, G., Ferraro, P., Bee, L., Reichard, P., & Bianchi, V. (2012). Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33), 13302-13307. doi:10.1073/pnas.1211289109
- Pontarin, G., Ferraro, P., Hakansson, P., Thelander, L., Reichard, P., & Bianchi, V. (2007). p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. J Biol Chem, 282(23), 16820-16828. doi:10.1074/jbc.M701310200
- Poomakkoth, N., Issa, A., Abdulrahman, N., Abdelaziz, S. G., & Mraiche, F. (2016). p90 ribosomal S6 kinase: a potential therapeutic target in lung cancer. *J Transl Med*, 14, 14. doi:10.1186/s12967-016-0768-1
- Proud, C. G. (2015). Mnks, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1849(7), 766-773. doi:10.1016/j.bbagrm.2014.10.003

- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPKactivated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol*, 60(8), 1237-1243.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., & Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J*, 18(1), 270-279. doi:10.1093/emboj/18.1.270
- Raught, B., & Gingras, A. C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. Int J Biochem Cell Biol, 31(1), 43-57.
- Reinhold, R., Kruger, V., Meinecke, M., Schulz, C., Schmidt, B., Grunau, S. D., ... Dudek, J. (2012). The channel-forming Sym1 protein is transported by the TIM23 complex in a presequence-independent manner. *Mol Cell Biol*, 32(24), 5009-5021. doi:10.1128/MCB.00843-12
- Romeo, Y., Zhang, X., & Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*, 441(2), 553-569. doi:10.1042/BJ20110289
- Rosenwald, I. B., Rhoads, D. B., Callanan, L. D., Isselbacher, K. J., & Schmidt, E. V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(13), 6175-6178.
- Rotig, A., & Poulton, J. (2009). Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. Biochim Biophys Acta, 1792(12), 1103-1108. doi:10.1016/j.bbadis.2009.06.009
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 320-344. doi:10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- Sahu, I., Sangith, N., Ramteke, M., Gadre, R., & Venkatraman, P. (2014). A novel role for the proteasomal chaperone PSMD9 and hnRNPA1 in enhancing IkappaBalpha degradation and NF-kappaB activation - functional relevance of predicted PDZ domain-motif interaction. *FEBS J*, 281(11), 2688-2709. doi:10.1111/febs.12814
- Shan, J., Zhang, F., Sharkey, J., Tang, T. A., Ord, T., & Kilberg, M. S. (2016). The C/ebp-Atf response element (CARE) location reveals two distinct Atf4-dependent, elongationmediated mechanisms for transcriptional induction of aminoacyl-tRNA synthetase genes in response to amino acid limitation. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw667
- Siddiqui, N., & Borden, K. L. (2012). mRNA export and cancer. Wiley Interdiscip Rev RNA, 3(1), 13-25. doi:10.1002/wrna.101
- Singh, P., Marikkannu, R., Bitomsky, N., & Klempnauer, K. H. (2009). Disruption of the Pdcd4 tumor suppressor gene in chicken DT40 cells reveals its role in the DNAdamage response. Oncogene, 28(42), 3758-3764. doi:10.1038/onc.2009.239
- Singh, P., Wedeken, L., Waters, L. C., Carr, M. D., & Klempnauer, K. H. (2011). Pdcd4 directly binds the coding region of c-myb mRNA and suppresses its translation. *Oncogene*, 30(49), 4864-4873. doi:10.1038/onc.2011.202
- Soda, K. (2011). The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. J Exp Clin Cancer Res, 30, 95. doi:10.1186/1756-9966-30-95
- Song, X., Zhang, X., Wang, X., Zhu, F., Guo, C., Wang, Q., . . . Zhang, L. (2013). Tumor suppressor gene PDCD4 negatively regulates autophagy by inhibiting the expression of autophagy-related gene ATG5. *Autophagy*, 9(5), 743-755. doi:10.4161/auto.24069
- Spinazzola, A., Invernizzi, F., Carrara, F., Lamantea, E., Donati, A., Dirocco, M., . . . Zeviani, M. (2009). Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inherit Metab Dis*, 32(2), 143-158. doi:10.1007/s10545-008-1038-z
- Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., Carrara, F., D'Adamo, P., Calvo, S., ... Zeviani, M. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*, 38(5), 570-575. doi:10.1038/ng1765

