



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie et Sciences de la Santé*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Kévin HARDONNIÈRE**

Préparée à l'unité de recherche UMR INSERM U1085 / IRSET  
Equipe Stress, Membrane et Signalisation  
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement / Pharmacie

---

***Intitulé de la thèse***

**La reprogrammation métabolique  
comme facteur de survie induit par  
les hydrocarbures aromatiques  
polycycliques, cancérogènes de  
l'environnement.**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 09 novembre 2015**

devant le jury composé de :

**Xavier COUMOUL**

PR2 - Université Paris Descartes / *Rapporteur*

**Rodrigue ROSSIGNOL**

DR2 INSERM - Université de Bordeaux II /  
*Rapporteur*

**Sébastien ROGER**

MCU HDR - Université de Tours / *Examineur*

**Anne CORLU**

DR2 CNRS - Université de Rennes 1 / *Examinatrice*

**Yannick ARLOT-BONNEMAINS**

DR2 CNRS - Université de Rennes 1 / *Examinatrice*

**Dominique LAGADIC-GOSSMANN**

DR1 CNRS - Université de Rennes 1 / *Directrice de  
thèse*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Xavier Coumoul, Rodrigue Rossignol, Anne Corlu, Yannick Arlot-Bonnemains et Sébastien Roger, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens évidemment en premier lieu à remercier mon encadrante de thèse Dominique Lagadic-Gossmann qui aura su me transmettre sa passion scientifique tout au long de ces quatre années, de par sa disponibilité, son dynamisme et sa rigueur scientifique. Je lui suis très reconnaissant d'avoir pu bénéficier d'une vraie liberté vis-à-vis de mes projets, tout en bénéficiant régulièrement de ses conseils avisés. Son optimisme et ses encouragements m'auront aussi permis de traverser les moments difficiles. Merci de m'avoir transmis toutes ces valeurs qui constitueront une base solide pour la suite.

Je remercie vivement l'UFR Pharmacie pour m'avoir attribué un financement de 3 mois qui m'a permis de terminer ma thèse dans de bonnes conditions.

Je remercie vivement toute l'équipe pour ses années passées ensemble : Dominique, Odile, Normand, Martine, Aurore, Arnaud, Isabelle et Morgane ainsi que les membres de l'équipe 3 : Sabrina, Fabienne, Manuella, Sophie, Florence, Corinne et Marie-Thérèse. Merci à Odile pour tous ses conseils (et solutions !), sa bienveillance et l'intérêt qu'elle a portés à mon travail tout au long de cette thèse. Je remercie également Normand, pour tout ce qu'il m'a transmis, l'aide qu'il a pu m'apporter ainsi que les franches parties de rigolades qui ont pu s'immiscer dans nos manips. Enfin, je remercie Morgane et Isabelle pour l'aide précieuse dont j'ai pu bénéficier à la fin de ma thèse.

Un grand MERCI à nos collaborateurs parisiens, Chantal Bennelli, Sylvie Bortoli et Elise Saunier, pour votre accueil chaleureux lors de mon séjour dans votre laboratoire, et ces échanges de bons procédés. Elise, j'espère que ton séjour à Rennes à effectuer des allez-retours entre les étages et le "sprint" final en béquilles pour récupérer le train ne t'auront pas trop traumatisée, bon courage pour ta thèse!

Je tiens à remercier Laurence, Anthony et Aubin. Merci pour ces échanges au cours de la thèse mais également pour mes deux semaines riches en science et en bonne humeur que j'ai eu l'honneur de partager avec vous lors de ma venue à Toulouse.

Je souhaite également remercier Baharia Mograbi de Nice pour son aide précieuse concernant les analyses *in silico*, ainsi que pour ses conseils pour le projet "autophagie".

Merci à la plateforme de MET, en particulier Agnès Burel pour le temps qu'elle m'a accordé.

Merci à tous les membres du bureau 402 : Amélie, Doriane, Michaël, Arnaud, Marie et Bassil, pour tous ces bons moments que nous avons partagés. Encore désolé Mica pour les défaites que je t'ai infligées au palet, « c'est pas rigolooooooooo !».

J'en profite pour saluer tous les anciens doctorants du labo que j'ai eu l'occasion de côtoyer tout au long de cette thèse: Marie Jaguin, Melinda, Marc Le Vee, Sandrine, Jérémy, Michaël, Julie, Abdullah, Mohammad, Aurore, Elise, Adéo, Jean-Philippe, Béatrice, Marc R, Anthony, Nadine, Hari, Gwendoline et Octavie.

J'en profite également pour saluer les anciens membres de La PL team: Kenji, Doriane, Amélie, Marine, Aubin, Valérie, Nadine et Sébastien.

Je tiens à remercier Rémy Pédeux pour avoir pris son rôle de tuteur très à cœur, et de s'être régulièrement assuré que tout allait bien.

Un gros bisou à Pierre, Marie (et Rosalie !) pour tous ces moments de décontraction, généralement au détour d'un bar ou d'un resto.

Je remercie tous les excellents camarades de paillasses du premier étage : Dominique Bonnier, Medjda, Mickaël, Jérémy, Fred ainsi que ceux qui officient ou ont officié de l'autre côté du couloir : Marie, Valérie, Claudie, Laetitia, Noémie, Éric, Lydie, Marc Le Vee. Leur bonne humeur et leurs conseils auront rendu cette thèse des plus agréables.

Je remercie Brigitte et son grand cœur, qui veille en permanence à ce que tout se passe pour le mieux.

Je tiens vivement à remercier Maryline pour sa gentillesse et son implication dans le bon fonctionnement du laboratoire.

Je tiens enfin à remercier les M2 ou doctorants de passage avec lesquels nous avons pu se payer de belles tranches de rigolade : Laurie, Simon, Manue, Tristan, Gwen, Quentin, Simona mais également Stefan Hol dont le passage a laissé de très bons souvenirs au sein de notre équipe.

Je remercie profondément toute ma famille qui m'a encouragé dans ce projet, avec en première ligne la petite Mo, mes parents et mon frère, pour le soutien et la motivation qu'ils m'ont prodigués.

Merci à Louis, ami de longue date, qui le premier, aura su me transmettre l'amour de la paillasse! La rigueur et la passion pour le système D et la culture cellulaire que tu m'as enseignées au cours de mon stage de M1 m'auront été d'un grand secours. J'en profite pour te féliciter pour ta titularisation, et te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Merci à Julien et Lou, pour toutes ces soirées, bouffes, balades à moto qui m'ont parfois permis d'évacuer le stress.

Enfin, un grand MERCI à tous les copains, Adrien et Lou, Quentin, Flo et Barbara, Clément, Robin et Ophé, Etienne, Jaja, Xav... et toute la clique : Natchav ! Merci à Aurélien el peruvianos, Max, Djé... Je tiens par avance à présenter mes excuses auprès de ceux que j'ai oubliés !



## Résumé

Différentes études ont montré que les facteurs liés au mode de vie, de même que le vieillissement ou l'amélioration des tests de diagnostic et de screening, ne peuvent à eux seuls expliquer l'incidence croissante des cancers dans les pays dits industrialisés. Bien que des changements de comportements aient conduit à une diminution du nombre de cancers en France, l'incidence des carcinomes hépatocellulaires est toujours en augmentation. D'autres facteurs oncogéniques, tels que l'exposition à des cancérigènes de l'environnement pourraient intervenir. Parmi ceux-ci, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dont le benzo[a]pyrène (B[a]P) est le chef de file, et qui sont retrouvés notamment dans la fumée de cigarette, les gaz d'échappements ou les aliments grillés, constituent une priorité en termes de santé publique du fait de leurs effets cancérigènes. Une caractéristique-clé commune à tous les cancers a trait à leur métabolisme énergétique particulier, basé sur la glycolyse. Cependant, rien n'est connu quant à une possible reprogrammation métabolique due aux HAP. L'objectif global de mon projet de thèse a donc été d'étudier l'impact *in vitro* du B[a]P, utilisé à faible concentration, sur le métabolisme énergétique, de préciser le rôle de la reprogrammation métabolique dans le contrôle de la balance survie/apoptose par le B[a]P et de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Nous avons d'abord identifié une production de monoxyde d'azote (NO) résultant de l'activation de la iNOS par le B[a]P, et agissant comme un signal de survie, possiblement via une hyperpolarisation mitochondriale. Nous avons ensuite démontré que le B[a]P induit une reprogrammation métabolique des cellules en favorisant un métabolisme glycolytique au détriment de la phosphorylation oxydative. Enfin, nous avons identifié IF1, l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, comme une nouvelle cible des HAP, participant à la reprogrammation métabolique et capable de promouvoir la survie sous l'effet du B[a]P. Au total, nous montrons que ces altérations du métabolisme mitochondrial promues par le B[a]P, sont à l'origine de signaux de survie dans notre modèle de cellules épithéliales hépatiques F258. Ces mécanismes pourraient ainsi contribuer à la progression tumorale sous l'effet des HAP.

**Mots-clés :** hydrocarbures aromatiques polycycliques, hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, survie, cancérogénèse, reprogrammation métabolique, EMT, migration, monoxyde d'azote, RAh, NHE1, IF1.

## Abstract

Various studies have shown that factors related to lifestyle (smoking, diet, etc.), as well as aging or even the improved efficiency of diagnostic and screening tests, cannot explain by themselves the rising incidence of cancers in the industrialized countries. Although evolution of behaviors has helped reducing the number of cancers in France, the incidence of hepatocellular carcinomas is still increasing. This alarming result could be related to other oncogenic factors such as chronic exposure to environmental carcinogens. Among these compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), including benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype carcinogen of this family, especially found in cigarette smoke, exhaust fumes or grilled food, are a priority in terms of public health due to their high carcinogenic potential. A key feature of cancer cells is related to their predominant glycolytic metabolism. However, nothing is known yet about a possible metabolic reprogramming upon PAH exposure. My PhD project has aimed at characterizing the impact of a low B[a]P concentration on energy metabolism, at clarifying the role of such a metabolic reprogramming in cell fate determination, and at elucidating the cellular and molecular basis of this phenomenon. We first identify a production of nitric oxide (NO), involving the activation of iNOS by B[a]P, and acting as a survival signal. We then demonstrate that B[a]P induces a metabolic reprogramming, thus promoting a glycolytic metabolism at the expense of oxidative phosphorylation. Finally, we identify IF1, the physiological inhibitor of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase as a new target of PAHs, which participates in the B[a]P-elicited metabolic reprogramming and survival. To sum up, we identify new alterations of mitochondrial metabolism, acting as survival signals in B[a]P-treated rat hepatic epithelial F258 cells. These mechanism could therefore contribute to tumor progression.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, mitochondrial membrane hyperpolarization, survival pathways, metabolic reprogramming, EMT, migration, nitric oxide, AhR, NHE1, IF1.

## Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	7
Table des matières .....	8
Liste des abbréviations .....	12
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux .....	17
INTRODUCTION.....	19
Contexte général.....	21
PREMIERE PARTIE .....	25
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	25
Chapitre I : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	27
I-1. Généralités .....	27
I-2. Classifications des HAP.....	28
I-2-1. Structure chimique.....	28
I-2-2. Effets délétères sur la santé humaine.....	29
I-2-3. Origine des HAP .....	29
I-2-4. Distribution dans l'environnement.....	30
I-2-5. Voies d'exposition aux HAP.....	31
I-2-5 a) L'alimentation.....	31
I-2-5 b) Le tabagisme .....	32
I-2-5 c) La pollution atmosphérique.....	33
Chapitre II : Contribution des HAP au développement du cancer .....	35
II-1 Généralités.....	35
II-2 Les différentes étapes de la cancérogenèse .....	36
II-2-1. L'initiation .....	36
II-2-2. La promotion.....	36
II-2-2. La progression.....	37
II-3. Spécificités de la cellule cancéreuse.....	37
II-4. Rôle du métabolisme des HAP dans leur cancérogénicité .....	39
II-4-1. Phase I : Fonctionnalisation .....	39
II-4-2. Phase II : Conjugaison .....	40
II-4-3. Phase III : Transport et élimination.....	40
II-5. Génotoxicité des HAP.....	41

II-6. Modulation de la balance survie/apoptose par les HAP .....	44
II-6-1. Voies de mort cellulaire induites par le B[a]P .....	45
II-6-2. Signaux de survie associés à l'exposition au B[a]P.....	48
II-7 Effets du B[a]P sur la phase de progression tumorale.....	50
II-7-1 Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) .....	50
II-7-2. Processus de migration et d'invasion cellulaires .....	50
Chapitre III : La mitochondrie et le métabolisme énergétique.....	53
III-1. La mitochondrie .....	53
III-1-1. Morphologie .....	53
III-1-2. Structure.....	54
III-1-3. Principales fonctions du métabolisme mitochondrial .....	56
III-2. Le métabolisme énergétique .....	58
III-2-1. Généralités .....	58
III-2-2 Potentiel phosphorylant et potentiel réducteur .....	58
III-2-3. Interdépendance des voies métaboliques .....	59
III-2-3. a) La phosphorylation oxydative .....	60
III-2-3. b) La glycolyse.....	61
III-2-3. c) La voie des pentoses phosphates .....	62
III-2-3. d) La $\beta$ -oxydation des acides gras.....	62
III-2-3. e) Catabolisme des acides aminés.....	63
III-2-4. La chaîne respiratoire et l'ATP synthase.....	64
III-2-4. a) Les complexes de la chaîne respiratoire .....	64
III-2-4. b) Le complexe V ou F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATPase .....	66
Régulation de l'ATP synthase.....	68
Rôles de l'ATP synthase .....	69
III-2-4. c) Le potentiel de membrane mitochondrial .....	70
III-2-5. Métabolisme aérobie <i>versus</i> métabolisme anaérobie.....	71
Chapitre IV: Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses .....	73
IV-1. L'effet Crabtree .....	73
IV-2. L'effet Warburg.....	73
IV-3. Origine et bases moléculaires de l'effet Warburg .....	76
IV-3-1. Régulation positive.....	77
IV-3-1. a) L'hexokinase II .....	77
IV-3-1. b) PI3K/Akt .....	77
IV-3-1. c) c-myc .....	78
IV-3-1 d) HIF1 $\alpha$ .....	78

IV-3-1. e) K-ras .....	79
IV-3-2. Régulation négative .....	79
IV-3-2. a) p53 .....	79
IV-3-2 b) L'AMPK .....	80
IV-3-2. c) Les sirtuines (SIRT) .....	80
IV-4. Implication de NHE1 dans la reprogrammation métabolique et la survie des cellules cancéreuses .....	82
IV-4-1. Rôle de NHE1 dans la survie et la migration .....	84
IV-4-2. Lien entre NHE1 et reprogrammation métabolique dans le cancer .....	85
IV-5. Métabolisme cancéreux oxydatif et coopération au sein du microenvironnement tumoral.	87
IV-6. Cross-talk entre reprogrammation métabolique et transition épithélio-mésenchymateuse..	88
IV-7. Impact des hydrocarbures sur le métabolisme énergétique.....	89
Chapitre V: le monoxyde d'azote (NO).....	91
V-1. Généralités.....	91
V-2. Les NO synthases .....	91
V-2-1. Activité.....	91
V-2-2. Mécanismes de régulation des NOS .....	94
V-3. Rôles physiopathologiques du NO.....	95
V-3-1. Effets du NO sur la chaîne de transport d'électrons .....	95
V-3-2. Conséquences des effets du NO sur le métabolisme mitochondrial .....	96
V-3-3. Effets promoteurs de cancer du NO.....	98
V-3-4. Lien entre NO et EMT .....	100
V-4. Impact du NO vis-à-vis de la toxicité du B[a]P .....	101
Chapitre VI: ATP Inhibitor Factor 1 (IF1), l'inhibiteur physiologique de la F0-F1 ATPase .....	103
VI-1. Structure d'IF1.....	104
VI-2. Capacité d'IF1 à promouvoir la survie .....	106
VI-3. IF1 et mitochondrie.....	107
VI-4. Contribution d'IF1 à l'acquisition du phénotype Warburg par les cellules cancéreuses ....	109
VI-5. Implication d'IF1 dans les processus de migration .....	112
VI-6. Régulation d'IF1 .....	112
Principaux objectifs de la thèse .....	117
RESULTATS .....	119
Article 1 .....	121
Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential .....	121
Article 2.....	143
AhR- and NHE1-related metabolic reprogramming determines the cell survival induced by the environmental carcinogen benzo[a]pyrene.....	143

Article 3.....	195
Role for the ATPase inhibitory factor 1 .....	195
in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype.....	195
DISCUSSION GENERALE .....	249
I. Rôle de la production de NO.....	252
I-1. Rôles respectifs du RAh et de p53 dans la production de NO.....	253
I-2. L'isoforme mitochondriale de la NO Synthase pourrait-elle jouer un rôle dans ce mécanisme? .....	255
I-3. Rôle du NO dans la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P .....	256
I-4. Une action régulatrice du NO sur la survivine serait-elle à entrevoir ?.....	257
II. Effet du B[a]P sur le métabolisme énergétique .....	258
II-1. Le RAh serait-il également un régulateur clé du métabolisme mitochondrial? .....	258
II-2. Quelle est la contribution du pH à la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P? 261	
II-3. Quelle est le rôle joué par p53 dans la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P? .....	263
III. Le peptide IF1, une cible mitochondriale des hydrocarbures.....	264
III-1. La balance AMPc/Ca <sup>2+</sup> est-elle déterminante dans la régulation d'IF1? .....	265
III-2. L'impact d'IF1 sur la dynamique mitochondriale : un élément déterminant dans la survie ? .....	267
II-3. IF1 et autophagie .....	269
IV. Quels effets du B[a]P sur la machinerie autophagique?.....	270
V. D'autres facteurs environnementaux sont par ailleurs impliqués dans l'acquisition d'un phénotype Warbug .....	276
Conclusion.....	278
BIBLIOGRAPHIE .....	279
ANNEXES .....	322
Liste des formations .....	324
Liste des congrès/communications.....	324
Liste des publications .....	325

## Liste des abréviations

(ATP)IF1: (ATP) inhibitor factor 1  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADN<sub>mt</sub>: ADN mitochondrial  
ADP: Adénosine diphosphate  
AGR2: Anterior gradient protein 2 homolog  
AKAP: A-kinase anchor proteins  
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique  
AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase  
ANT: Adénine nucléotide translocase  
ARN: Acide ribonucléique  
ARNT: Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator  
ATP: Adénosine triphosphate  
B[a]P: Benzo[a]pyrène  
Bad: Bcl-2-associated agonist of cell death  
Bcl-2: B-cell lymphoma 2  
Bcl-x<sub>l</sub>: B-cell lymphoma-extra large  
BPDE: B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde  
CACT: Carnitine-acylcarnitine translocase  
CaM: Calmoduline  
CHC: Carcinome hépatocellulaire  
CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer  
COX: Cytochrome c oxydase  
CS: Citrate synthase  
CYP: Cytochromes P450  
DMBA: Diméthylbenz[a]anthracène  
DRP1: Dynamine-related protein 1  
EGFR: Epidermal growth factor receptor  
EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse  
ERK: Extracellular signal-regulated kinase  
ERM: Ezrin, Radixin et Moesin  
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène  
FAD: Flavine adénine dinucléotide

FAK: Focal adhesion kinase  
FMN: Flavine mononucléotide  
GLUT: Transporteurs de glucose  
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3  
GST: Glutathion S-transférases  
HAP: Hydrocarbures Aromatiques Plocycycliques  
HIF: Hypoxia inductible factor  
HKII: Hexokinase II  
HMGCoA: Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase  
HRE: Hypoxia response element  
IAP: Protéines inhibitrices de l'apoptose  
IER3: Immediate early response 3  
IEX-1: Immediate early response gene X-1  
JNK1: c-Jun-terminal kinase 1  
LDH: Lactate déshydrogénase  
LOX: Lipoxygénase  
MMP: Métallo protéinase matricielle  
MOMP: Perméabilisation de la membrane externe des mitochondries  
MRP: Multi drug Resistance Protein  
mTOR: Mammalian target of rapamycin  
mtTFA: mitochondrial transcription factor A  
NAD(P)H: Nicotinamide adénine dinucléotide (Phosphate)  
NFκB: nuclear factor-kappa B  
NHE1: Echangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforme 1  
NIK: NFκB-inducing kinase  
NO: Monoxyde d'azote  
NOA1: Nitric oxide-associated protein 1  
NOS: NO synthase  
NRF-1: Nuclear respiratory factor-1  
Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
OXPHOS: Phosphorylation oxydative  
PFK-1: Phosphofructokinase-1  
PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha  
P-gp: P-glycoprotéines

pH<sub>e</sub>: pH extracellulaire  
pH<sub>i</sub>: pH intracellulaire  
pH<sub>m</sub>: pH mitochondrial  
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase  
PKA: cAMP-dependant protein kinase A  
PKM2: Pyruvate kinase subtype M2  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
PTP: Permeability transition pore  
PXR: Pregnane X receptor  
RAh: Récepteur aux hydrocarbures aromatiques  
RIP1: Receptor-Interacting Protein 1  
SATP: ATPase de surface  
SDH: Succinate déshydrogénase  
sGC: soluble guanylate cyclase  
SKIP: Sloan-Kettering institute protein  
SQR: Succinate quinone réductase  
ST: Sulfotransférase  
TCA: Cycle des acides tricarboxyliques  
TCDD: 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine  
TEP: Tomographie par émission de positions  
TGF-β: Transforming growth factor beta  
TIGAR: TP-53 glycolysis and apoptosis regulator  
TIM: Translocase of the inner membrane  
TOM: Translocase of the outer membrane  
TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand  
TRF1: TNF receptor-associated factor 1  
UCP: Uncoupling protein  
UGT: UDP-glucuronyl transférase  
US-EPA: United States Environmental Protection Agency  
VDAC: Voltage-dependent anion channel  
WAVE1: Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1  
XRE: Xenobiotic Response Element  
Δp: Force protomotrice  
ΔΨ<sub>m</sub>: Potentiel de membrane mitochondrial

## Liste des figures

FIGURE 1. STRUCTURE DES 16 HAP PRIORITAIRES DE L'AGENCE ENVIRONNEMENTALE AMERICAINE (US-EPA). LES CINQ STRUCTURES DANS LE CADRE REPRESENTENT LES HAP PRIORITAIRES, RETENUS PAR LA DIRECTIVE CADRE EUROPEENNE 98/83/EC (COELHO <i>ET AL.</i> , 2008).....	28
FIGURE 2. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA CANCEROGENESE.....	37
FIGURE 3. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ACQUISES PAR LES CELLULES AU COURS DE LA CANCEROGENESE (D'APRES HANAHAN ET WEINBERG, 2011).....	38
FIGURE 4. FIXATION DU BPDE A L'ADN .....	41
FIGURE 5. LES TROIS PRINCIPALES VOIES D'ACTIVATION METABOLIQUES DES HAP .....	42
FIGURE 6. EXEMPLES DE REGIONS BAY ET FJORD (D'APRES JARVIS ET AL., 2014).....	43
FIGURE 7. APERÇU DES PRINCIPAUX PROCESSUS CELLULAIRES ALTERES PAR LE B[A]P.....	45
FIGURE 8. SCHEMA RECAPITULATIF DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LE B[A]P DANS LES CELLUES F258 .....	46
FIGURE 9. VOIES INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE (D'APRES GALLUZI L ET AL., NAT REV NEUROSCI, 2009). .....	47
FIGURE 10. LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE EST TRES VARIABLE .....	53
FIGURE 11. CYCLE DE VIE DES MITOCHONDRIES (HYDE ET AL., 2010).....	54
FIGURE 12. INTEGRATION DES PRINCIPALES VOIES DU METABOLISME ENERGETIQUE .....	60
FIGURE 13. SCHEMA RECAPITULATIF DU CATABOLISME DES MOLECULES ENERGETIQUES. ....	63
FIGURE 14. STRUCTURE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE (ADAPTE DE YU-WAI-MAN ET AL., 2011). .....	65
FIGURE 15. STRUCTURE SCHEMATIQUE DE LA F0F1 ATPASE D'ESCHERICHIA COLI (ADAPTE DE WEBER, 2010)...	67
FIGURE 16. PRINCIPALES CONTRIBUTIONS DE L'ATP SYNTHASE A LA FONCTION MITOCHONDRIALE (D'APRES LONG <i>ET AL.</i> , 2015). .....	69
FIGURE 17. DE NOMBREUX FACTEURS CONTRIBUENT A LA REGULATION DU PHENOTYPE METABOLIQUE DES CELLULES CANCEREUSES (D'APRES CAIRNS <i>ET AL.</i> , 2011). .....	75
FIGURE 18. ORIGINE MOLECULAIRE DE LA REPROGRAMMATION METABOLIQUE DANS LES CELLULES CANCEREUSES (KROEMER & POUYSSEUR, 2008). .....	76
FIGURE 19. IMPLICATION DES SIRTUINES DANS L'EFFET WARBURG (GUARENTE, 2014). .....	81
FIGURE 20. REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE DANS LES CELLULES CANCEREUSES PAR LES PRINCIPAUX ONCOGENES (SOGA, 2013). .....	82
FIGURE 21. ROLE DU PH DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL EN LIEN AVEC LA REPOGRAMMATION METABOLIQUE (RESHKIN <i>ET AL.</i> , 2014). .....	84
FIGURE 22. PROCESSUS MITOCHONDRIAUX DEPENDANTS DU GRADIENT DE PH (RESHKIN <i>ET AL.</i> , 2014). PIC : PHOSPHATE INORGANIC CARRIER; AAC : ADP/ATP CARRIER; AGC : ASPARTATE-GLUTAMATE CARRIER; GC : GLUTAMATE CARRIER; UCP : UNCOUPLING PROTEIN. ....	86
FIGURE 23. SYMBIOSE METABOLIQUE AU SEIN DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL (SEMENZA, 2008). .....	87
FIGURE 24. REGULATION DU GENOME NUCLEAIRE PAR LE METABOLISME MITOCHONDRIAL (SHAUGHNESSY ET AL., 2014). .....	89
FIGURE 25. BIOSYNTHESE DU NO A PARTIR DE LA L-ARGININE (D'APRES FREIRE ET AL., 2009). .....	91
FIGURE 26. MODELE D'ACTIVATION DES NO SYNTHASES (D'APRES AKTAN, 2004). CAM : CALMODULIN; FAD : FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE; FMN : FLAVINE MONO NUCLÉOTIDE; H <sub>4</sub> B : TÉTRAHYDROBIOPTÉRINE... ..	92
FIGURE 27. FONCTIONNEMENT DES NO SYNTHASE (D'APRES FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). .....	93
FIGURE 28. ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA REDUCTION DES NITRITES EN NO .....	93
FIGURE 29. VERSATILITE DU NO DANS LA REGULATION DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE .....	95
FIGURE 30. ACTION DU NO AU NIVEAU DE LA CHAINE RESPIRATOIRE .....	96
FIGURE 31. IMPACT DE LA REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE PAR LE NO .....	98
FIGURE 32. CONTRIBUTION DU NO A LA PROGRESSION TUMORALE (FUKUMURA <i>ET AL.</i> , 2006). .....	100
FIGURE 33. MODALITES D'INHIBITION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE B[A]P PAR LE NO EXOGENE (D'APRES CHEN <i>ET AL.</i> , 2005). .....	102

FIGURE 34. MODELE D'INTERACTIONS DU PEPTIDE IF1( BLEU CLAIR) AVEC LA F0F1ATPASE (ADAPTE DE WALKER, 2013). .....	104
FIGURE 35. MODULATION DE LA STRUCTURE D'IF1 EN FONCTION DU PH MITOCHONDRIAL .....	105
FIGURE 36. CONTRIBUTION D'IF1 AU PROCESSUS DE CANCEROGENESE .....	110
FIGURE 37. MODE DE REGULATION PAR PHOSPHORYLATION DU PEPTIDE IF1 PAR L'INTERMEDIAIRE DE LA VOIE B-ADRENERGIQUE (GARCIA-BERMEDEZ ET AL., 2015). .....	116
FIGURE 38. SCHEMA BILAN MODELISANT LA REPROGRAMMATION METABOLIQUE INDUITE PAR LE B[A]P ET IMPLIQUEE DANS LA SURVIE DANS LES CELLULES F258. ....	252
FIGURE 39. EFFET DU CPTIO (25 $\mu$ M), UN PIEGEUR DE NO, SUR L'ACCUMULATION DE LACTATE EXTRACELLULAIRE APRES 48 HEURES D'EXPOSITION AU B[A]P. N=3.....	256
FIGURE 40. L'EFFET DU B[A]P SUR LE CONTENU MITOCHONDRIAL EN RAH DANS LA LIGNEE F258 POURRAIT AVOIR UN ROLE PREPONDERANT DANS L'ACTIVITE METABOLIQUE DE L'ORGANITE. ....	260
FIGURE 41. EFFET DU B[A]P SUR L'OXYDATION DE LA GLUTAMINE. (N=3) .....	264
FIGURE 42. EFFET DU B[A]P (50 nM <i>VERSUS</i> 1 $\mu$ M) SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS AUTOPHAGIQUES P62 ET LC3 ANALYSEE PAR WESTERN BLOTTING DANS LA LIGNEE F258. ....	271
FIGURE 43. EFFET DE 24H D'EXPOSITION AU B[A]P SUR L'ACCUMULATION DES VACUOLES AUTOPHAGIQUES.....	272
FIGURE 44. EFFET DE 24H D'EXPOSITION AU B[A]P SUR L'ACCUMULATION DES AGGRESOMES.....	272
FIGURE 45. ANALYSE DE L'IMPACT DU B[A]P SUR L'ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE PAR MET.....	273
FIGURE 46. EFFET DU B[A]P SUR L'EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2.....	274
FIGURE 47. REGULATION DE NRF2 PAR L'AUTOPHAGIE, KEAP1 ET P62 (ADAPTE DE WHITE, 2012). ....	274
FIGURE 48. LES POLLUANTS DE L'ENVIRONNEMENT CONTRIBUENT ACTIVEMENT A L'ETABLISSEMENT DU PHENOTYPE CANCEREUX (GOODSON, 2015).....	277

## Liste des tableaux

TABLEAU 1. . CONCENTRATION UBIQUITAIRE MOYENNE DE BENZO[A]PYRENE DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DE L'ENVIRONNEMENT (INERIS, 2006).....	30
TABLEAU 2. CONSOMMATION MOYENNE DE DIFFERENTES CLASSES D'ALIMENTS ET LEURS CONCENTRATIONS ASSOCIEES EN HYDROCARBURES (THE EFSA JOURNAL, PAH IN FOOD, 2008).....	32
TABLEAU 3. VOIES D'EXPOSITION AU BENZO[A]PYRENE POUR L'HOMME EN EUROPE.....	34



# **INTRODUCTION**



## Contexte général

Différentes études ont montré que les facteurs liés au mode de vie (tels que le tabagisme, la consommation d'alcool, le régime alimentaire), de même que le vieillissement ou l'amélioration des tests de diagnostic et de screening, ne peuvent à eux seuls expliquer l'incidence croissante des cancers dans les pays dits industrialisés ; et ce, d'autant plus que les comportements vis-à-vis de l'alcool, et du tabac ont évolué ces dernières années, avec un recul du tabagisme et de la consommation d'alcool. Bien que ces changements de comportements aient conduit à une diminution du nombre de cancers du tractus aéro-digestif supérieur et de l'œsophage liés à l'alcool, notamment en France, une augmentation de l'incidence des carcinomes hépatocellulaires a cependant été plus récemment notée (OCDE Health data, 2004). Ceci pourrait être la conséquence d'autres facteurs oncogéniques, tels que l'exposition à des cancérogènes de l'environnement. D'une manière plus générale, ce type d'exposition involontaire pourrait contribuer à l'incidence croissante de différents types de cancers dans les pays industrialisés. Ainsi, d'après des données obtenues dans le cadre du Plan National Santé-Environnement (PNSE, 2004; <http://www.ecologie.gouv.fr/Rapport-final-de-la-Commission-d.html>), environ 7 à 20% des décès par cancer seraient dus aux facteurs environnementaux (Goodson *et al.*, 2015). Ceci souligne très clairement la nécessité d'accroître nos connaissances sur l'impact des cancérogènes environnementaux sur la santé, et ce, dans le but de mieux appréhender la cancérogenèse et de répondre aux attentes en matière de santé publique.

L'élimination complète des expositions aux cancérogènes environnementaux, synthétiques ou naturels, étant techniquement irréalisable, l'exposition de l'Homme aux toxiques chimiques est donc inévitable, due à la contamination de l'air, de l'eau et des aliments. Tandis que les facteurs associés au mode de vie sont bien identifiés et donc accessibles aux études épidémiologiques, il n'en est pas de même des cancérogènes environnementaux, et ce, du fait de leur multitude, diversité et diffusion dans notre environnement. Il est donc beaucoup moins aisé de réaliser des études épidémiologiques chez l'Homme sur l'impact de ces facteurs environnementaux en utilisant des méthodes épidémiologiques classiques, d'où la nécessité de développer des études sur les effets biologiques et toxicologiques de ces molécules.

Parmi ces facteurs environnementaux, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), retrouvés notamment dans la fumée de cigarette, les gaz d'échappements ou les aliments grillés, constituent une priorité en termes de santé publique du fait de leurs effets cancérigènes. En effet, le benzo[a]pyrène (B[a]P), représentant prototype de cette famille, est classé dans le groupe 1 des cancérigènes par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), c'est-à-dire cancérigène pour l'Homme. Un individu non-fumeur est principalement exposé aux HAP lors de l'ingestion d'aliments grillés ou de céréales (3 à 15 µg/personne/jour). Dans ce contexte, la consommation fréquente de ces aliments serait un facteur de risque de cancers chez l'homme (Anderson *et al.*, 2002; Foran *et al.*, 2005). Il a d'ailleurs plus spécifiquement été observé chez l'animal que l'ingestion de B[a]P entraînerait la formation d'adduits à l'ADN dans le foie et le tube digestif, et induirait la formation de cancers en particulier des organes digestifs (Strickland & Groopman, 1995; Dunn, 1983; Helleberg *et al.*, 2001; Wester *et al.*, 2012). Par ailleurs, cet apport de HAP est encore plus important chez les fumeurs, lors de l'exposition aux fumées de cigarettes (Menzie *et al.*, 1992).

Les mécanismes sous-tendant l'action cancérigène des HAP semblent multiples. En effet, ils pourraient résulter à la fois d'une action initiatrice bien documentée, car les HAP sont de puissants composés mutagènes (Melendez-Colon *et al.*, 1999). Une action promotrice de tumeurs a également été décrite; en effet, les HAP pourraient conférer un avantage sélectif aux cellules initiées par rapport aux cellules normales, par le biais de l'induction de l'expression de facteurs de croissance ou de mécanismes anti-apoptotiques dans ces cellules initiées, et/ou d'un effet toxique vis-à-vis des cellules normales (Bock & Köhle, 2005). Les HAP favoriseraient également les processus de progression tumorale et de métastases, en favorisant la motilité cellulaire (Diry *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2013) ou en agissant sur les composants de la matrice extracellulaire (Hillegass *et al.*, 2006). Ce sont de plus des agents altérant la réponse immunitaire (Szczeklik *et al.*, 1994; Lecureur V *et al.*, 2005), ce qui pourrait aussi contribuer indirectement à leurs effets cancérigènes, notamment à la phase de progression en affaiblissant l'immunité anti-tumorale.

Le mécanisme moléculaire impliqué dans les effets cancérigènes des HAP a été relié historiquement au récepteur aux hydrocarbures aromatiques (Récepteur Ah ou RAh). Les HAP se lient à ce récepteur dans le cytoplasme, entraînent sa translocation nucléaire, sa liaison à la protéine ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) puis sa liaison sur des éléments spécifiques (appelés XRE pour « Xenobiotic Response Element ») situés dans la

partie 5' flanquante des gènes répondeurs (Bacsi *et al.*, 1995; Go *et al.*, 2015). Il en résulte l'activation de la transcription de ces gènes cibles. Parmi ceux-ci, les cytochromes P-450 (CYP) 1A1 et 1B1 sont importants à considérer car ils sont responsables de la formation de métabolites électrophiles des HAP, à l'origine des adduits à l'ADN responsables du processus d'initiation du processus cancéreux. Ces adduits pourraient aussi favoriser la phase de promotion tumorale en ayant un effet pro-apoptotique vis-à-vis des cellules normales et en conférant, de ce fait, un avantage sélectif aux cellules « initiées » (Marlowe & Puga, 2005). A cet égard, les travaux réalisés jusqu'ici par notre équipe se sont attachés à étudier les processus apoptotiques induits par le B[a]P dans des modèles hépatiques. Nous avons ainsi mis en évidence dans les cellules de la lignée épithéliale hépatique F258, l'implication de deux voies majoritaires dans les effets apoptotiques de cette molécule : la voie génotoxique impliquant l'activation de la protéine p53 (Huc *et al.*, 2004, 2007) et une voie non génotoxique basée sur l'activation du transporteur NHE1 ; cette dernière résulte d'un remodelage membranaire dépendant à la fois de l'activation du RAh et de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) liée au métabolisme du B[a]P (Huc *et al.*, 2004, 2007; Tekpli *et al.*, 2010). Ces deux voies ont par ailleurs été décrites pour converger afin d'induire un dysfonctionnement mitochondrial (Huc *et al.*, 2006, 2007; Dendelé *et al.*, 2012).

Nos travaux antérieurs portant sur le remodelage membranaire indiquaient également des altérations du métabolisme des lipides, sous la dépendance du RAh et des ERO (Tekpli *et al.*, 2010). De plus, nous avons montré que différentes protéines, telles que l'hexokinase II, c-myc et GSK3, connues pour jouer un rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique (Kotliarova *et al.*, 2008; Soga, 2013) étaient aussi la cible du B[a]P (50 nM) dans notre modèle d'étude (Huc *et al.*, 2007; Dendelé *et al.*, 2012). Or, une autre caractéristique commune à tous les cancers a trait à leur métabolisme énergétique particulier. En effet, pour survivre en condition drastique (absence d'oxygène), la cellule cancéreuse voit son métabolisme énergétique modifié par rapport à une cellule normale, avec une reprogrammation métabolique vers la glycolyse, d'où une accumulation de lactate dans le milieu extracellulaire associée à une acidification extracellulaire. Cette reprogrammation métabolique, appelée effet Warburg, constitue une des caractéristiques-clés des cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2011; Ward & Thompson, 2012). Cependant, rien n'est connu quant aux effets des HAP sur la glycolyse ; à notre connaissance, seule une étude ancienne indique une activité augmentée de différentes enzymes de la glycolyse, à savoir l'hexokinase, la phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la lactate deshydrogenase, dans

les poumons de souris traitées pendant 28 jours par différents cancérogènes dont le B[a]P ou le diméthylbenz[a]anthracène (DMBA), un autre HAP (Rády *et al.*, 1980). Dans ce contexte, outre ses effets apoptotiques qui interviendraient dans la phase de promotion des tumeurs, le B[a]P pourrait promouvoir la survie et la prolifération via une reprogrammation métabolique des cellules vers un métabolisme glycolytique aérobie (effet Warburg), ce qui pourrait aussi participer à la phase de progression sous l'effet du B[a]P.

Enfin, nos travaux précédents suggèrent une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans les cellules épithéliales hépatiques de la lignée F258 sous l'effet du B[a]P (Huc *et al.*, 2003). Or cette hyperpolarisation serait associée à la reprogrammation métabolique identifiée dans les tumeurs (Hockenbery, 2010) et jouerait un rôle dans la croissance tumorale (Heerdt *et al.*, 2006). Dans ce contexte, le potentiel mitochondrial pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans les stratégies anticancéreuses (Fantin *et al.*, 2002). D'où l'intérêt de mieux préciser l'impact de faibles concentrations d'hydrocarbures sur la fonction énergétique mitochondriale. C'est dans ce cadre que mon travail de thèse a été réalisé.