- Suomalainen, A., & Isohanni, P. (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord*, 20(7), 429-437. doi:10.1016/j.nmd.2010.03.017
- Tavares, M. R., Pavan, I. C., Amaral, C. L., Meneguello, L., Luchessi, A. D., & Simabuco, F. M. (2015). The S6K protein family in health and disease. *Life Sci*, 131, 1-10. doi:10.1016/j.lfs.2015.03.001
- Tibbetts, A. S., & Appling, D. R. (2010). Compartmentalization of Mammalian folatemediated one-carbon metabolism. Annu Rev Nutr, 30, 57-81. doi:10.1146/annurev.nutr.012809.104810
- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V. L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., . . .
 Borden, K. L. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J*, 28(8), 1087-1098. doi:10.1038/emboj.2009.53
- Trott, A., & Morano, K. A. (2004). SYM1 is the stress-induced Saccharomyces cerevisiae ortholog of the mammalian kidney disease gene Mpv17 and is required for ethanol metabolism and tolerance during heat shock. *Eukaryot Cell*, 3(3), 620-631. doi:10.1128/EC.3.3.620-631.2004
- Tyynismaa, H., Carroll, C. J., Raimundo, N., Ahola-Erkkila, S., Wenz, T., Ruhanen, H., . . . Suomalainen, A. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum Mol Genet*, 19(20), 3948-3958. doi:10.1093/hmg/ddq310
- Uusimaa, J., Evans, J., Smith, C., Butterworth, A., Craig, K., Ashley, N., . . . Poulton, J. (2014). Clinical, biochemical, cellular and molecular characterization of mitochondrial DNA depletion syndrome due to novel mutations in the MPV17 gene. *Eur J Hum Genet*, 22(2), 184-191. doi:10.1038/ejhg.2013.112
- van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A. D., Thoeng, A., Gao, D., ... Holst, J. (2016). ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*, 35(24), 3201-3208. doi:10.1038/onc.2015.381
- Viscomi, C., Spinazzola, A., Maggioni, M., Fernandez-Vizarra, E., Massa, V., Pagano, C., ... Zeviani, M. (2009). Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in Mpv17 knockout mice. *Hum Mol Genet*, 18(1), 12-26. doi:10.1093/hmg/ddn309
- Vlahopoulos, S. A., Logotheti, S., Mikas, D., Giarika, A., Gorgoulis, V., & Zoumpourlis, V. (2008). The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays*, 30(4), 314-327. doi:10.1002/bies.20734
- Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schutze, K., . . . Paterlini-Brechot, P. (2000). Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulatingtumor cells. *Am J Pathol*, 156(1), 57-63. doi:10.1016/S0002-9440(10)64706-2
- Wang, K., Cao, F., Fang, W., Hu, Y., Chen, Y., Ding, H., & Yu, G. (2013). Activation of SNAT1/SLC38A1 in human breast cancer: correlation with p-Akt overexpression. BMC Cancer, 13, 343. doi:10.1186/1471-2407-13-343
- Wang, S., Chen, X. A., Hu, J., Jiang, J. K., Li, Y., Chan-Salis, K. Y., . . . Wang, Y. (2015). ATF4 Gene Network Mediates Cellular Response to the Anticancer PAD Inhibitor YW3-56 in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*, 14(4), 877-888. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-1093-T
- Watatani, Y., Kimura, N., Shimizu, Y. I., Akiyama, I., Tonaki, D., Hirose, H., . . . Takahashi, Y. (2007). Amino acid limitation induces expression of ATF5 mRNA at the posttranscriptional level. *Life Sci*, 80(9), 879-885. doi:10.1016/j.lfs.2006.11.013

- Wedeken, L., Singh, P., & Klempnauer, K. H. (2011). Tumor suppressor protein Pdcd4 inhibits translation of p53 mRNA. J Biol Chem, 286(50), 42855-42862. doi:10.1074/jbc.M111.269456
- Weiher, H., Noda, T., Gray, D. A., Sharpe, A. H., & Jaenisch, R. (1990). Transgenic mouse model of kidney disease: insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell*, 62(3), 425-434.
- Wen, Y. H., Shi, X., Chiriboga, L., Matsahashi, S., Yee, H., & Afonja, O. (2007). Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast. Oncol Rep, 18(6), 1387-1393.
- Wittig, I., Braun, H. P., & Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. Nat Protoc, 1(1), 418-428. doi:10.1038/nprot.2006.62
- Yamazaki, T., Ohmi, A., Kurumaya, H., Kato, K., Abe, T., Yamamoto, H., . . . Takahashi, Y. (2010). Regulation of the human CHOP gene promoter by the stress response transcription factor ATF5 via the AARE1 site in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*, 87(9-10), 294-301. doi:10.1016/j.lfs.2010.07.006
- Yang, M., & Vousden, K. H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. Nat Rev Cancer, 16(10), 650-662. doi:10.1038/nrc.2016.81
- Yarosh, C. A., Iacona, J. R., Lutz, C. S., & Lynch, K. W. (2015). PSF: nuclear busy-body or nuclear facilitator? Wiley Interdiscip Rev RNA, 6(4), 351-367. doi:10.1002/wrna.1280
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., . . . Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J*, 29(12), 2082-2096. doi:10.1038/emboj.2010.81
- Young, L. C., & Hendzel, M. J. (2013). The oncogenic potential of Jumonji D2 (JMJD2/KDM4) histone demethylase overexpression. *Biochem Cell Biol*, 91(6), 369-377. doi:10.1139/bcb-2012-0054
- Young, M. R., Yang, H. S., & Colburn, N. H. (2003). Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pdcd4. *Trends Mol Med*, 9(1), 36-41.
- Zhao, E., Ding, J., Xia, Y., Liu, M., Ye, B., Choi, J. H., . . . Ding, H. F. (2016). KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism. *Cell Rep*, 14(3), 506-519. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.053

J. JONET - Secrétariat Sépt. BIOLOGIE F.U.N.D.P. Rue de Bruxelles 61 -5000 NAMUR (Belgique) Tél. +32(0)81.72.44.18 -22(0)81.72.44.20

25 -11- 2016