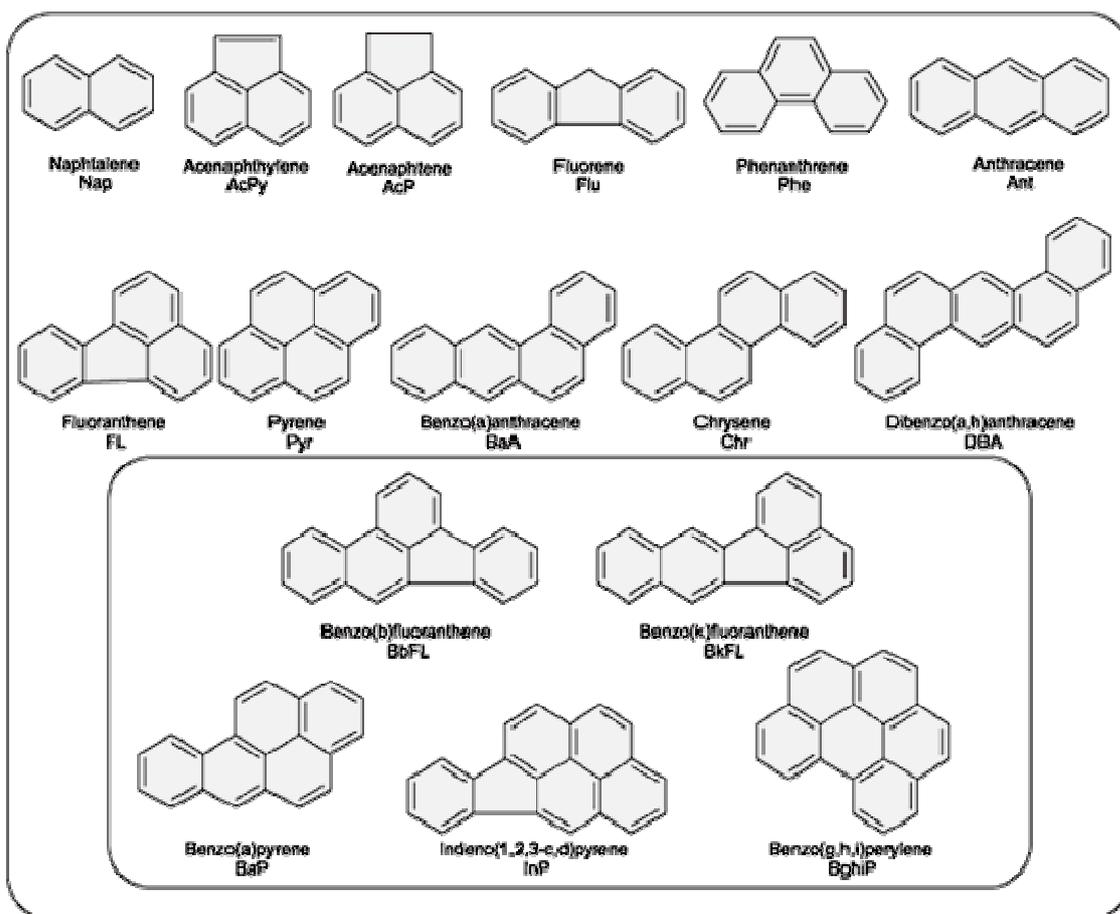
**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Chapitre I : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

## I-1. Généralités

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont une classe de produits chimiques neutres, apolaires, présents naturellement dans l'environnement, essentiellement au sein des composés fossiles tels que le charbon, le pétrole, ou encore la tourbe. Ils sont formés lors des processus de combustion des matières organiques et résultent de la condensation de cycles benzéniques. Sous cette appellation, de nombreuses molécules organiques différentes ont été clairement identifiées. Elles comprennent un minimum de deux cycles aromatiques, et sont exclusivement composés d'atomes de carbone et d'hydrogène. Cependant, des groupements de nature différente peuvent venir se substituer à ces cycles. Le nombre théorique de HAP susceptibles d'être retrouvés dans l'environnement apparaît donc infiniment plus important, d'autant que le nombre d'isomères va croître à mesure que les structures vont se complexifier. On rencontre ainsi plus de 1500 molécules, dans leur forme native ou substituée (NTP, 2012). Cette diversité dans la structure chimique des HAP va ainsi leur conférer des propriétés physico-chimiques et biologiques très variées. La multitude d'entités différentes identifiées au sein des HAP a conduit l'Agence Environnementale Américaine (US-EPA) à définir une liste prioritaire de 16 représentants (Figure 1). Cette liste regroupe les HAP les plus étudiés et à l'origine de problèmes environnementaux et sanitaires majeurs en lien avec leur toxicité (INERIS, 2005). L'OMS a quant à elle décidé de concentrer son expertise sur seulement six représentants majeurs parmi ces HAP récurrents : le fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[ghi]pérylène et enfin l'indeno[1,2,3-cd]pyrène (WHO, 2003).



**Figure 1. Structure des 16 HAP prioritaires de l'Agence Environnementale Américaine (US-EPA).** Les cinq structures dans le cadre représentent les HAP prioritaires, retenus par la directive cadre européenne 98/83/EC (Coelho *et al.*, 2008).

## I-2. Classifications des HAP

### I-2-1. Structure chimique

Du point de vue structural, la classification des HAP est basée sur le nombre de noyaux condensés. La plupart des HAP sont constitués de 2 à 6 cycles avec une masse moléculaire moyenne allant de  $78 \text{ g.mol}^{-1}$  ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ) à  $1792 \text{ g.mol}^{-1}$  ( $\text{C}_{144}\text{H}_{64}$ ) (Lafleur *et al.*, 1996). Cependant, la majorité des HAP identifiés ont un poids moléculaire compris entre  $128 \text{ g.mol}^{-1}$  (pour le naphthalène de formule brute  $\text{C}_{10}\text{H}_8$ ), et plus de  $300 \text{ g.mol}^{-1}$  (pour le coronène de formule brute  $\text{C}_{24}\text{H}_{12}$ ). On distingue ainsi les HAP légers pouvant contenir jusqu'à 3 cycles condensés, des HAP lourds possédant au minimum quatre cycles benzéniques (Edwards, 1983).

### **I-2-2. Effets délétères sur la santé humaine**

L'IARC (International Association for Research on Cancer) ou CIRC est une agence de recherche sur le cancer de l'organisation mondiale de la santé (OMS) basée à Lyon. Cette institution œuvre notamment à identifier les facteurs environnementaux impliqués dans le développement de cancers chez l'homme, afin de coordonner des stratégies scientifiques de lutte contre cette maladie. Elle a ainsi classé de nombreux HAP, seuls ou en mélange, en fonction de leurs effets délétères sur la santé humaine, et notamment, de leur capacité à induire des cancers. Le B[a]P, chef de file de ces composés et molécule étudiée dans cette thèse, possède le plus fort potentiel cancérigène, et est, de ce fait, classé dans le groupe 1, c'est-à-dire cancérigène certain pour l'homme.

Composé de cinq cycles aromatiques, le B[a]P possède une masse molaire de  $252,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , et fait partie des HAP les plus étudiés. Ce dernier se trouve en proportion relativement constante au sein des mélanges d'hydrocarbures, et représente en général 10% en masse de ces mélanges. Sa distribution quasi-ubiquitaire, ainsi que son classement dans le groupe 1 du CIRC, légitime largement son statut de molécule prototype au sein des HAP.

### **I-2-3. Origine des HAP**

Les HAP sont des polluants organiques d'origines multiples, à la fois naturelles et anthropiques. Bien que présents naturellement dans l'environnement, ils sont majoritairement produits lors de processus pyrolytiques, en raison de la combustion incomplète de matières organiques (charbon, bois, huile, gaz, etc.). La pyrolyse de matières organiques, lors de phénomènes naturels comme les feux de forêts ou les épisodes volcaniques, génère naturellement des HAP. Cependant, ces processus sont quantitativement négligeables comparativement aux sources anthropogéniques (Boström *et al.*, 2002), même si ces phénomènes naturels peuvent ponctuellement générer de gros volumes de HAP (Nicolaou *et al.*, 1984). En effet, ce sont surtout les activités humaines (industries, chauffages domestiques et transports) qui vont être à l'origine d'une libération massive de HAP dans notre environnement.

#### I-2-4. Distribution dans l'environnement

Ces polluants ubiquitaires sont retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement. Après leur libération dans l'atmosphère, on va ainsi retrouver les HAP sous forme gazeuse et particulaire, adsorbés sur d'autres particules atmosphériques. En général, les HAP légers, possédant au maximum 3 cycles condensés, ont la solubilité et la volatilité les plus élevées, et sont plus à même d'être retrouvés en phase gazeuse. A l'inverse, les HAP de haut poids moléculaire vont se retrouver principalement en phase particulaire. La répartition des HAP au sein de ces deux phases apparaît d'une importance capitale puisqu'elle va conditionner les modalités de distribution de ces particules dans notre environnement, ainsi que leur impact sur notre santé. Les concentrations moyennes de B[a]P dans l'environnement sont données en exemple dans le tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1. . Concentration ubiquitaire moyenne de benzo[a]pyrène dans les différents compartiments de l'environnement (INERIS, 2006)**

Milieu	Concentration
Air	< 10 pg/m <sup>3</sup> (1)
Eau	
-eaux de surface	
mers	0,01 à 0,1 ng/L(1)
rivières	≈ 1 ng/L(1)
-eaux de pluie	≈ 10 ng/L(1)
Sol	≈ 2 µg/kg(1)
Sédiments	
-sédiments marins	≈ 1 µg/kg(1)
-sédiments de rivières	(2)

(1) Valeur estimée sur la base de données fournies par HSDB (2000).

(2) Les données disponibles (0,2 ng/kg à 4,5 mg/kg) sont trop dispersées pour fixer une valeur.

Ces composés bénéficient d'un cycle biogéochimique complexe, et les données qui permettraient de préciser leurs modalités de circulation à l'échelle globale sont encore insuffisantes (Ramade, 2007). Enfin, malgré la capacité des animaux terrestres et aquatiques à métaboliser les HAP, ces molécules peuvent être bioaccumulées au sein de la chaîne alimentaire : on a ainsi recensé des facteurs de concentration proche de 1000 pour le B[a]P dans certains réseaux trophiques (Meador *et al.*, 1995; Ramesh *et al.*, 2004; Ramade, 2007).

### **I-2-5.Voies d'exposition aux HAP**

En raison de la multiplicité des sources d'émission et de leur distribution ubiquitaire, les voies d'exposition aux HAP pour l'homme sont multiples. L'homme est généralement exposé à un mélange complexe d'hydrocarbures *via* son environnement. Principalement émis dans l'atmosphère, les HAP vont ensuite être soumis à des phénomènes de transport et de dispersion qui vont les distribuer dans notre environnement. Les niveaux d'exposition sont ainsi fortement dépendant du mode de vie (vie urbaine ou à proximité de grands pôles industriels, modes de cuisson privilégiés, chauffage au bois, exposition professionnelle). Pour les individus non fumeurs les principales voies d'exposition sont l'alimentation et l'air inhalé, particulièrement au sein d'un environnement urbain pollué. Les hydrocarbures peuvent pénétrer dans l'organisme par voie digestive, par inhalation et par voie cutanée, même si cette dernière est moindre chez l'homme, impliquée dans environ 3% des entrées d'hydrocarbures dans l'organisme. L'absorption par les voies digestives et respiratoires est rapide (IARC, 2010). Les principales voies d'exposition sont détaillées ci-dessous.

#### **I-2-5 a) L'alimentation**

L'alimentation constitue la voie d'exposition principale aux HAP, avec un apport moyen pour le seul B[a]P de l'ordre de 235 ng par jour et par personne. La nourriture peut être contaminée par voie environnementale, directement pendant la phase de production mais également lors de la transformation industrielle des produits (chauffage, séchage, fumage, torréfaction, cuisson à très hautes températures). Enfin, certains modes de cuisson favorisent la formation des hydrocarbures. C'est le cas notamment de la cuisson au barbecue où le contact direct avec les flammes favorise leur production. Les recommandations de l'EFSA (2008) auprès du grand public visent donc à privilégier des temps de cuissons plus importants, mais à de plus faibles températures, afin de minimiser leur formation. De même, il est fortement suggéré de laver et/ou éplucher les fruits et légumes afin d'éliminer au maximum les contaminants présents à leur surface.

**Tableau 2. Consommation moyenne de différentes classes d'aliments et leurs concentrations associées en hydrocarbures (The EFSA journal, PAH in food, 2008).**

Category	Consumption	Exposure			
	Median g/day	BaP ng/day	PAH2 ng/day	PAH4 ng/day	PAH8 ng/day
Cereals and cereal products	257	67	129	257	393
Sugar and sugar products including chocolate	43	5	13	25	39
Fats (vegetable and animal)	38	26	112	177	239
Vegetables, nuts and pulses	194	50	124	221	378
Fruits	153	5	40	75	87
Coffee, tea, cocoa (expressed as liquid)	601	21	55	106	156
Alcoholic beverages	413	4	12	25	74
Meat and meat products and substitutes	132	42	107	195	279
Seafood and seafood products	27	36	140	289	421
Fish and fishery products	41	21	84	170	210
Cheese	42	6	12	20	30

PAH = Polycyclic aromatic hydrocarbon

Il est important de souligner qu'en raison de la présence quasi-ubiquitaire des HAP dans les produits alimentaires, les aliments qui exposent le plus la population ne sont pas nécessairement ceux présentant la concentration la plus élevée d'hydrocarbures, mais plutôt les aliments quantitativement les plus consommés, en premier lieu les céréales (Tableau 2). Enfin, l'individu est également exposé à de faibles doses d'hydrocarbures via l'eau de boisson, en moyenne 1 ng par jour (The EFSA journal, PAH in food, 2008).

### I-2-5 b) Le tabagisme

Chez un individu fumeur, la consommation journalière d'un paquet de cigarettes, soit environ 20 cigarettes par jour, va augmenter considérablement l'apport global en HAP, avec un apport d'environ 105 ng par jour pour le seul B[a]P. Une analyse épidémiologique, au cours de laquelle la quantité de B[a]P a été mesurée dans le sérum sur des cohortes de femmes exposées ou non à la fumée de cigarettes, a permis de compléter les données d'exposition (Neal *et al.*, 2008). Il a ainsi été recensé des valeurs de l'ordre de  $0,22 \pm 0,15 \text{ ng.mL}^{-1}$  (soit entre 0,28 et 1,46 nM) pour des femmes non fumeuses, tandis que des fumeuses régulières présentaient des niveaux nettement supérieurs de  $0,98 \pm 0,56 \text{ ng.mL}^{-1}$  (soit entre 1,67 et 6,2 nM). Les femmes exposées par le biais d'un tabagisme passif présentaient quant à elles un niveau d'exposition intermédiaire, mais néanmoins quasiment doublé par rapport aux niveaux détectés dans la population témoin, avec une valeur moyenne aux alentours de  $0,40 \pm 0,13 \text{ ng.mL}^{-1}$  (soit entre 1,07 et 2,09 nM).

### **I-2-5 c) La pollution atmosphérique**

La quantité de HAP dans l'atmosphère est très variable en fonction de la zone géographique considérée. Parmi les principaux secteurs incriminés, on distingue principalement des émissions liées à l'industrie, au chauffage domestique et au transport. Toutes les activités pratiquant la pyrolyse de matières organiques sont concernées. En France, en 2000, le rejet total d'hydrocarbures dans l'environnement a été estimé à plus de 320 tonnes (CITEPA, 2000).

Le chauffage domestique (fuel, gaz, bois et charbon) constitue la principale voie d'émission de HAP dans l'atmosphère avec environ 46% du rejet total. Il faut souligner ici que cette modalité de production de HAP a en plus la particularité d'être saisonnière; près de la moitié du rejet total d'hydrocarbures est ainsi réalisée sur une période relativement restreinte (Caricchia *et al.*, 1995). La quantité d'hydrocarbures rejetée par le chauffage des foyers est donc également très dépendante de la zone géographique, et en particulier du climat, augmentant ainsi proportionnellement avec la distance à l'équateur et l'altitude. De même le niveau socio-économique dans une zone géographique donnée est également à prendre en compte, puisqu'il va être fortement corrélé au mode de chauffage privilégié.

Les moyens de transport représentent le second contributeur, fonctionnant en très grande majorité à l'énergie fossile. Ils sont très impliqués dans l'émission de ces composés organiques dans l'environnement, puisqu'ils génèrent à eux seuls plus d'un cinquième des HAP produits sur notre territoire. De plus, la plus grande partie de cette pollution est générée en milieu urbain et suburbain, et représente de ce fait une part importante des HAP inhalés par la population (CITEPA, 2013).

Les industries métallurgiques (cokeries, hauts fourneaux sidérurgiques, fonderies, etc.), les centrales de production d'énergie (centrales thermiques, usines de production de gaz) ainsi que les cimenteries contribuent à hauteur de 17,6% à la production globale de HAP en France. L'industrie du bois utilise également des mélanges dont la composition est très riche en HAP (jusqu'à 85% de leur masse totale) pour assurer la conservation de ses matières premières. Ces différentes industries vont ainsi être à l'origine de l'exposition professionnelle aux HAP. Leurs employés vont pouvoir être exposés à des doses d'hydrocarbures supérieures d'un facteur  $10^5$  aux valeurs de référence ne dépassant généralement pas le  $\text{ng.m}^3$ .

**Tableau 3. Voies d'exposition au benzo[a]pyrène pour l'homme en Europe**

(Adapté de The EFSA journal, 2008)

<b>Voies d'exposition</b>	<b>Benzo[a]pyrène (en ng par jour)</b>
<b>Alimentation</b>	<b>185-255</b>
<b>Tabagisme (actif/passif)</b>	<b>105/40</b>
<b>Air inhalé</b>	<b>20</b>
<b>Eau</b>	<b>0,2-2</b>

Comme en témoignent les données présentées ci-dessus dans le tableau 3 pour le seul B[a]P, l'apport moyen en HAP pour l'homme n'est pas négligeable. Les niveaux d'exposition, en lien avec les effets délétères de ces molécules sur la santé, et en particulier leur capacité à promouvoir le cancer, ainsi que la difficulté à limiter l'exposition de la population à ces composés, soulignent l'importance capitale de mener des études, afin de mieux caractériser leurs modes d'action.

## **Chapitre II : Contribution des HAP au développement du cancer**

### **II-1 Généralités**

Le cancer est un problème de santé publique majeur. Cette pathologie se caractérise par une prolifération incontrôlée des cellules transformées, et résulte d'un ensemble de mutations génomiques, acquises ou induites par divers stress environnementaux. Selon l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité. Ainsi, en 2012, on estimait le nombre de nouveaux cas à environ 14 millions à l'échelle planétaire, dont environ 355 000 en France (Institut National du cancer, 2015). Dans le même temps, on dénombrait plus de 8 millions de décès liés à cette maladie dans le monde (WCR, IARC, 2014). Le cancer du foie fait partie des cancers les plus agressifs et les plus représentés, au troisième rang des cancers du point de vue de la mortalité, avec environ 800 000 décès par an au cours de l'année 2012 (OMS, 2015). Les facteurs de risque liés au mode de vie sont relativement bien connus (alcoolisme, tabagisme, obésité, mauvaise pratique alimentaire, manque d'exercice physique, pollutions urbaines, utilisation de combustibles solides dans les habitations, etc.). On estime ainsi que plus de 30% de la mortalité due au cancer pourraient être évités en ciblant ces principaux facteurs. Néanmoins, les prévisions de l'OMS demeurent alarmantes, puisqu'on estime que l'incidence de cette pathologie devrait encore croître d'environ 70% au cours des deux prochaines décennies. Le nombre de nouveaux cas par an pourrait alors se chiffrer à 22 millions en 2035. Un grand nombre d'entre eux pourraient être la conséquence d'autres facteurs oncogéniques, tels que l'exposition à des cancérogènes de l'environnement. En effet, contrairement aux facteurs associés au mode de vie qui sont relativement bien identifiés, la compréhension globale de l'impact de ces composés sur l'incidence des cancers est beaucoup plus complexe. De fait, il est très difficile de contrecarrer l'impact de ces composés par de simples mesures de prévention, d'autant que l'élimination complète des expositions aux cancérogènes environnementaux est techniquement irréalisable. Il est donc primordial de caractériser les effets biologiques et toxicologiques de ces molécules, afin d'identifier leur contribution à ces pathologies, et ainsi répondre aux attentes en matière de santé publique.

On distingue trois étapes séquentielles dans la formation d'un cancer : l'initiation, la promotion et la progression (cf. Figure 2), qui nous le verront plus loin, sont la cible du B[a]P.

## **II-2 Les différentes étapes de la cancérogenèse**

### **II-2-1. L'initiation**

La cellule va pouvoir subir des agressions aussi bien endogènes (erreurs de réplication de l'ADN, radicaux libres, etc.) qu'exogènes *via* l'environnement, qui va constituer une source importante de stress, auxquels nous sommes exposés en permanence. L'origine de ces stress est diverse: exposition aux cancérogènes chimiques (xénobiotiques), aux agents physiques (rayonnements) ou encore aux virus oncogènes (Adénovirus); ceci favorisant l'apparition d'altérations de l'ADN. Cependant, ces agressions ne conduisent pas systématiquement à des altérations génétiques. En effet, de nombreux systèmes de défense permettent aux cellules de neutraliser les agents responsables de ces agressions (e.g. systèmes anti-oxydants). Cependant, malgré tous ces systèmes de défense, des altérations de l'ADN peuvent survenir. La plupart du temps, ces modifications sont détectées puis corrigées par les systèmes de réparation de l'ADN. Toutefois, lorsque ces lésions à l'ADN ne sont pas réparées, elles vont pouvoir générer des mutations irréversibles, ce processus constituant l'étape d'initiation. La nature de la mutation va éventuellement permettre le développement d'une tumeur. Les composés initiateurs, capables de promouvoir cette étape, sont qualifiés de génotoxiques.

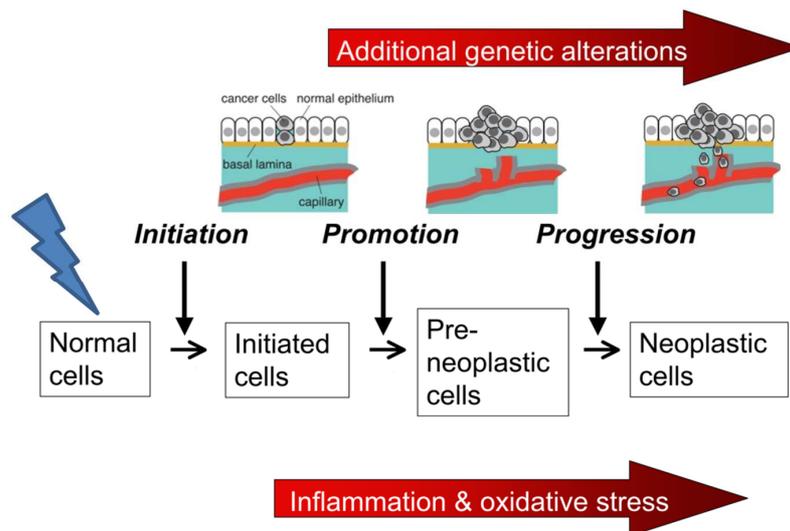
### **II-2-2. La promotion**

Cette seconde étape va permettre la prolifération des cellules pré-néoplasiques sous l'action d'un agent promoteur. Ce dernier va ainsi favoriser l'expansion clonale des cellules préalablement initiées. Lors de cette étape, l'homéostasie entre prolifération et mort cellulaire régnant au sein du tissu va être perturbée. En effet, sous l'impulsion de l'agent promoteur et de nouvelles mutations, les cellules pré-néoplasiques vont alors pouvoir contourner les signaux qui régulent habituellement leur croissance et leur division, échappant aux processus de mort cellulaire programmée, d'où une multiplication anarchique. Ce changement phénotypique va ainsi leur conférer un avantage sélectif par rapport aux cellules saines, leur permettant de proliférer en dépit d'un environnement encore mal vascularisé (hypoxie, apports insuffisants en nutriments, etc.). Lors de cette étape, les cellules pré-néoplasiques ont encore un aspect morphologique normal, et sont toujours confinées au sein de la tumeur primitive. A ce stade, la tumeur est dite bénigne. Le foie étant l'organe chargé de filtrer et de détoxifier l'organisme, il est donc une cible majeure des polluants de l'environnement. Dans cet organe soumis à des agressions répétées, la progression des cellules pré-néoplasiques est ainsi facilitée par l'état

d'inflammation chronique (Chen *et al.*, 2015), ainsi que par la prolifération compensatoire excessive des cellules lors de la régénération hépatique (Qiu *et al.*, 2011; Feng, 2012).

## II-2-2. La progression

C'est lors de cette troisième étape que la masse néoplasique va se transformer pour acquérir le statut de cancer. L'instabilité génomique et chromosomique, modélisée par de nouvelles modifications génétiques, va générer des clones cellulaires de plus en plus agressifs, à l'origine de la malignité et de l'invasion tumorales. En effet, lors de cette phase, la tumeur, structurellement et fonctionnellement non intégrée aux tissus environnants, va stimuler la néoangiogenèse pour irriguer le tissu tumoral et former des métastases. La tumeur va alors commencer à altérer fortement le fonctionnement du tissu dans lequel elle se développe. Les capacités de migration nouvellement acquises vont enfin lui permettre de se disséminer dans l'organisme *via* la circulation sanguine.



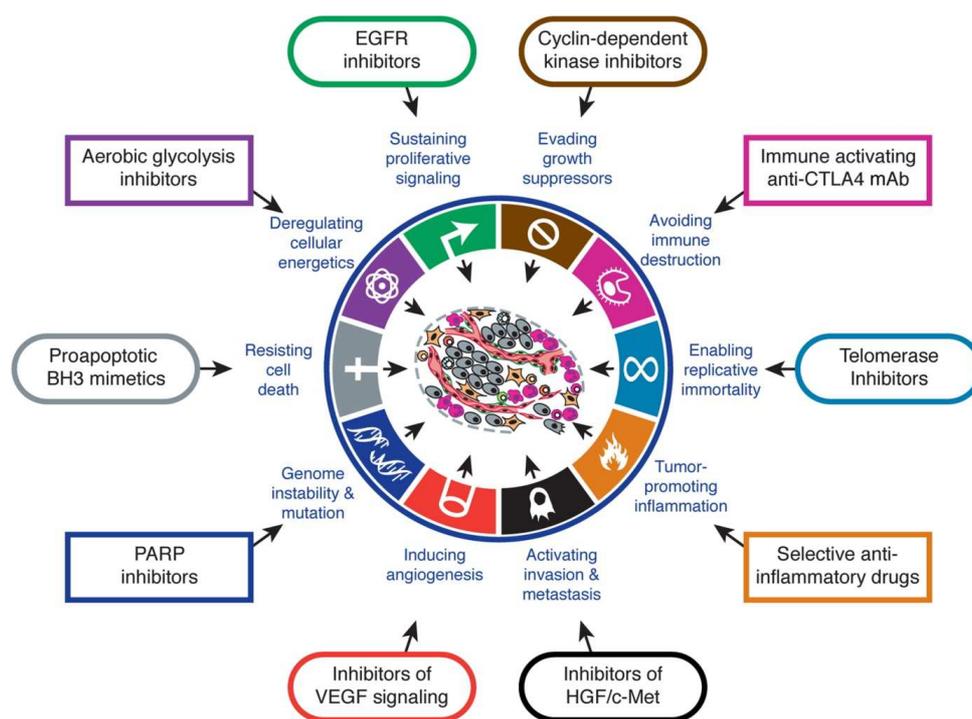
**Figure 2. Les différentes étapes de la cancérogénèse**

(Adapté de Saw *et al.*, 2010).

## II-3. Spécificités de la cellule cancéreuse

Le développement d'un cancer est un processus complexe, multifactoriel et séquentiel. Ainsi, l'acquisition de caractéristiques physiologiques particulières, en réponse à de nombreuses modifications de son statut génétique, va discriminer les cellules cancéreuses des cellules saines, leur conférant un avantage sélectif certain. Malgré une très grande hétérogénéité au

sein des cancers, Hanahan et Weinberg (2000), avaient proposé dans les années 2000 six marqueurs-clés du phénotype cancéreux. Parmi ces signatures caractéristiques favorisant la progression tumorale figuraient une autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance à l'origine d'une prolifération accrue, une perte de sensibilité aux signaux d'arrêt de prolifération, une capacité à contourner les défenses immunitaires, la capacité à migrer et à former des métastases (invasion des tissus), un potentiel de réplication illimité, la néovascularisation des tissus en raison d'un puissant potentiel angiogénique, et enfin une survie accrue via leur capacité à échapper à l'apoptose. De nouvelles signatures ont été plus récemment intégrées à cette nomenclature (Hanahan & Weinberg, 2011), participant activement à la pathogenèse d'un grand nombre de cancers, en particulier la capacité du tissu cancéreux à éviter sa destruction par le système immunitaire, et la dérégulation du métabolisme énergétique. L'ensemble de ces marqueurs du phénotype cancéreux sont représentés schématiquement sur la figure 3 ci-dessous.



**Figure 3. Caractéristiques physiologiques acquises par les cellules au cours de la cancérogenèse (d'après Hanahan et Weindberg, 2011).**

Enfin, deux autres caractéristiques connues pour faciliter l'apparition de toutes ces modifications ont été suggérées: l'instabilité génomique qui génère de la diversité génétique et

favorise ainsi l'acquisition de nouveaux traits phénotypiques; le maintien de l'inflammation au sein du microenvironnement tumoral qui peut permettre d'alimenter la tumeur via la libération de certaines molécules actives (facteurs de croissances, facteurs angiogéniques, protéases etc.), favorisant par ce biais l'apparition de ces nouvelles capacités. Ce contexte inflammatoire est aussi connu pour amplifier l'instabilité génétique au sein du microenvironnement tumoral (Colotta *et al.*, 2009).

#### **II-4. Rôle du métabolisme des HAP dans leur cancérogénicité**

Le caractère très lipophile des HAP favorise grandement le passage de la membrane cellulaire, et assure la distribution de ces xénobiotiques dans tout l'organisme, principalement au niveau de l'intestin, des poumons et de la peau (Foth, 1988). Cependant, ils vont être en partie métabolisés au niveau hépatique, principal organe cible, où ils vont être biotransformés en intermédiaires réactifs, et ainsi acquérir des propriétés électrophiles à l'origine de leurs effets toxiques (Miller & Ramos, 2001). L'activation métabolique des HAP est donc un pré-requis à leur effets délétères. Paradoxalement, l'intérêt principal de cette biotransformation est d'exercer la fonction de détoxification du foie, afin de faciliter l'excrétion de ces molécules hautement hydrophobes, et qui ont tendance à s'accumuler dans le tissu adipeux. Ce processus de biotransformation moléculaire se déroule en 3 étapes : la phase I ou phase de fonctionnalisation, suivie de la phase II ou phase de conjugaison, et enfin la phase III, dite de transport.

##### **II-4-1. Phase I : Fonctionnalisation**

Cette première étape est médiée par les enzymes de phase I dont les mono-oxygénases à cytochromes P450 (CYP), les époxydes réductases et les hydrolases. Elle consiste en l'ajout d'un groupement polaire sur le squelette carboné des hydrocarbures. Cette réaction va ainsi rendre les HAP plus hydrophiles, afin de faciliter leur excrétion. C'est lors de cette phase que le B[a]P va être métabolisé en métabolites stables, principalement sous la forme de BPDE (B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde). La formation de ces composés diols époxydes, très réactifs, est en grande partie responsable des effets cancérogènes du B[a]P (Anderson, 2005).

Cependant, les HAP ne sont pas seulement substrats des CYP. Ils régulent également positivement l'expression de ces enzymes de détoxification *via* leur capacité à activer le récepteur Ah (Baird *et al.*, 2005). En effet, l'implication du RAh dans la régulation de

l'expression de certaines enzymes clés du métabolisme des xénobiotiques est maintenant très bien établie (Barouki *et al.*, 2012). Il régule notamment l'expression de certaines isoformes de CYPs telles que le CYP1A, 1B ou 1C, mais il est aussi connu pour moduler l'expression de certaines enzymes de phase II comme les aldo-kéto réductases, les glucuronyltransférases et les glutathion-S-transférases.

#### **II-4-2. Phase II : Conjugaison**

Au terme de la phase I, beaucoup de composés n'ont pas encore atteint un degré suffisant d'hydrosolubilité pour permettre leur élimination par l'organisme. Cette étape vise donc à les conjuguer avec des groupements endogènes polaires afin de réduire encore leur niveau d'hydrophobicité. Ainsi, les glutathion S-tranférases (GST), les UDP-glucuronyl transférases (UGT), ou encore les sulfotransférases (ST) vont permettre de les conjuguer respectivement à des groupements glutathion, acide glucuronique, ou enfin des groupements sulfates (Shimada, 2006). L'ajout de ces groupements très hydrosolubles va favoriser l'élimination de ces toxiques *via* l'urine et/ou la bile lors de la phase III.

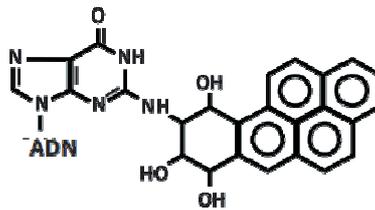
#### **II-4-3. Phase III : Transport et élimination**

Les hydrocarbures ayant consécutivement été pris en charge lors des deux phases précédentes vont alors être éliminés au cours de cette troisième et ultime phase.

La conjugaison des composés lors de la phase II permettra un adressage efficace des conjugués *via* des transporteurs membranaires spécifiques tels que les *Multi Drug Resistance protein* (MRP) ou les P-glycoprotéines (P-gp). Outre son implication dans le métabolisme, le foie va alors également contribuer à l'élimination des xénobiotiques hors de l'organisme *via* le système biliaire. Cependant, ce processus ne conduit généralement pas à une élimination totale, puisque les composés vont une nouvelle fois transiter par la lumière intestinale, et vont potentiellement pouvoir être réabsorbés au cours du cycle entéro-hépatique. La majeure partie (environ 75%) va toutefois être rejetée dans les fèces avec la fraction non assimilable des nutriments.

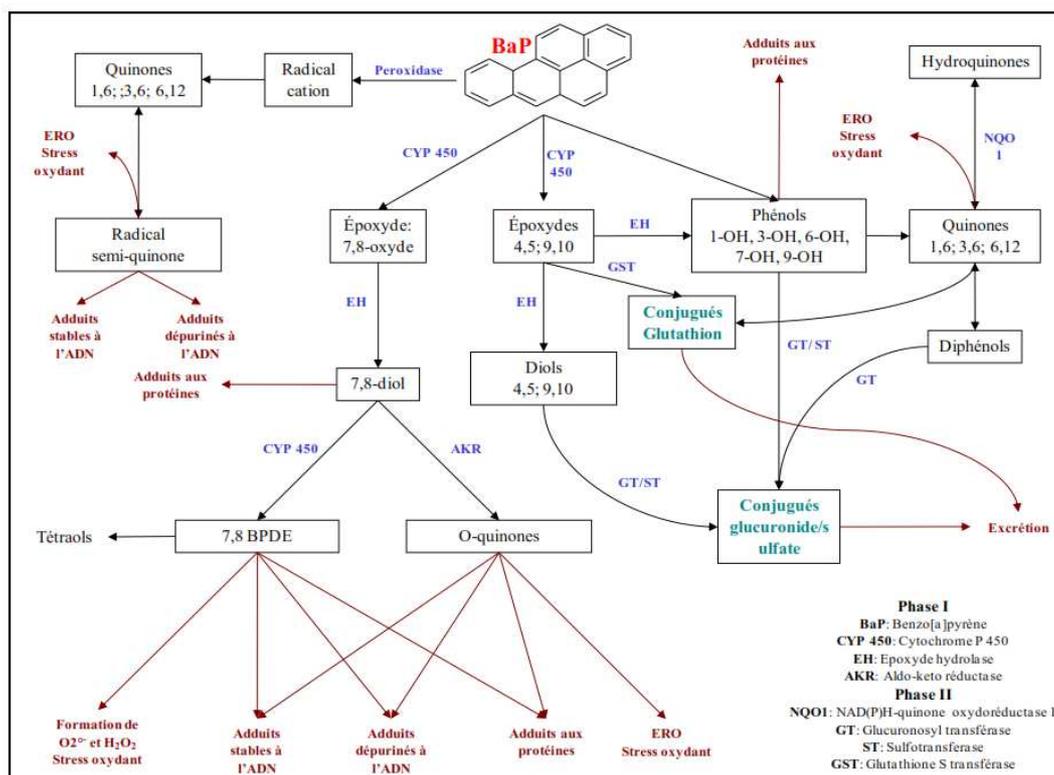
## II-5. Génotoxicité des HAP

Malgré leurs apparentes similitudes structurales, le potentiel cancérigène des HAP est très variable, et tous les HAP ne sont pas cancérigènes. La voie génotoxique, modélisée par la fixation des hydrocarbures sur les acides nucléiques, en particulier de leurs métabolites hautement réactifs (cf. Figure 4 pour le BPDE, métabolite du B[a]P), constitue le mécanisme initiateur de cancer par ces composés (Sims *et al.*, 1974; Huberman *et al.*, 1976; Stampfer *et al.*, 1981; Gelboin, 1980).



**Figure 4. Fixation du BPDE à l'ADN**

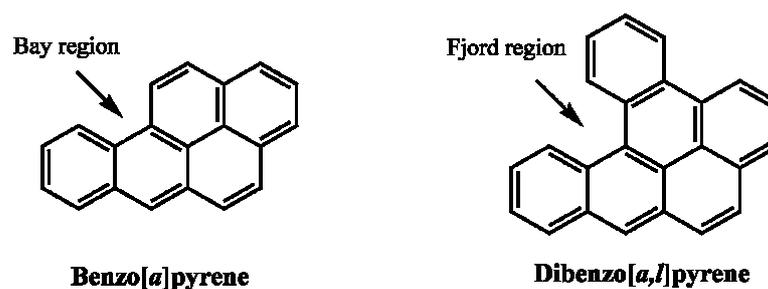
L'activation métabolique de nombreux HAP par les voies de détoxification va donc potentialiser leur cancérigénicité. Les cytochromes P450 1A1, 1A2 et 1B1 sont préférentiellement impliqués dans leur bioactivation (Pelkonen & Nebert, 1982; Shimada & Fujii-Kuriyama, 2004). Concernant le B[a]P, les voies d'activation sont au nombre de quatre: voie des diol-époxydes, voie des O-quinones, voie du radical cation, et voie des esters benzyliques, cette dernière étant minoritaire (Stansbury *et al.*, 1994). Ces voies d'activation sont détaillées dans la figure 5 ci-dessous.



**Figure 5. Les trois principales voies d'activation métaboliques des HAP (Wessel, 2010)**

Un cancérigène peut participer à une ou plusieurs phases de la cancérogénèse (Barrett, 1993). Le B[a]P, quant à lui, est considéré comme un cancérigène complet, puisqu'il va participer à la fois aux phases d'initiation, de promotion et de progression. Sa génotoxicité va principalement être due à sa transformation séquentielle en B[a]P-7,8-époxyde par les CYP, puis en B[a]P-7,8-diol par une époxyde hydrolase, avant de subir sa transformation finale en B[a]P-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE), réaction à nouveau catalysée par les CYP (Conney, 1982). La particularité de ces groupements diol-époxyde va être de pouvoir établir des liaisons covalentes, ciblant préférentiellement les bases puriques de l'ADN (adénine et guanine). L'encombrement stérique provoqué par ces adduits va notamment perturber les processus de transcription et/ou de réparation de l'ADN, en altérant sa configuration spatiale (Scicchitano, 2005). Contrairement aux adduits stables, préalablement décrits, qui vont rester solidement ancrés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation, les adduits dépurinés vont fragiliser la double hélice d'ADN. De la cassure de la liaison N-glycosidique, va ainsi résulter la perte complète du nucléotide. Ces sites, laissés vacants, vont alors être qualifiés de sites abasiques. En l'absence de réparation, ceux-ci vont constituer de

véritables points de rupture, et vont pouvoir favoriser l'apparition de cassures simple brin. Ils vont également être problématiques lors de la réplication, puisque n'importe quelle base pourra se substituer à l'ancienne (Obeid, 2010). Par ces processus, les mécanismes de dépurination de l'ADN favorisent grandement l'initiation de cancers (Cavaliere *et al.*, 2012). En outre, ces adduits vont préférentiellement lier certaines séquences spécifiques, présentant plus d'affinité pour ces derniers, créant de véritables "patterns" de mutations. Les séquences présentant le plus fréquemment des mutations ne seraient d'ailleurs pas forcément celles exposées à la plus grande quantité d'adduits. Certaines d'entre elles seraient en effet plus difficilement à même d'être prises en charge par les mécanismes de réparations de l'ADN (Dipple *et al.*, 1999). C'est le cas par exemple de la protéine suppresseur de tumeur p53, pour laquelle on retrouve des motifs de mutations caractéristiques sous l'effet des HAP (Rodin & Rodin, 2005). La présence de ces adduits à l'ADN pourrait donc être considérée comme un biomarqueur pertinent pour évaluer l'exposition humaine aux hydrocarbures (Ken-Dror, 2005). Elle serait susceptible d'identifier l'origine de certains cancers, en identifiant une éventuelle composante environnementale au cours des études épidémiologiques (Phillips, 2005). La structure moléculaire des hydrocarbures les plus cancérigènes contient généralement des régions "Bay" ou "Fjord" (Figure 6). Ces spécificités structurales favoriseraient leur bioactivation par les époxydes hydrolases mais potentialiseraient aussi les interactions avec les bases nucléiques.



**Figure 6. Exemples de régions Bay et Fjord (D'après Jarvis et al., 2014).**

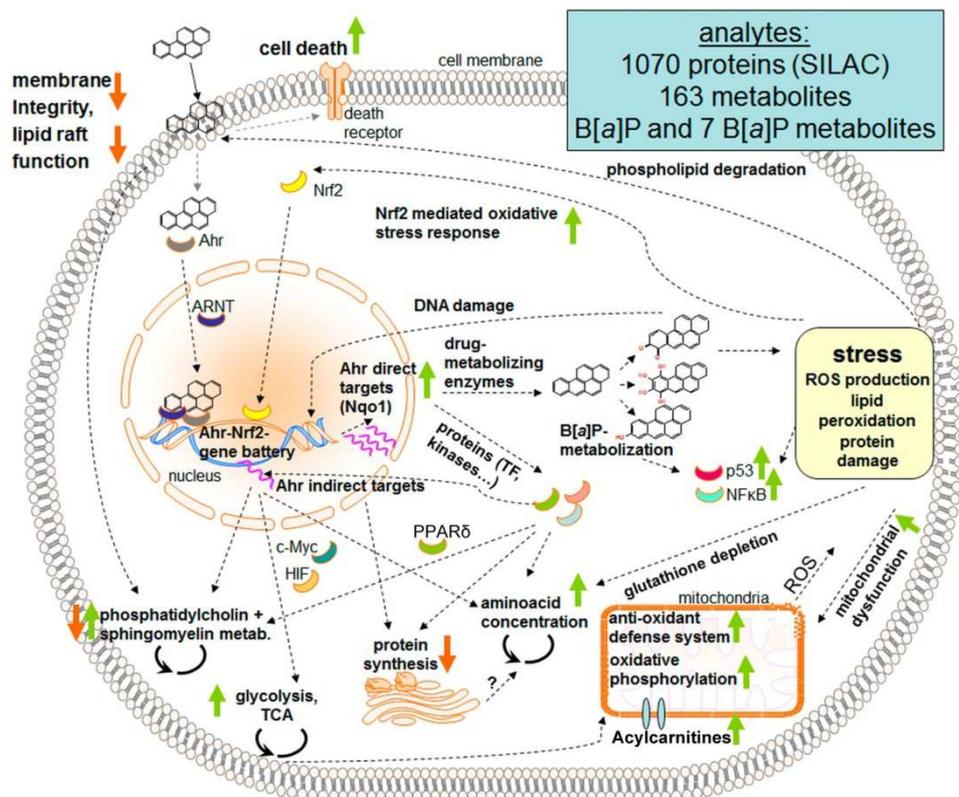
La capacité des métabolites du B[a]P à induire des mutations va donc être déterminante dans le développement des cancers. En effet, c'est par ce biais que ces composés vont peser sur la signalisation cellulaire en activant des oncogènes comme Ras ou c-myc, ou au contraire, en inhibant l'expression de gènes supposés contrecarrer le développement de tumeurs comme

p53 (Baird, 2005). De plus, des résultats récents montrent qu'en situation hypoxique, le métabolisme du B[a]P est modifié, avec une bioactivation accrue (Schults, 2014).

Parallèlement à la production des métabolites hautement réactifs détaillée précédemment, le métabolisme du B[a]P et de ses métabolites par les cytochromes va intrinsèquement conduire à un stress supplémentaire *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Si ces espèces pro-oxydantes telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) ou encore le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ne sont pas neutralisés par les systèmes de défense antioxydants, elles vont pouvoir être à l'origine de dommages oxydatifs. Ces altérations vont pouvoir cibler les acides nucléiques, et les protéines, mais vont aussi promouvoir la peroxydation lipidique.

## **II-6. Modulation de la balance survie/apoptose par les HAP**

Parallèlement à leurs effets initiateurs, les HAP sont également connus pour induire une forte toxicité, susceptible de jouer un rôle important dans la cancérogénèse; en effet, celle-ci ciblerait préférentiellement les cellules normales, d'où une prolifération compensatoire des cellules pré-néoplasiques résistantes à l'apoptose (Qiu, 2011). Cette toxicité est également liée à la bioactivation des HAP par les CYP. Le type de mort cellulaire le plus fréquemment mis en jeu dans le cadre des études sur ces agents chimiques reste sans conteste l'apoptose (Chen *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004), même si d'autres types de mort cellulaire ont été décrits tels que la nécrose (Lin & Yang, 2008; Jiang *et al.*, 2011). Enfin, en plus de ces signaux délétères, contribuant eux aussi au développement tumoral, ces composés sont aussi capables de promouvoir la survie et la prolifération des cellules. Au vu de la multitude de processus biologiques impactés par les HAP (Figure 7), les signaux à même de déséquilibrer la balance survie/apoptose sont multiples.



**Figure 7. Aperçu des principaux processus cellulaires altérés par le B[a]P**

(D'après Kalkhof *et al.*, 2015)

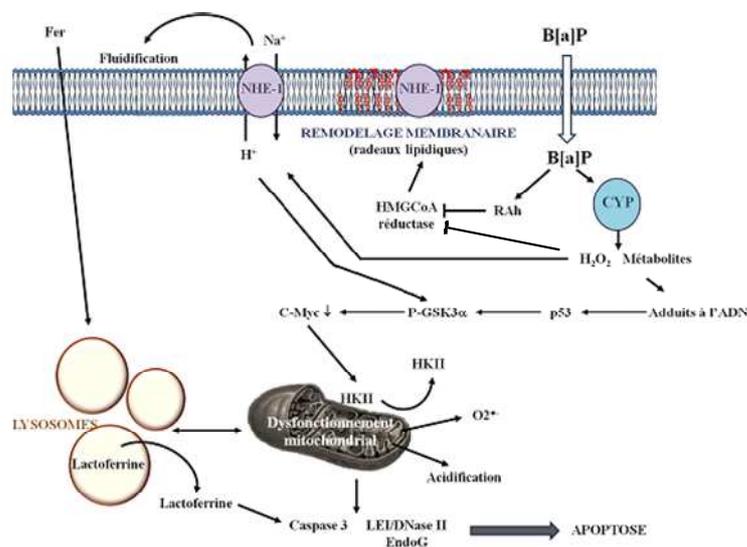
### II-6-1. Voies de mort cellulaire induites par le B[a]P

Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de caractériser les processus de mort cellulaire mis en jeu dans les cellules épithéliales hépatiques de rat F258 exposées au B[a]P (Figure 8). Deux voies majoritaires ont ainsi été identifiées. La première implique la phosphorylation de p53 et est la conséquence directe du métabolisme du B[a]P par les CYP, impliquant la production de métabolites hautement réactifs du B[a]P, comme le BPDE, à l'origine de dommages à l'ADN (Huc *et al.*, 2006; Holme *et al.*, 2007). La seconde repose sur l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  1 (NHE1). Cette activation de NHE1 requiert un remodelage des radeaux lipidiques résultant de l'inhibition de l'expression de l'HMGCoA réductase, enzyme clé du métabolisme du cholestérol, par le RAh et les ERO (Figure 8). Ce remodelage membranaire permettrait alors d'activer NHE1, en entraînant sa relocalisation des radeaux lipidiques vers les zones plus fluides de la membrane (Tekpli *et al.*, 2010, 2012). Les voies p53 et NHE1 convergeraient ensuite vers une même cible, favorisant ainsi la phosphorylation de GSK3 $\alpha$ , et consécutivement une diminution de l'expression de c-myc (Dendelé *et al.*, 2012). La diminution du niveau d'expression de c-myc interviendrait dans la

relocalisation de l'hexokinase II de la mitochondrie vers le cytoplasme (Huc *et al.*, 2007). Les dysfonctionnements mitochondriaux résultant de cette relocalisation se traduiraient par une production accrue d'anion superoxyde, et une acidification secondaire tardive du cytosol. Enfin, ces altérations de la mitochondrie seraient associées à la translocation au noyau de l'EndoG (Endonucléase G), et à l'activation des caspases effectrices (Huc *et al.*, 2006).

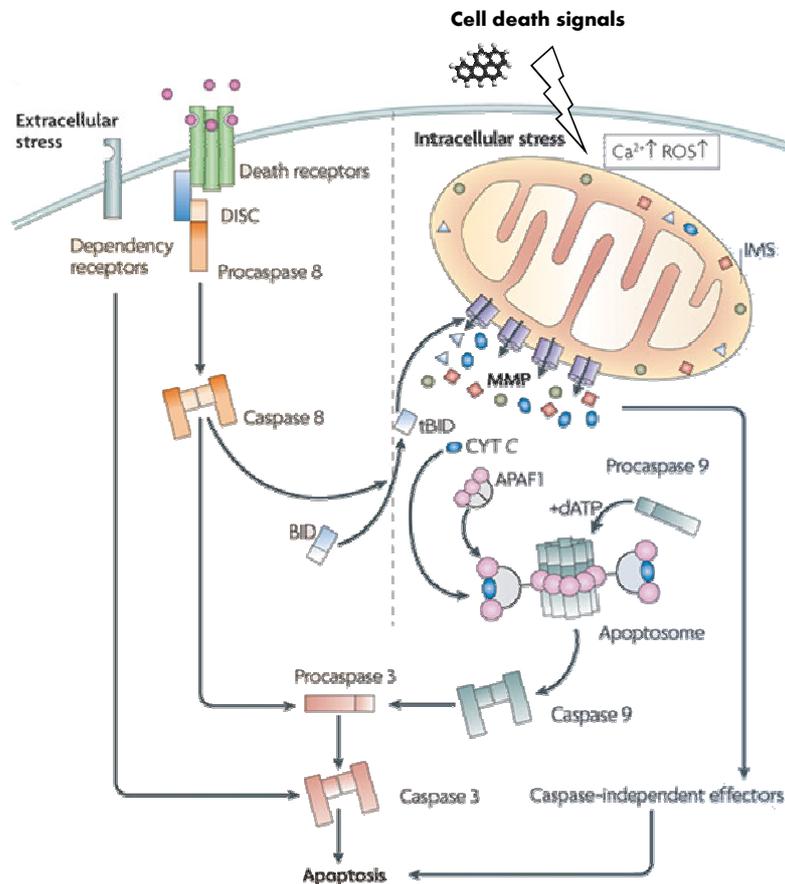
Il est à noter que, dans les cellules F258, l'activation des caspases effectrices se fait indépendamment des caspases initiatrices ou des cathepsines, faisant intervenir un dialogue entre mitochondries et lysosomes; celui-ci aboutit au relargage de la lactoferrine, qui possède également une activité protéasique (Gorria *et al.*, 2008). Une voie indépendante des caspases, basée sur l'activation de la LEI-DNase II, a également été observée (Huc *et al.*, 2006).

De façon intéressante, l'apoptose observée dans cette lignée sous l'effet du B[a]P, n'induit pas de libération du cytochrome c, ni aucune relocalisation de la protéine pro-apoptotique Bax (Holme *et al.*, 2007), permettant d'envisager d'autres modifications du métabolisme mitochondrial.



**Figure 8. Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le B[a]P dans les cellules F258**

La toxicité du B[a]P a été observée dans de nombreux autres modèles cellulaires, et en particulier dans divers modèles de cellules hépatiques, aussi bien *in vitro* (Chen *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004; Solhaug *et al.*, 2004), qu'*in vivo* chez le rat (Michurina *et al.*, 2014). Indépendamment du modèle cellulaire, la voie intrinsèque de l'apoptose (cf. Figure 9) semble prépondérante parmi les types de mort induits par le B[a]P (Chen *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2004). Bien que la voie intrinsèque soit la plus fréquemment décrite comme processus de mort cellulaire induit par le B[a]P, quelques rares études ont également identifiées que le B[a]P pouvait également être à l'origine de l'exécution de la voie extrinsèque (Stolpmann *et al.*, 2012).



**Figure 9. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (D'après Galluzi L et al., Nat Rev Neurosci, 2009).**

Cependant, la toxicité du B[a]P pourrait également s'exercer par d'autres types de mort cellulaire. En effet, une mort par nécrose (Lin & Yang, 2008; Jiang *et al.*, 2011), ou par nécroptose (Jiang *et al.*, 2013) a également été décrite. La toxicité due au B[a]P, en agressant

régulièrement le tissu hépatique, pourrait promouvoir une mort cellulaire chronique des cellules hépatiques. Celle-ci et pourrait alors largement contribuer aux effets cancérigènes du B[a]P, en favorisant la prolifération compensatoire de cellules néoplasiques, résistantes à l'apoptose (Gatenby *et al.*, 2006; Jost & Kaufmann, 2010; Weber *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2011; Feng, 2012). La capacité du B[a]P à promouvoir la mort cellulaire a été très largement étudiée. Cependant au-delà de ses effets toxiques, cet hydrocarbure est également connu pour induire une signalisation anti-apoptotique ou des signaux de survie (Hung *et al.*, 2007; Ferecatu I *et al.*, 2010). Ces signaux, en favorisant la survie des cellules et en leur octroyant une capacité d'échappement vis-à-vis de la mort cellulaire programmée, pourraient largement contribuer au développement tumoral (Teranishi *et al.*, 2010).

## **II-6-2. Signaux de survie associés à l'exposition au B[a]P**

Différents signaux de survie induits par le B[a]P ont été identifiés, en particulier dans les cellules hépatiques, et ce, parallèlement aux signaux pro-apoptotiques (Holme *et al.*, 2007). En effet, bien qu'induisant l'apoptose dans la lignée d'hépatome murin Hepa1c1c7, ce cancérigène est également responsable, dès 30 min d'exposition, d'une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bad (Bcl-2-associated Agonist of cell Death), ainsi que d'une augmentation de son niveau de phosphorylation sur les sérines 112 et 155 (Solhaug *et al.*, 2004). Or, le maintien de la phosphorylation de Bad évite son hétérodimérisation avec Bcl<sub>XL</sub> ou Bcl-2, empêchant ainsi l'activation du mécanisme effecteur apoptotique (Downward, 1999). D'autres travaux ont également démontré *in vivo* chez le rat qu'un apport en B[a]P de l'ordre de 60 mg.kg<sup>-1</sup> avait pour effet de fortement augmenter le contenu de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau hépatique, inhibant l'exécution de la mort cellulaire (Michurina *et al.*, 2014). Il est généralement admis que des facteurs de survie induisent l'activation de kinases spécifiques à l'origine d'une signalisation anti-apoptotique, par exemple en ciblant l'activité de Bad (Harada *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2004). C'est le cas notamment de la kinase Akt, dont l'activation par le B[a]P a été mise en évidence dans les cellules Hepa1c1c7 (Solhaug *et al.*, 2004). D'autre part, la MAPK JNK1 (c-Jun-terminal Kinase 1) est également connue pour contrôler le niveau de phosphorylation de Bad au niveau de sa thréonine 201 (Yu *et al.*, 2004). Or, il a été montré, dans un modèle de fibroblastes pulmonaires humains, que l'activation de JNK par le B[a]P était responsable d'une accélération de la progression du cycle cellulaire, à l'origine d'une prolifération et d'une survie accrue (Du *et al.*, 2006). Par ailleurs, il est intéressant de noter ici que la phosphorylation de Bad sur la thréonine 201 par

JNK1 pourrait promouvoir la glycolyse via l'activation de la PFK-1 (phosphofructokinase-1) dans la lignée murine de cellules souches hématopoïétiques FL5.12 dépendante à l'IL-3, et issue du foie fœtal. Ainsi, en plus de l'inhibition de la fonction pro-apoptotique de Bad, le contrôle du niveau de phosphorylation de Bad sur la Thr-201 par JNK1 pourrait favoriser la survie des cellules en agissant sur la glycolyse (Deng *et al.*, 2008). Cependant, ceci reste à démontrer pour le B[a]P. La voie de signalisation PI3K/Akt est également impliquée dans l'activation de JNK1 dans la lignée cellulaire épidermique murine JB6 C141 exposées, non pas directement au B[a]P, mais à son principal métabolite, le BPDE. Dans ce modèle cellulaire, les auteurs proposent d'ailleurs que la transactivation du facteur de transcription AP-1 par ce métabolite *via* la voie PI3K/Akt/JNK, pourrait contribuer aux phases de promotion et de progression tumorale (Li *et al.*, 2004). Cette activation de la voie de signalisation Akt par le B[a]P a également été rapportée dans la lignée mammaire MCF-10A. Dans ce modèle, le BPDE active Akt *via* une augmentation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ . La Pyk2 (proteine tyrosine kinase 2 beta), activée par le calcium, aboutit à l'activation d'Akt *via* l'EGFR, atténuant de ce fait la toxicité de ce métabolite du B[a]P (Burdick *et al.*, 2006). Un type de réponse analogue, faisant intervenir l'EGFR, a également été caractérisé dans la lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549, issue d'un adénocarcinome, et traitée au B[a]P. Dans ce cas, l'activation de l'EGFR entraîne non seulement la phosphorylation d'Akt, mais aussi et des protéines kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), amplifiant alors la prolifération de ces cellules cancéreuses en contribuant à l'atténuation du signal apoptotique (Kometani *et al.*, 2009). Un effet du B[a]P sur la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$   $[Ca^{2+}]_i$  a également été démontré dans la lignée endothéliale microvasculaire humaine HMEC-1 (Mayati *et al.*, 2012). Dans ce modèle, la fixation du B[a]P sur le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique entraîne une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  *via* l'activation de la voie de signalisation protéine G/adénylate cyclase/AMPC/Epac-1/IP(3) (Mayati *et al.*, 2012). De façon intéressante, indépendamment d'une exposition au B[a]P, il a été démontré qu'une augmentation du pool d'AMPC, en activant la PKA (cAMP-dépendant protein kinase A), peut catalyser la phosphorylation de Bad sur ses sérines 112 et 155 (Lizcano *et al.*, 2000), la phosphorylation de la sérine 155 étant reliée à la survie cellulaire (Virdee *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2000). Un tel mécanisme pourrait donc être aussi impliqué dans les effets du B[a]P.

Par ailleurs, le B[a]P agit sur la communication intercellulaire *via* les jonctions gap, soit en la favorisant (Tekpli *et al.*, 2010b), soit en l'inhibant (Lee *et al.*, 2015), avec des conséquences

en termes de survie cellulaire. La localisation membranaire ou la phosphorylation de la connexine 43 serait alors respectivement déterminante. Enfin, l'augmentation du niveau d'expression de la protéine RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1), dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (HBECs) exposées au BPDE, constituerait également un signal de survie, jouant le rôle de promoteur tumoral, et susceptible de promouvoir l'acquisition d'un phénotype cancéreux malin. Dans ce cas, la protection conférée par la surexpression de RIP1 permettrait notamment aux cellules initiées d'être moins sensibles au stress oxydant, principale cause de la cytotoxicité dans ce modèle cellulaire (Wang *et al.*, 2013).

## **II-7 Effets du B[a]P sur la phase de progression tumorale**

### **II-7-1 Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**

Très peu d'études se sont attelées à étudier un éventuel effet du B[a]P dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Cependant, le profil d'expression génique de la lignée cancéreuse bronchio-alvéolaire A549 exposée au B[a]P, a montré que de nombreux gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), à savoir la vimentine, le TGF- $\beta$ 1, Snail etc., étaient positivement régulés dans ces conditions (Yoshino *et al.*, 2007). Une forte induction de la vimentine par le B[a]P a par ailleurs été confirmée dans la lignée monocyttaire leucémique humaine THP-1 (Kim *et al.*, 2014). Il est à noter qu'un autre hydrocarbure, le 3-methylcholanthrene induit également l'EMT dans les lignées hépatiques murines BNL CL.2 et BNL 1ME A 7R.1 (Oh *et al.*, 2014). Ba et ses collaborateurs (2015) ont très récemment montré que l'augmentation du potentiel métastatique de deux modèles d'hépatocarcinomes humains exposés au B[a]P serait liée à la survenue d'une transition EMT. La mise en place de ce processus ferait intervenir l'activation transcriptionnelle de l'inducteur d'EMT snail, en réponse à l'activation de la voie NF $\kappa$ B par le B[a]P. L'activation transcriptionnelle de snail conduirait par la suite à une modulation de l'expression des protéines effectrices de l'EMT (Ba *et al.*, 2015).

### **II-7-2. Processus de migration et d'invasion cellulaires**

Parallèlement à ses effets sur la prolifération cellulaire (Khan & Anderson, 2001; Rodin & Rodin, 2005), le B[a]P stimule également les processus de migration et d'invasion. Les

métastases constituent la dernière étape de la progression néoplasique et reste le premier facteur de mortalité pour les patients atteints d'hépatocarcinomes (Wang *et al.*, 2008). La contribution des facteurs environnementaux dans ce processus est mal connue et constitue une priorité en termes de santé publique (Farazi & DePinho, 2006; Uka *et al.*, 2007).

L'activation de la voie des MAPK sous l'effet du B[a]P semble généralement la cause de ces processus. Song et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence que l'activation de la voie p38 MAPK sous l'effet d'une production d'ERO favorisait la migration de la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2 (Song *et al.*, 2011). Le B[a]P a également la capacité de promouvoir la migration et l'invasion des cellules de la lignée mammaire MDA-MB-231. Dans ce modèle, la promotion de la migration nécessite l'activation de nombreux partenaires protéiques dont les LOX (LipOXYgénases), Src (proto-oncogène non récepteur tyrosine kinase), ERK2 mais aussi FAK (Focal Adhesion Kinase) (Castillo-Sanchez *et al.*, 2013). Le B[a]P favoriserait également la migration des cellules cancéreuses mammaires, en activant la voie de signalisation ERO-ERK-MMP9 (Guo *et al.*, 2015).

Aucune publication n'a pour le moment établi clairement que les effets du B[a]P sur les processus de migration et d'invasion reposaient sur l'activation du récepteur Ah. Cependant de tels effets ont été rapportés consécutivement à l'activation de ce récepteur par la TCDD, fort ligand du RAh. Ces effets, résultant de l'activation du RAh, faisaient notamment intervenir l'axe Nedd9/Hef1/Cas-L à l'origine de l'activation de JNK, mais impliquaient également des perturbations de la signalisation du TGF $\beta$ , en lien avec l'EMT (Bui *et al.*, 2009; Barouki & Coumoul, 2010).

Un effet du B[a]P sur les MMP (métalloprotéases matricielles), impliquées dans les processus de migration cellulaire, avait déjà été identifié dans un modèle de cellules musculaires lisses vasculaires de rat (Meng *et al.*, 2009). Enfin, une étude très récente a évalué les effets à plus long terme de faibles doses de B[a]P, allant de 0,01 à 100 nM, *in vitro* sur les lignées d'hépatocarcinomes humains SMMC-7721 et BEL-7404 (Ba *et al.*, 2015). Dans cette étude, le potentiel d'invasion et de migration de ces lignées a ensuite été confirmé *in vivo* sur des souris nude. Au total, ces travaux récents ont permis de démontrer que le B[a]P perturbe l'adhérence cellulaire, favorisant ainsi le potentiel migratoire et invasif de ces lignées d'hépatocarcinomes. Cette étude a également identifié que le B[a]P est capable de stimuler l'angiogénèse. Ces effets ont été reliés à l'activation de la voie NF $\kappa$ B, même si les auteurs ne sont pas parvenus à identifier les modalités d'activation de cette voie de signalisation par le B[a]P. L'exposition au

B[a]P constituerait ainsi un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de CHC (Ba *et al.*, 2015).

**En résumé, en générant d'une part des signaux de survie, mais également en provoquant la mort cellulaire des cellules dans le foie, le B[a]P contribuerait activement à la phase de progression tumorale. Les données obtenues par notre équipe dans la lignée F258, ainsi que celles présentées dans ce chapitre semblent suggérer qu'une des cibles principales du B[a]P est la mitochondrie, siège du métabolisme énergétique.**

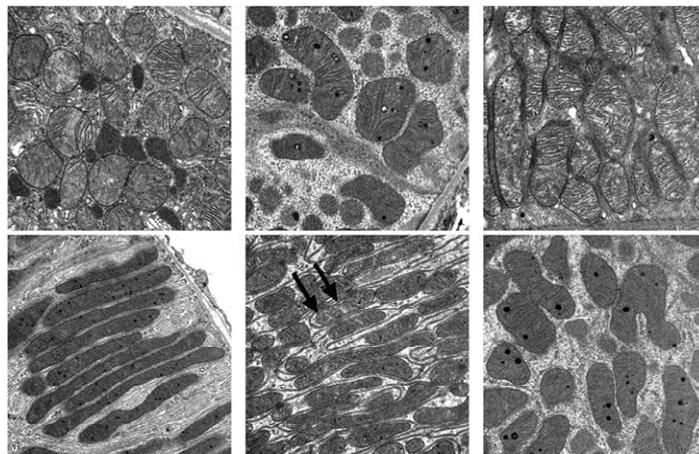
## Chapitre III : La mitochondrie et le métabolisme énergétique

De nombreux facteurs qui étaient initialement caractérisés comme des régulateurs de la mort cellulaire sont maintenant connus pour interagir physiquement, ou fonctionnellement, avec des enzymes du métabolisme mitochondrial. Ceci suggère l'existence de points de contrôle métabolique qui détermineraient le devenir des cellules. Ainsi, l'altération des fonctions clés de la mitochondrie, pourrait déterminer si les cellules réagissent au stress de manière adaptative, en prônant la survie, ou au contraire de manière suicidaire, en favorisant l'exécution de la mort cellulaire (Green *et al.*, 2014).

### III-1. La mitochondrie

#### III-1-1. Morphologie

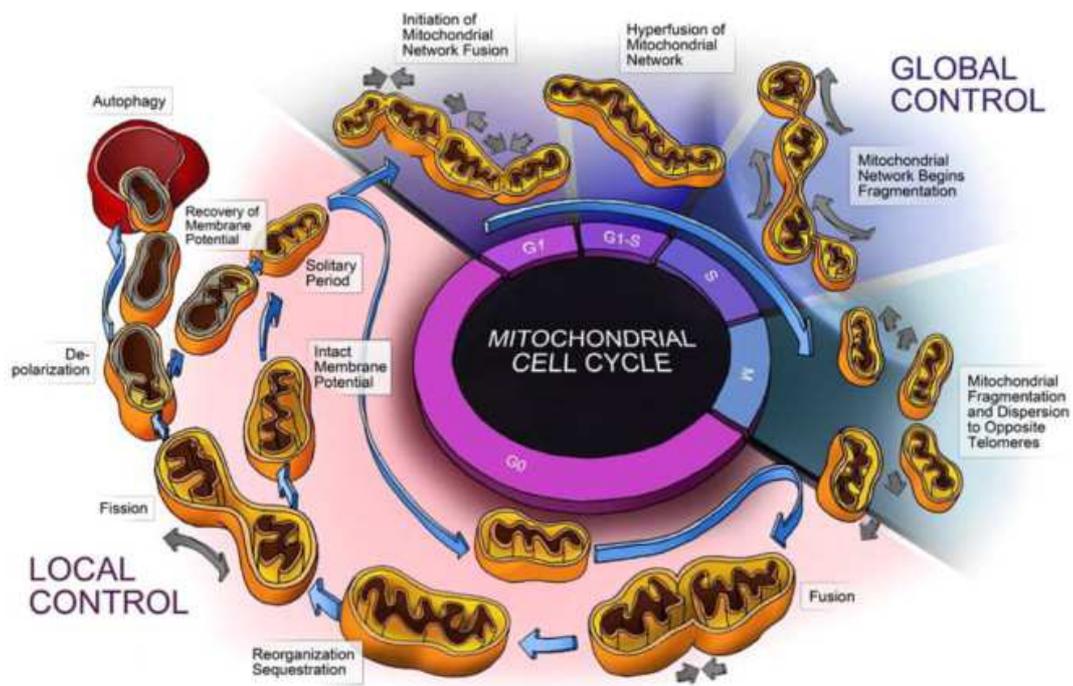
Les mitochondries sont de taille et de forme très variables (cf. Figure 10) selon leur origine et leur état métabolique. Ces organites font en moyenne 1  $\mu\text{M}$  de long pour un diamètre avoisinant les 0,5  $\mu\text{M}$ .



**Figure 10. La morphologie mitochondriale est très variable  
(d'après Kohler et al., 2009).**

On estime que chaque cellule contient entre 1000 et 3000 mitochondries. Cependant, La forme, le nombre et la distribution cellulaire des mitochondries au sein des cellules sont susceptibles de varier, en fonction du type cellulaire, du stade de développement, mais aussi

en fonction de l'activité de l'organite. Ainsi, ces paramètres vont être fortement dépendants du contexte physiologique dans lequel la mitochondrie évolue: processus de fusion/fission, motilité, adhérence, stress. L'environnement cellulaire va ainsi conditionner l'intégration structurale et fonctionnelle du réseau mitochondrial au sein des cellules (Jakobs, 2006; Lackner, 2013). L'aspect global du réseau mitochondrial est principalement régulé par les processus de fusion et fission. Ces phénomènes vont notamment permettre d'assurer le contrôle qualité des organites en coordonnant le recyclage des entités endommagés par des processus autophagiques, comme illustré sur la figure 11 (Twig *et al.*, 2008; Twig & Schirihai, 2011).



**Figure 11. Cycle de vie des mitochondries (Hyde et al., 2010)**

### III-1-2. Structure

D'un point de vue structural, les mitochondries sont constituées de deux membranes dont la composition et les fonctions divergent. Celles-ci permettent de délimiter deux compartiments distincts : l'espace intermembranaire et la matrice.

La membrane externe est formée d'une bicouche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur. Sa composition est relativement proche de celle de la membrane plasmique. Sa structure est riche en porines, dont le VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Cette protéine

transmembranaire régit les transports passifs puisqu'elle est perméable aux ions ainsi qu'aux molécules de masse moléculaire inférieure à 10 kDa (Manuella, 1992; Vysokikh & Brdiczka, 2003).

La membrane interne délimite l'espace matriciel, et est spécialisée dans le transport actif puisqu'elle est imperméable aux ions et aux petites molécules. Par conséquent, les seules entités à même de la traverser sont celles pour lesquelles il existe un transporteur membranaire spécifique. Elle consiste en une bicouche lipidique de 5 à 6 nm d'épaisseur, présentant une organisation très différente de la membrane externe. Alors que la membrane externe contient environ autant de protéines que de lipides, la membrane interne quant à elle peut contenir jusqu'à 80% de protéines. Parmi les 20% de phospholipides restants, les cardiolipines représentent environ 1/5<sup>ème</sup> de la fraction lipidique. Ce lipide va conférer à la membrane interne une forte imperméabilité aux protons, mais va aussi permettre de maintenir l'orientation de certaines protéines de la chaîne respiratoire au sein de la bicouche lipidique (Paradies *et al.*, 2014). Cette membrane est le siège notamment du PTP (Permeability Transition Pore) et de l'ATP synthase. Il est à noter que cette synthase jouerait un rôle dans la formation du PTP (Giorgio *et al.*, 2013). Enfin, la membrane interne possède de nombreuses navettes et transporteurs spécifiques pour permettre le transport actif des molécules vers la matrice malgré la faible fluidité de la membrane. L'ANT (Adénine Nucléotide Translocase) permet ainsi la sortie de l'ATP mitochondrial nouvellement synthétisé contre l'entrée de l'ADP cytosolique. Sont également présents les cotransporteurs  $H^+/H_2PO_4^-$  permettant l'entrée du phosphate inorganique Pi nécessaire à la phosphorylation de l'ADP, et la  $H^+$ /pyruvate translocase permettant l'entrée du pyruvate. D'autres transporteurs sont retrouvés comme la navette malate/aspartate, la navette du glycérol-3-phosphate, le transporteur du citrate, ou encore l'antiport CACT (carnitine-acylcarnitine translocase) permettant l'entrée de l'acylcarnitine essentielle à la  $\beta$ -oxydation des acides gras. On y trouve également des canaux ioniques permettant des échanges de sodium, de potassium ou encore de calcium. La membrane interne a la particularité de présenter des replis caractéristiques, dirigés vers l'intérieur de la mitochondrie, et se prolongeant jusque dans la matrice. Ces crêtes permettent d'accroître sensiblement la surface de la membrane interne afin d'optimiser le rendement énergétique global de l'organite. Ainsi ces zones sont logiquement très fournies en complexes du système OXPHOS comparativement au reste de la membrane interne.

Chez l'homme, seulement 13 protéines sont encodées par le génome mitochondrial. En outre, des analyses protéomiques ont permis d'évaluer son contenu à plus de 1000 protéines

(Schmidt et al., 2010). Il en résulte que la quasi-exclusivité des protéines nécessaires au bon fonctionnement de l'organite doit être importée (Baker *et al.*, 2007). Les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 10 kDa vont pouvoir rejoindre des translocases spécifiques, regroupées sous le nom de TOM (Translocase of the Outer Membrane), sous réserve qu'elles possèdent un signal d'adressage mitochondrial. Des structures analogues au niveau de la membrane interne vont permettre le passage des entités vers la matrice, et sont retrouvées sous l'appellation TIM (Translocase of the Inner Membrane). Ce système d'importation est étroitement lié au statut énergétique de l'organite (Opalińska & Meisinger, 2015), et la reprogrammation vers la glycolyse aérobie est généralement associé à une inhibition de cette machinerie d'import protéique. La modalité d'inhibition la plus connue repose sur l'activation de la protéine kinase A (PKA), en réponse à une élévation du niveau d'AMPc (Zaman *et al.*, 2008). Il est aussi à noter que cette activité d'import protéique constitue un indicateur fiable du niveau de stress subi par l'organite (Harbauer *et al.*, 2014).

L'espace intermembranaire mitochondrial est situé entre les membranes externe et interne; il présente une composition relativement similaire à celle du cytosol du fait des processus de diffusion s'opérant au niveau de la membrane externe. Cet espace est chargé positivement, et a comme particularité de présenter une très forte concentration de protons, imputable à l'activité de la chaîne respiratoire.

La matrice mitochondriale présente un aspect granuleux dense et irrégulier. C'est d'ailleurs cette propriété qui est à l'origine de l'étymologie du mot mitochondrie, du grec mitos (fil) et chondros (granule). C'est le compartiment le plus interne de l'organite. Cet espace contient les mitoribosomes, de l'ADN circulaire (ADNmt), des ARN messagers et des ARN de transfert ainsi que tous les systèmes enzymatiques impliqués dans les nombreuses voies métaboliques s'y déroulant dont le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

### **III-1-3. Principales fonctions du métabolisme mitochondrial**

Dès 1948, Albert Lehninger et Eugene Kennedy ont identifié que la mitochondrie était le siège du métabolisme oxydatif (appelé phosphorylation oxydative) au sein des cellules eucaryotes (Lehninger & Kennedy, 1948). Elles utilisent l'oxygène dissous, entraînant la formation de dioxyde de carbone : c'est le phénomène de respiration cellulaire. Cette respiration est couplée à la synthèse d'ATP par l'intermédiaire de l'ATP synthase. Ce processus sera décrit plus loin dans ce manuscrit.

Hormis la respiration cellulaire, la production d'ATP et le renouvellement du potentiel réducteur, la mitochondrie exerce des fonctions majeures souvent en relation avec d'autres compartiments. En effet, les grandes voies métaboliques ne concernent pas toujours un compartiment subcellulaire unique mais permettent l'établissement de relations structurales et fonctionnelles étroites entre des compartiments distincts (Hamasaki *et al.*, 2013; Annunziata & d'Azzo, 2013; Lamb *et al.*, 2013; Hönscher *et al.*, 2014).

La mitochondrie est également impliquée dans la régulation de la concentration cytosolique en calcium. Cette régulation s'effectue en coopération avec le réticulum endoplasmique. Les ions calcium participent au contrôle du métabolisme mitochondrial, en activant plusieurs enzymes du cycle de Krebs, et vont de ce fait moduler la production de NAD(P)H et d'ATP (Glancy & Balaban, 2012).

Les mitochondries participent aussi indirectement à la synthèse d'acides aminés. Bien que les voies de biosynthèse des acides aminés soient très diverses, elles ont en commun l'utilisation d'un squelette carboné provenant des métabolites intermédiaires de la glycolyse ou du cycle de Krebs. A titre d'exemple, l'oxaloacétate est un précurseur pour la synthèse de méthionine ou de lysine, et l' $\alpha$ -cétoglutarate, un précurseur de la proline.

Enfin, dans certaines cellules endocrines spécialisées, la matrice mitochondriale est le siège des premières étapes de la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol.

Les mitochondries jouent donc un rôle crucial dans le fonctionnement cellulaire et plus globalement de l'organisme, en maintenant très finement l'homéostasie métabolique. Elles jouent également un rôle majeur dans l'apoptose, le contrôle des flux calciques, l'homéostasie lipidique, la synthèse des stéroïdes, la synthèse de centre Fer-Soufre, la synthèse de l'hème, la réponse immunitaire innée, ainsi que dans la signalisation cellulaire. Dès lors, il n'est pas surprenant que les dysfonctionnements mitochondriaux soient associés à un grand nombre de pathologies dont certaines maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer), des myopathies, le diabète de type 2 ou même les cancers (Scheibye-Knudsen *et al.*, 2015).

**Comme détaillé tout au long de ce chapitre, les mitochondries sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, constituant de véritables "hubs" au sein des voies de signalisation, à tel point que ces organites semblent prédisposés à influencer le devenir des cellules. De plus, l'incidence des dysfonctionnements mitochondriaux dans le développement de pathologies, ainsi que la variété de pathologies associées, confirment, s'il en était besoin, l'importance de cette organite dans le bon fonctionnement cellulaire.**

**Néanmoins, parmi ces fonctions essentielles, le métabolisme énergétique occupe une place prépondérante, faisant de ces organites de véritables centrales énergétiques au sein des cellules eucaryotes.**

## **III-2. Le métabolisme énergétique**

### **III-2-1. Généralités**

Le métabolisme énergétique désigne l'ensemble des réactions chimiques impliquées dans la production d'énergie utilisable par les cellules. A l'extérieur des cellules, ces réactions seraient très lentes et désordonnées. Les enzymes, véritables catalyseurs biologiques, vont permettre la succession ordonnée de réactions chimiques rapides. La notion de métabolisme peut globalement se subdiviser en deux parties : d'une part, le catabolisme pour les dégradations et d'autre part, l'anabolisme pour les biosynthèses, consommant les produits du catabolisme. Malgré tout, il s'agit de processus complexes qu'on ne peut réellement isoler les uns des autres; certaines voies participent donc aux deux processus sus-cités et sont alors qualifiées d'amphiboliques. Dans ce contexte, un système complexe de régulation et d'interconnexion des voies métaboliques va être indispensable. Ces voies sont globalement irréversibles et ne vont s'exécuter que dans un seul sens; elles vont alors être initiées par une réaction fortement exergonique et limitante. Elles sont principalement régulées par des enzymes, notamment celles impliquées dans les réactions limitantes, et se déroulent dans des sites cellulaires spécifiques impliquant un transfert important d'intervenants métaboliques au travers des membranes des différents organites; ce transfert met en jeu des systèmes de transporteurs et de navettes spécifiques (Lehninger & Reynafarje, 1994).

### **III-2-2 Potentiel phosphorylant et potentiel réducteur**

Le potentiel phosphorylant est exprimé par le biais du rapport ATP/ADP. L'ATP constitue la forme la plus universelle de transfert d'énergie et les couples ATP/ADP et ATP/AMP représentent les formes d'échanges énergétiques les plus répandues des systèmes vivants. Les modalités de synthèse d'ATP sont relativement limitées : seulement 4 réactions sont à l'origine de la formation d'ATP. Deux de ces réactions ont lieu au cours de la glycolyse et une autre dans le cycle de Krebs, mais la voie principale reste la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de l'ATP synthase dont l'activité dépend du gradient de protons. Le potentiel

phosphorylant est d'autant plus important que l'ATP est catabolisé pour assurer l'ensemble des fonctions cellulaires coûteuses en énergie telles que les biosynthèses, les contractions musculaires ou encore l'établissement des potentiels membranaires. En effet, la molécule d'ATP occupe une place centrale au sein du métabolisme, puisqu'elle a une énergie libre standard d'hydrolyse de l'ordre de  $-30,5 \text{ kJ/mol}$ . Ainsi des composés de  $\Delta G'^{\circ}$  supérieurs comme le Phosphoénolpyruvate, le 1,3-Bisphosphoglycérate ou encore la Créatine phosphate vont permettre de régénérer le pool d'ATP tandis que d'autres composés vont avoir des  $\Delta G'^{\circ}$  plus faibles tels que les Acétyl-CoA ou certains oses phosphorylés.

Le potentiel réducteur est indispensable dans la cellule afin de conserver en permanence une capacité réductrice des substrats. On le retrouve majoritairement sous la forme de  $\text{NADPH}_2$  et l'on quantifie ce potentiel par l'intermédiaire du rapport  $\text{NADPH}_2/\text{NADP}^+$ . Ce composé intervient dans de nombreuses réductions biosynthétiques. Par analogie avec le potentiel phosphorylant, seules quatre réactions permettent de le synthétiser dont deux sont inhérentes à des réactions annexes du cycle de Krebs catalysées par des isoenzymes de l'isocitrate déshydrogénase et par l'enzyme malique au sein de la matrice mitochondriale.

### **III-2-3. Interdépendance des voies métaboliques**

Les voies métaboliques sont interdépendantes. En effet, les différents processus impliqués dans la respiration cellulaire partagent bon nombre de métabolites. Ainsi la production d'ATP ne pourra pas s'effectuer si le catabolisme ne met pas de coenzymes réduits à disposition. De même, un appauvrissement en oxygène du milieu influencera non seulement le rendement de la chaîne respiratoire mais aussi celui des voies cataboliques situées en aval dans la cascade métabolique résultante. La mitochondrie, de par ses rôles métaboliques, va donc être au cœur du métabolisme. Elle va permettre de générer du potentiel phosphorylant et du potentiel réducteur, tous deux indispensables au bon déroulement de ces réactions biochimiques. La matrice mitochondriale contient le complexe de la pyruvate deshydrogenase, les enzymes du cycle de Krebs, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de l'oxydation des acides aminés. Globalement tous les mécanismes impliqués dans l'oxydation des combustibles cellulaires, excepté la glycolyse anaérobie se déroulant dans le cytosol, sont dépendants du métabolisme de la matrice mitochondriale. Les différentes voies métaboliques, présentées dans la figure 12, seront très succinctement décrites dans la partie suivante.

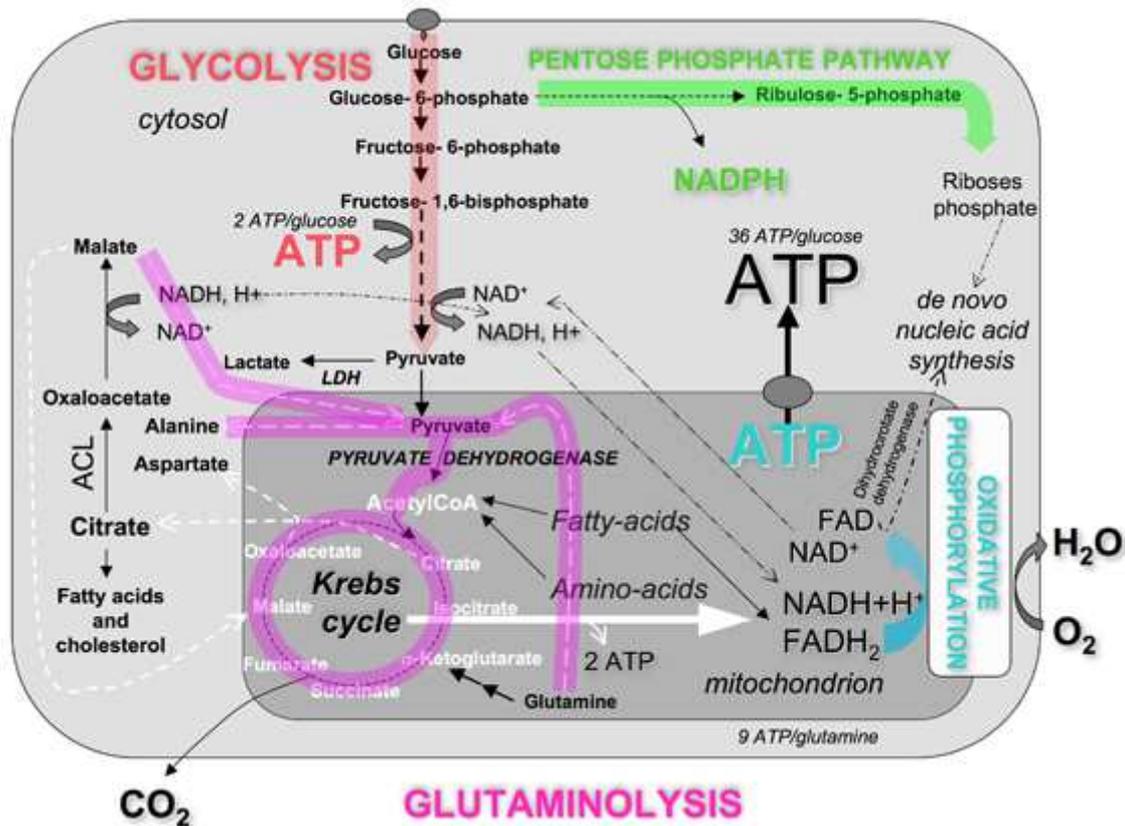


Figure 12. Intégration des principales voies du métabolisme énergétique (José *et al.*, 2013).

### III-2-3. a) La phosphorylation oxydative

La production d'énergie chez les Eucaryotes se réalise *via* deux voies principales. La première, la glycolyse, est anaérobie et se produit dans le compartiment cytoplasmique. Dans ce cas, le couplage entre l'oxydation et la synthèse d'ATP est chimique. La seconde, majoritairement rencontrée, se déroule par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative mitochondriale et nécessite un apport d'oxygène moléculaire. Ce mécanisme est également rencontré sous la dénomination d'OXPHOS. Dans ce cas, le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP est de type chimio-osmotique et fait intervenir un gradient de protons transmembranaire. La chaîne respiratoire, dont les composants seront détaillés plus loin, est située dans la membrane interne de la mitochondrie. Le transfert des électrons, depuis les équivalents réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) le long des complexes, permet le pompage des protons par les complexes I, III et IV vers l'espace intermembranaire,

créant ainsi un gradient électrochimique. Le retour des protons dans la matrice par l'ATP synthase permet de coupler la respiration et la synthèse d'ATP.

Le processus de respiration correspond à une oxydation de substances organiques impliquant un transfert exergonique d'électrons et de protons vers l'oxygène très électronégatif. L'oxygène est ainsi réduit en eau. Ce processus aérobie de dégradation des nutriments, qui se déroule dans le compartiment mitochondrial, est commun aux différentes classes de nutriments : glucides, lipides ou protides.

Globalement la respiration cellulaire se divise en 3 étapes. Lors de la première étape, les molécules organiques sont oxydées afin de former des molécules à deux atomes de carbone qui seront à l'origine du groupement acétyl de la molécule d'acétyl-CoA. La deuxième étape va consister à transformer ces groupements acétyls en dioxyde de carbone, et s'effectue par oxydation de ces groupements lors du cycle de Krebs. Cette oxydation va permettre de conserver l'énergie libérée dans des transporteurs d'électrons qui seront alors sous leur forme réduite du type  $\text{NADH} + \text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ . Enfin la troisième étape va consister en l'oxydation de ces transporteurs d'électrons préalablement réduits, libérant des protons et des électrons. Ces électrons vont alors intégrer le système de transport des électrons. Ces phénomènes de transports électroniques vont libérer une quantité importante d'énergie qui sera conservée sous forme d'ATP, *via* la phosphorylation oxydative.

Le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP au travers de l'ATP synthase est un processus très régulé. Des protéines découplantes ou UCP (uncoupling protein) sont capables de créer une fuite de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. Ce mécanisme, à l'origine d'une production de chaleur, permet de ralentir la production d'énergie sans modifier le niveau de respiration mitochondriale. C'est un processus de régulation très rapide de production d'ATP en fonction de la demande en énergie de la cellule (Kadenbach *et al.*, 2003).

### **III-2-3. b) La glycolyse**

Outre l'apport alimentaire de glucose, la mobilisation des stocks de glycogène ou encore la synthèse hépatique de glucose à partir d'entités non glucidiques *via* la néoglucogenèse, vont permettre de répondre aux besoins énergétiques de l'organisme. Le glucose va alors être catabolisé dans le cytosol par la glycolyse, également connue sous la dénomination de voie

d'Embden-Meyerhof, constituée d'une série de dix réactions chimiques catalysées par des enzymes. Ce processus permet la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, ce processus est modélisé par le bilan suivant: **glucose + 2NAD<sup>+</sup> + 2ADP + 2P<sub>i</sub> → 2 pyruvate + 2NADH + 2ATP + 2H<sub>2</sub>O + 4H<sup>+</sup>**. L'agent oxydant principal de la glycolyse étant le NAD<sup>+</sup>, il se doit d'être recyclé soit au niveau mitochondrial en présence d'oxygène permettant ainsi la synthèse de 3 molécules d'ATP supplémentaires, soit lors de la réduction du pyruvate en lactate en condition d'hypoxie.

### III-2-3. c) La voie des pentoses phosphates

Le glucose peut également être métabolisé par la voie des pentoses phosphate. Cette voie métabolique permet de régénérer le NADPH mais assure également la synthèse de sucres à cinq carbones comme le ribose-5-phosphate, essentiel à la formation des ribonucléotides. Le bilan global de cette réaction est le suivant: **3 glucose-6-phosphate + 6NADP<sup>+</sup> + 3H<sub>2</sub>O ↔ 2 fructose-6-phosphate + Glycéraldéhyde-3-phosphate + 6NADPH + 6H<sup>+</sup> + 3CO<sub>2</sub>**.

### III-2-3. d) La β-oxydation des acides gras

Le catabolisme des triacylglycérols a lieu dans les mitochondries. Les acide gras sont dégradés par β-oxydation des acyl-CoA. Les acides gras sont dans un premier temps convertis en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase dans le cytosol, puis importés dans la matrice mitochondriale. Le processus de β-oxydation des acides gras saturés fait intervenir quatre réactions successives: 1) formation d'une double liaison trans entre les carbones α et β suite à l'intervention de l'acyl-CoA déshydrogénase qui forme un acyl-CoA insaturé, par oxydation avec transfert d'électrons à l'ubiquinone; 2) hydratation de la double liaison par l'énoyl-CoA hydratase pour former le 3-L-hydroxyacyl-CoA; 3) déshydrogénation NAD<sup>+</sup>-dépendante de ce β-hydroxyacyl-CoA par la 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase aboutissant à la formation de β-cétoacyl-CoA; le groupement hydroxyle est ainsi transformé en fonction cétone; 4) la dernière réaction est une thiolyse catalysée par la β-cétoacyl-CoA thiolase (mieux connue sous la dénomination de acétyl-CoA acyltransférèse). L'exécution de ces quatre étapes permet d'extraire un groupement acétyle CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> à l'acide gras métabolisé; on obtient alors une molécule d'acétyl-CoA ainsi qu'un acyl-CoA alors raccourci de deux atomes de carbone, et permettant de générer une molécule de NADH et de FADH<sub>2</sub> lors de chaque

cycle. L'acyl-CoA, alors raccourci de 2 carbones (n-2), devient alors le nouveau substrat de cette série de réaction jusqu'à que cette molécule d'acide gras initiale soit elle-même convertie en acétyl-CoA. L'oxydation des acides gras saturés possédant un nombre impair de carbones ou des acides gras insaturés requiert cependant quelques étapes supplémentaires. L'oxydation complète des produits de la  $\beta$ -oxydation est également réalisée dans les mitochondries par le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes. L'oxydation complète d'un acide gras est très énergétique avec un rendement en ATP rapporté au nombre de carbone de la structure supérieur à celui des oses.

### III-2-3. e) Catabolisme des acides aminés

Les acides aminés remplissent préférentiellement leur fonction d'unité structurale protéique. Ils peuvent cependant être transformés en d'autres intermédiaires métaboliques. Leur catabolisme est complexe et va dépendre de la nature de l'acide aminé considéré.

L'ensemble des voies métaboliques décrites sont résumées sur la figure 13 ci-dessous.

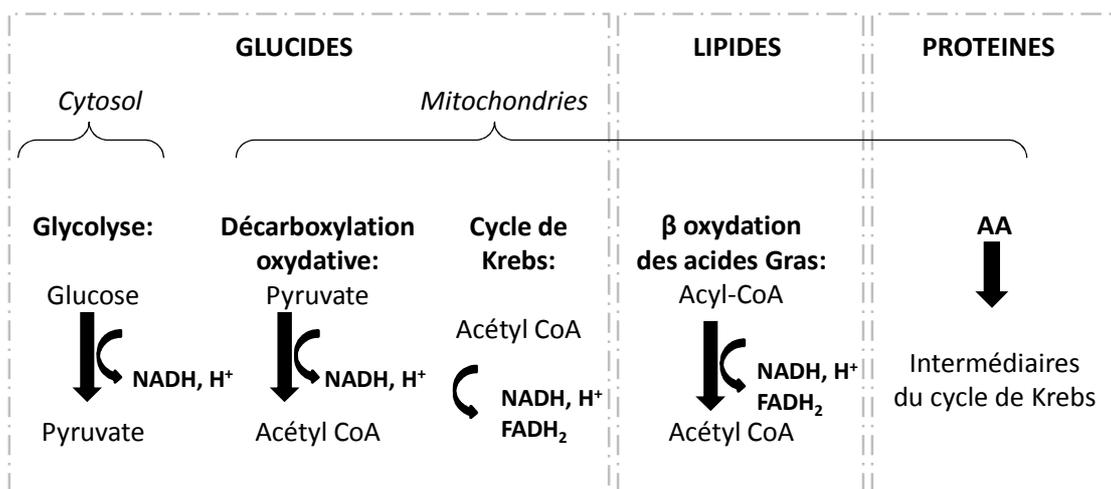


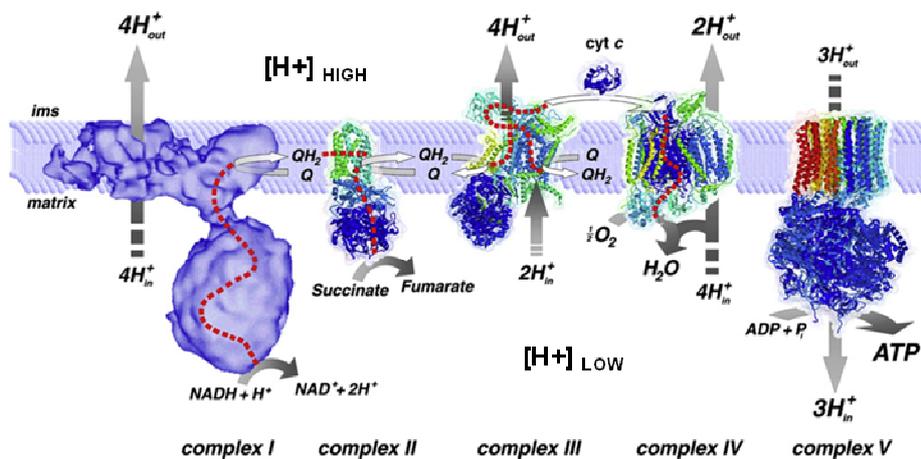
Figure 13. Schéma récapitulatif du catabolisme des molécules énergétiques.

### III-2-4. La chaîne respiratoire et l'ATP synthase

La chaîne respiratoire tient un rôle prépondérant au sein du métabolisme puisque la réoxydation des coenzymes réduits résultant de divers processus comme le cycle de Krebs, l'oxydation du pyruvate ou encore de l'oxydation des acides gras, est impérative pour la poursuite de ces différentes voies métaboliques. Les propriétés de réduction de ces coenzymes vont également permettre la régénération de l'ATP *via* la phosphorylation oxydative impliquant un transfert d'électrons à l'accepteur final : l'oxygène. En tant qu'accepteur final, l'O<sub>2</sub> n'intervient qu'au tout dernier stade. Pour généraliser, toutes les étapes d'oxydation enzymatique des nutriments provenant de l'alimentation sont sous le joug de la respiration cellulaire. Elle assure la combustion des hydrogènes des coenzymes réduits en présence d'oxygène moléculaire selon l'équation:  $[4H] + O_2 \rightarrow 2H_2O$ . Cette cascade métabolique se modélise par une série de transporteurs d'électrons dont la plupart sont assimilables à des protéines enchâssées dans la membrane interne, et dont les groupements prosthétiques sont capables de donner ou d'accepter des électrons : il s'agit de flavoprotéines, de cytochromes, de protéines fer-soufre, de protéines à cuivre ainsi que d'un élément enchâssé dans la bicouche lipidique, l'ubiquinone, également rencontré sous la dénomination de coenzyme Q. Les électrons sont échangés entre transporteurs selon une séquence bien déterminée par un potentiel de réduction croissant. Autrement dit, le sens de transfert des électrons est établi selon une croissance des valeurs des potentiels d'oxydoréduction de chacun des couples. Ces transporteurs sont organisés en cinq grands complexes multienzymatiques constitutifs de la membrane interne mitochondriale. Ces derniers sont reliés entre eux par l'intermédiaire du cytochrome C et du coenzyme Q (Figure 14).

#### III-2-4. a) Les complexes de la chaîne respiratoire

L'OXPPOS se déroule au niveau de la membrane interne des mitochondries. Ce processus fait intervenir les complexes I à IV de la chaîne respiratoire, ainsi que l'ATP synthase. Les électrons vont principalement intégrer la chaîne de transport des électrons *via* les deux premiers complexes (cf. Figure 14).



**Figure 14. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale (Adapté de Yu-Wai-Man *et al.*, 2011).**

Le complexe I est appelé NADH ubiquinone oxydoréductase (ou NADH déshydrogénase). Il s'agit du premier complexe protéique de la chaîne respiratoire. Son activité permet d'assurer le transfert de deux électrons issus d'une molécule de NADH vers l'ubiquinone, permettant ainsi le transfert de 4 protons vers l'espace intermembranaire. Il s'agit du plus gros complexe du système OXPHOS; en effet, il comprend 45 sous-unités protéiques dont 38 sont codées par le génome nucléaire, et 7 directement par le génome mitochondrial, pour un poids moléculaire avoisinant les 1000 kDa. La roténone est un inhibiteur spécifique de ce complexe.

Le complexe II, ou succinate ubiquinone réductase, aussi appelé succinate déshydrogénase est particulier puisqu'il s'agit de la seule enzyme de la chaîne de transport d'électrons à prendre part au cycle de Krebs, où elle catalyse la transformation du succinate en fumarate. Ce complexe d'environ 130 kDa est formé de 4 sous-unités, SDHA à SDHD, toutes codées par des gènes nucléaires. Il permet de transférer les électrons du succinate vers l'ubiquinone, et fait intervenir le cofacteur FAD qui joue le rôle d'accepteur d'électrons, ainsi que trois centres fer-soufre. L'activité de ce complexe n'implique pas de transfert de proton vers l'espace intermembranaire. Le malonate permet d'inhiber la complexe II.

Le complexe III ou Ubiquinol-cytochrome C réductase, est également rencontré sous la dénomination de complexe du cytochrome  $bc_1$ . Ce complexe dimérique comprend deux monomères dont chacun est constitué de 12 sous-unités, pour une masse totale d'environ 300 kDa. L'intégralité de ces sous-unités est codée par l'ADN nucléaire, excepté le cytochrome b d'origine mitochondriale. Son activité est impliquée dans l'oxydation de l'ubiquinol, et permet la translocation de deux protons vers l'espace intermembranaire. Cette enzyme catalyse ainsi

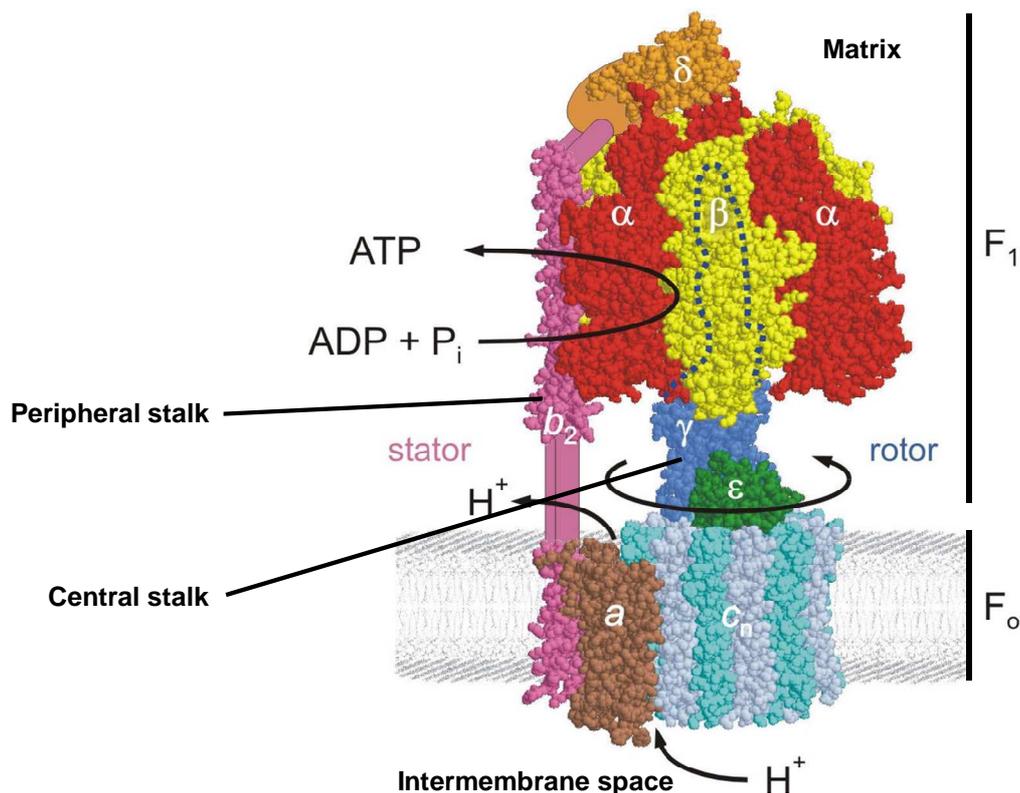
le transfert de deux électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c. L'antimycine A est un inhibiteur spécifique de ce complexe.

Le complexe IV ou cytochrome oxydase est la dernière enzyme impliquée dans le transfert des électrons. Elle comprend 13 sous-unités dont 3 (COXI, COXII et COXIII) sont codées par l'ADNmt. Il permet de transférer les électrons depuis le cytochrome c jusqu'à leur accepteur final, réduisant ainsi l'oxygène en eau. Lors de cette ultime étape, le transfert des électrons à l'oxygène permet d'extruder quatre protons dans l'espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur de ce complexe.

A ce stade, la réduction complète d'une molécule d'O<sub>2</sub> aura permis de transférer 10 protons dans l'espace intermembranaire contre le gradient de protons. Comme précisé précédemment, le transfert progressif des électrons à l'accepteur final est hautement exergonique (force protonotrice modélisée par la théorie chimio-osmotique de Mitchell), et va permettre le transport de protons dans l'espace intermembranaire. Le complexe V ou ATP synthase va permettre le retour des protons dans la matrice. Ce gradient de protons assure le fonctionnement de l'ATP synthase, permettant ainsi la phosphorylation de l'ADP.

#### **III-2-4. b) Le complexe V ou F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase**

Comme évoqué précédemment, ce cinquième et dernier complexe, encore appelé F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase ou ATP synthase, de la membrane interne mitochondriale, permet d'utiliser la force protonotrice  $\Delta p$  générée par le système de transport des électrons, pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP, du phosphate inorganique et du Mg<sup>2+</sup> (Boyer, 1997; Börsch et Duncan, 2013). Sa structure est particulièrement complexe (cf. Figure 15), et peut être subdivisé en trois sous-complexes fonctionnellement distincts: le domaine F<sub>1</sub>; le domaine F<sub>0</sub> intrinsèque à la membrane interne; et enfin deux antennes connectrices, la centrale et la périphérique, qui permettent de connecter les deux principaux domaines fonctionnels.



**Figure 15. Structure schématique de la F0F1 ATPase d'Escherichia coli (Adapté de Weber, 2010).**

Le domaine F1 est situé du côté matriciel. Cette partie comprend les sous-unités catalytiques de l'enzyme ainsi que le pied central de l'enzyme qui constitue une partie du rotor. Le domaine F1 est composé des sous-unités  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\delta_1$ ,  $\epsilon_1$  (les chiffres en indice indiquant la stœchiométrie de l'association).

Le domaine F0 permet d'ancrer solidement le complexe dans la membrane interne mitochondriale. Il fait office de canal à protons, pour permettre leur passage à travers la membrane interne. La partie F0 est composée des sous-unités  $9_{10}$ ,  $6_1$ ,  $8_1$ ,  $4_1$ ,  $h_2$ ,  $d_2$ ,  $OSCP_{1,f_1,i_1/j_1}$  (les chiffres en indice indiquant la stœchiométrie de l'association). Les sous-unités c sont formées de 2 hélices transmembranaires, et la sous-unité a forme 2 demi-canaux à protons permettant le transfert de ces derniers de l'espace intermembranaire vers la matrice.

Les parties mobiles du complexe protéique comprenant la partie F1 et l'antenne centrale constitue le rotor de l'enzyme tandis que les parties immobiles comprenant la partie F0 et l'antenne périphérique se regroupent sous la dénomination de stator.

## ***Régulation de l'ATP synthase***

L'expression de l'ATP synthase est régulée au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, et sa stabilité à la membrane fait intervenir les protéines impliquées dans l'assemblage du complexe; mais des modalités plus fines permettent de réguler son activité en « temps réel », de façon dynamique. Ces modalités impliquent notamment le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$ , des modifications post-translationnelles, ainsi qu'une interaction directe avec différents partenaires protéiques (Schwerzmann & Pedersen, 1986; Kagawa & Ohta, 1990; Long *et al.*, 2015).

La première modalité de régulation de l'ATP synthase repose sur l'activation de son inhibiteur physiologique IF1 (*Inhibitory Factor 1*). Cependant, cette partie ne sera pas développée ici puisqu'elle fera l'objet d'un chapitre complet à la fin de cette synthèse bibliographique.

Enfin, il a été montré que certaines protéines interagissent directement avec une ou plusieurs sous-unités du complexe V pour réguler son activité; nous allons ici en donner un aperçu non exhaustif.

Un pool mitochondrial de la protéine p53, présent à la fois dans l'espace intermembranaire et dans la matrice, semble interagir avec la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase afin de promouvoir l'assemblage du complexe (Bergeaud *et al.*, 2013).

Un rôle pour le RAh dans la régulation du complexe V a été identifié. En effet, celui-ci interagirait avec la sous-unité ATP5a1 de l'ATPase dans les cellules Hepa C12. Cette interaction est perdue en présence de TCDD, et est à l'origine d'une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale. Ainsi, une fraction de RAh se trouverait à la mitochondrie et permettrait de finement réguler l'activité de l'organite, sa perte entraînant d'importants dysfonctionnements (Tappenden *et al.*, 2011).

Bcl-XL serait également un régulateur majeur de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, notamment dans les neurones. Il interagirait en particulier avec la sous-unité  $\beta$  de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase pour améliorer le rendement de OXPHOS, en limitant les fuites de protons dans le but d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique (Alavian *et al.*, 2011).

L'interaction de la PKC- $\alpha$  (Protein Kinase C- $\alpha$ ) avec l'ATPase a également été décrite au niveau rénal. Les bénéfices de cette interaction semblent multiples : 1) la PKC- $\alpha$  stabiliserait la sous-unité  $\gamma$ , préservant son expression en situation de stress; 2) augmenterait le rendement de la phosphorylation oxydative en interagissant avec les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ; 3) elle

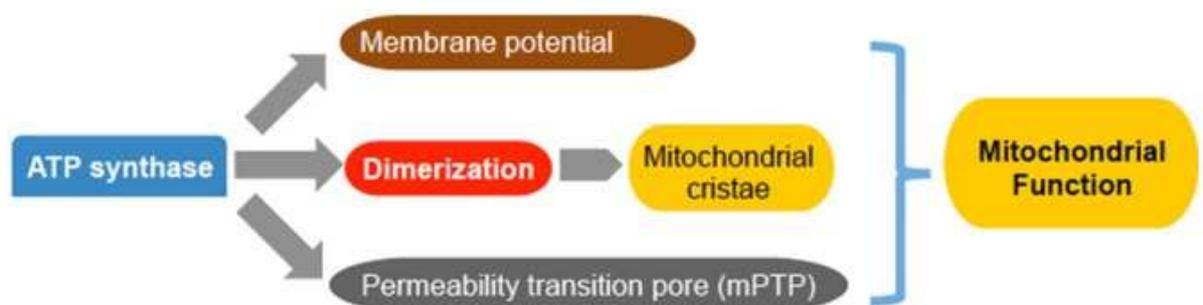
préservait l'activité de l'ATPase ainsi que le contenu en ATP des tubules rénaux proximaux après une phase d'hypoxie (Nowak & Bkajsova, 2015).

### ***Rôles de l'ATP synthase***

Parallèlement à la synthèse d'ATP précédemment abordée, l'ATP synthase exerce également d'autres fonctions essentielles dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale (cf. Figure 16).

En premier lieu, cette enzyme va jouer un rôle essentiel dans le maintien du potentiel de membrane mitochondrial  $\Delta\Psi_m$ . Cette fonction repose sur la réversibilité de l'activité de ce complexe protéique rotatif. Ainsi, le sens de rotation du complexe va permettre soit la synthèse, soit l'hydrolyse de l'ATP, afin de maintenir le gradient de protons (Appleby *et al.*, 1999). Cette fonction apparait essentielle puisqu'au-delà du maintien de l'intégrité mitochondriale, le  $\Delta\Psi_m$  va réguler la machinerie d'importation protéique mitochondriale (Baker *et al.*, 2007). La F0F1ATPase intervient également dans la régulation de la dynamique et de l'organisation du réseau mitochondrial, en modulant notamment la morphologie des crêtes. Cette fonction permettrait notamment d'adapter l'organite en fonction des conditions physiologiques et de la demande énergétique, en modulant l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire (Giraud *et al.*, 2002; Paumard *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2011; Jimenez *et al.*, 2014).

Enfin, la dimérisation de ce complexe serait également impliquée dans la formation et l'ouverture du PTP, jouant notamment un rôle prépondérant dans le contrôle de la libération du cytochrome c au cours de l'apoptose ( Xiong *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015; Bernardi *et al.*, 2015).



**Figure 16. Principales contributions de l'ATP synthase à la fonction mitochondriale (D'après Long *et al.*, 2015).**

### III-2-4. c) Le potentiel de membrane mitochondrial

La force protomotrice totale  $\Delta p$  dépend de deux composantes distinctes: 1) un gradient électrique, à savoir le potentiel de membrane mitochondrial,  $\Delta\Psi_m$ ; et 2) un gradient chimique de pH mitochondrial,  $\Delta pH_m$ . La part respective de chacun de ces deux processus dans la force protomotrice est modélisée par l'équation suivante à 37°C:  $\Delta p \text{ (mV)} = \Delta\Psi_m - 60 \Delta pH_m$ . Cette force protomotrice est généralement comprise entre 180 et 200 mV, et le  $\Delta\Psi_m$  est le facteur qui y contribue le plus largement, en moyenne à hauteur de 85% (Perry *et al.*, 2011; Santo-Domingo & Demaurex, 2012).

Le  $\Delta\Psi_m$  est donc le résultat d'un équilibre complexe du gradient électrochimique, résultant de l'équilibre entre deux systèmes de transport fonctionnellement et structurellement intégrés: les pompes à protons situées le long de la chaîne de transport des électrons et le complexe de la F0F1-ATPase, qui va permettre le retour de ces protons dans la matrice.

La valeur de la force protomotrice  $\Delta p$  va ainsi être au premier plan dans la régulation du métabolisme mitochondrial, fournissant et régulant finement l'énergie nécessaire à la production d'ATP. Ceci détermine ainsi le statut énergétique de l'organite, d'où un rôle de  $\Delta p$  dans l'homéostasie ionique cellulaire, ou encore dans la susceptibilité de la cellule vis-à-vis de la mort cellulaire. La composante  $\Delta\Psi_m$  va quant à elle plus spécifiquement moduler la capacité de séquestration calcique de l'organite, la production d'espèces réactives de l'oxygène, influençant fortement le devenir des cellules (Kadenbach *et al.*, 2003; Duchon, 2004). En situation de stress, *in vivo*, l'augmentation du  $\Delta\Psi_m$  serait due à une augmentation de la concentration calcique, et à la déphosphorylation de la cytochrome c oxydase (Kadenbach, 2003). A l'inverse, la dépolarisation serait le fruit d'une augmentation du pool d'AMPc et de la phosphorylation de la cytochrome c oxydase (Lee *et al.*, 2001; Kadenbach *et al.*, 2003).

La perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (MOMP) se modélise en termes de  $\Delta\Psi_m$  par une dépolarisation, et est considérée comme un point de non retour dans l'exécution de la cascade apoptotique, permettant notamment la libération de facteurs pro-apoptotique comme le cytochrome c (Ricci *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2006; Ow *et al.*, 2008).

Le maintien du potentiel de membrane mitochondrial a été décrit pour ralentir l'exécution de la mort cellulaire (Shimizu *et al.*, 1996). L'hyperpolarisation transitoire de la membrane mitochondriale constituerait quant à elle un point de contrôle dans l'exécution de la cascade apoptotique (Perl *et al.*, 2004). Cependant, cette hyperpolarisation est également associée à la

reprogrammation métabolique identifiée dans les tumeurs (Hockenbery 2010), et serait intimement liée aux capacités de prolifération et de survie des cellules cancéreuses (Heerdt *et al.*, 2006). Cette hyperpolarisation de la membrane mitochondriale trouverait principalement son origine dans la diminution de l'activité des complexes OXPHOS (Forkink *et al.*, 2014), mais pourrait également être liée à des altérations des mécanismes de fusion/fission mitochondriale qui régulent la dynamique mitochondriale (Pich *et al.*, 2005).

Une telle hyperpolarisation de la membrane mitochondriale a été retrouvée sous l'effet de contaminants environnementaux dont le B[a]P dans la lignée F258 (Huc *et al.*, 2003; Hardonnière *et al.*, 2015), mais aussi en réponse au bisphénol A dans la lignée HepG2 (Huc *et al.*, 2012). Cependant, cet impact sur le métabolisme mitochondrial, et en particulier le rôle de cette hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans les effets de contaminants environnementaux reste à définir. Ces mécanismes pourraient notamment prendre part aux effets cancérogènes de ces molécules, en favorisant par exemple un métabolisme de type glycolyse aérobie.

### **III-2-5. Métabolisme aérobie *versus* métabolisme anaérobie**

Dans une cellule normale différenciée, c'est la présence d'oxygène, l'accepteur final d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire, qui va conditionner la prise en charge des métabolites (acétyl-CoA, pyruvate) et des équivalents réduits (NAD(P)H, FADH<sub>2</sub>) produits par ces différentes voies métaboliques.

En condition aérobie, les cellules normales vont métaboliser le glucose en pyruvate dans le cytosol *via* la glycolyse. Par la suite, ce pyruvate va préférentiellement rejoindre la mitochondrie où il va être intégralement oxydé en dioxyde de carbone. Le métabolisme repose alors en grande partie sur la conversion aérobie du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA va ensuite s'ajouter sur l'oxaloacétate pour former le citrate et ainsi alimenter le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs, étape ultime du catabolisme. Ce cycle composé de huit étapes, va générer deux molécules de CO<sub>2</sub>, une molécule de GTP, ainsi que des coenzymes réduits: NADH et FADH<sub>2</sub>. Ces derniers seront ensuite respectivement réoxydés au niveau de la chaîne respiratoire en NAD<sup>+</sup> et FAD. Le bilan de l'oxydation complète du pyruvate par le cycle de Krebs va alors être le suivant: **Acétyl-CoA + 3NAD<sup>+</sup> + FAD + GDP + P<sub>i</sub> + 2H<sub>2</sub>O → 2CO<sub>2</sub> + HSCoA +**

**3NADH + 2H<sup>+</sup> + FADH<sub>2</sub> + GTP**. Les électrons enlevés au glucose et transférés aux coenzymes réduits au cours du processus d'oxydation, vont finalement rejoindre la chaîne respiratoire mitochondriale jusqu'à la réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Le gradient de protons alors généré va permettre la synthèse d'ATP. Le bilan énergétique de l'oxydation complète d'une molécule de glucose suite à sa prise en charge séquentielle par la glycolyse, le cycle de Krebs et l'OXPPOS est de 38 molécules d'ATP. La plus grande partie des besoins énergétiques de l'organisme sont ainsi couverts par la phosphorylation oxydative. On estime que la quantité moyenne journalière d'ATP produite chez l'homme est de 65 kg, et peut être considérablement plus élevée en cas d'activité intense (Berridge, 2010).

En revanche, en condition anaérobie, la glycolyse va devenir la source principale d'énergie, et la part du pyruvate distribuée à la mitochondrie va être alors réduite. La quantité d'O<sub>2</sub> disponible détermine fortement le métabolisme mitochondrial: l'accepteur final étant limitant, la chaîne respiratoire va être dans l'incapacité de régénérer le pool de coenzymes. Du fait de l'intégration fonctionnelle du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative, la capacité à prendre en charge le pyruvate issu de la glycolyse va donc être directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dans le tissu. En l'absence d'O<sub>2</sub>, le rendement de la glycolyse va donc chuter à seulement deux ATP par molécule de glucose métabolisée.

## **Chapitre IV: Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses**

Comme nous l'avons vu précédemment, le processus de cancérisation est un phénomène complexe conduisant à de nombreux remaniements de l'homéostasie cellulaire. Parmi ces modifications, s'opère un profond remodelage du métabolisme énergétique, en lien avec l'acquisition des nouvelles propriétés biologiques des cellules cancéreuses, décrites préalablement dans le paragraphe II-3.

### **IV-1. L'effet Crabtree**

Dès 1929, Herbert G Crabtree avait observé que la disponibilité en glucose affectait différemment les cellules normales et les cellules tumorales. Alors qu'une quantité plus importante de ce substrat n'avait pas ou très peu d'effet sur le comportement métabolique des premières, se traduisant éventuellement par une très fine élévation du niveau d'O<sub>2</sub> consommé, cela avait pour effet de significativement réduire la consommation d'O<sub>2</sub> des secondes (Crabtree, 1929; Diaz-Ruiz *et al.*, 2009). Cette plasticité métabolique semble fortement avantager les cellules cancéreuses *in vivo*, leur permettant de nombreux ajustements métaboliques afin de faire face à la grande hétérogénéité de conditions retrouvées dans les excroissances malignes solides (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Ainsi, cette grande plasticité métabolique se traduirait par une plus grande capacité à adapter structurellement et fonctionnellement la machinerie énergétique en fonction des substrats (Rossignol *et al.*, 2004).

Cet effet modélise particulièrement bien l'addiction au glucose des cellules tumorales, et légitimement, de fait, la reprogrammation métabolique s'opérant au cours de la transformation des cellules dans de nombreux cancers. Cette reprogrammation est plus connue sous le nom d'effet Warburg.

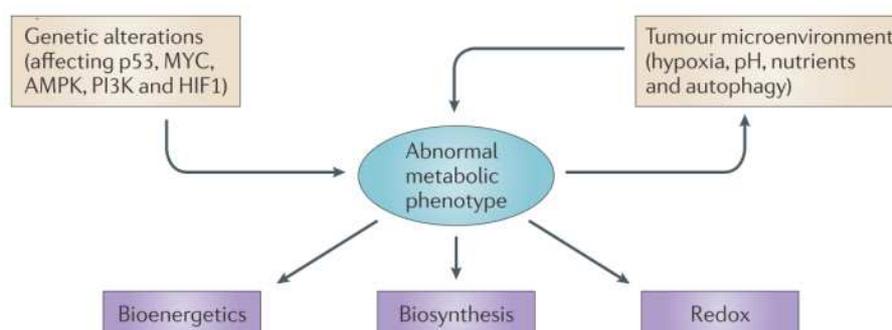
### **IV-2. L'effet Warburg**

En aérobiose, le pyruvate est converti en acétyl-CoA et en ATP. Cet ATP produit va pouvoir, par rétroaction, réguler l'activité de la PFK, contrôlant ainsi l'intensité du flux glycolytique. Cette modalité de contrôle du pool d'ATP *via* la glycolyse a été qualifiée d'effet Pasteur

(Malthièry & Savagner, 2006). Néanmoins, celle-ci devient obsolète en l'absence d'oxygène puisque la production d'ATP du compartiment mitochondrial chute drastiquement. Consécutivement, le métabolisme glycolytique s'intensifie graduellement. De plus, faute de voie oxydative, le NAD<sup>+</sup> nécessaire à la glycolyse n'est plus régénéré au niveau du complexe I, mais provient dès lors de la réduction du pyruvate en lactate (couplée à l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>), et conduit à un emballement du cycle glycolytique. Cette voie permet donc à la cellule d'ajuster immédiatement son métabolisme sur un mode glycolytique sans remodelage métabolique profond.

Contrairement à l'effet Pasteur, régissant l'adaptation immédiate du métabolisme énergétique des cellules et n'impliquant aucune synthèse protéique (Payen *et al.*, 2015), l'effet Warburg va impliquer des changements métaboliques profonds, et témoigne de besoins énergétiques particuliers, propres au phénotype cancéreux (division cellulaire, amplification des processus biosynthétiques etc.). Ainsi, une des évolutions majeures des cellules cancéreuses est liée à une reprogrammation de leur métabolisme énergétique. Au même titre que les cellules non transformées, les cellules cancéreuses ont besoin de produire de l'énergie pour assurer leur survie. Toutefois, elles doivent également assurer la synthèse de biomolécules pour permettre leur croissance et leur division, et ainsi répondre aux capacités de prolifération soutenues du tissu néoplasique. De nombreuses modifications liées au métabolisme vont donc apparaître au cours de leur transformation. En particulier, l'altération métabolique la plus fréquemment identifiée dans les cellules tumorales se caractérise par une plus grande entrée de glucose dans le cytosol, associée à une consommation plus importante de ce substrat et à une production accrue de lactate (Moreno-Sanchez *et al.*, 2009). C'est d'ailleurs sur ce principe qu'est basé l'outil diagnostique de détection des tumeurs dans l'organisme, par une technique d'imagerie médicale fonctionnelle. La tomographie par émission de positons ou TEP permet ainsi, après injection d'un traceur comme le <sup>18</sup>F-FDG (fluorodeoxyglucose marqué avec un isotope radioactif du fluor), de mesurer en 3D l'activité métabolique au sein des tissus. Les zones les plus avides en glucose, et donc potentiellement tumorales, vont donc présenter une plus forte concentration de cet analogue du glucose, ce qui se traduit par un signal plus important en imagerie (Lewis *et al.*, 2015). Par ailleurs, un flux glycolytique élevé (López-Rios *et al.*, 2007), ou une forte concentration de lactate dans les tumeurs (Lee *et al.*, 2009), sont en général un facteur de mauvais pronostic. Ainsi, contrairement aux cellules normales, la plupart des cellules cancéreuses présentent un métabolisme de type glycolytique, et ce, indépendamment de la présence d'oxygène. Ce phénomène a été identifié pour la première

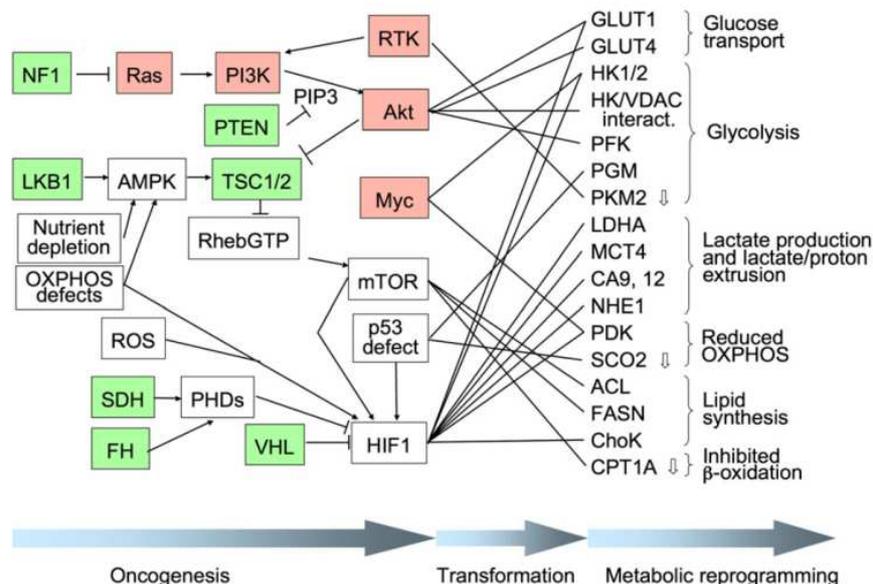
fois par le physiologiste allemand Otto Heinrich Warburg dans les années 1920s, suite à l'observation d'une accumulation importante de lactate dans le milieu extracellulaire (Warburg, 1927). En outre, cette découverte le conduira plus tard à formuler l'hypothèse d'un dysfonctionnement mitochondrial comme origine du cancer (Warburg, 1956). On retrouve ainsi cette reprogrammation métabolique sous les dénominations suivantes: "effet Warburg" ou encore "glycolyse aérobie". Depuis, le métabolisme énergétique de très nombreux modèles cellulaires présentant un fort potentiel prolifératif a pu être caractérisé. A l'évidence, la majorité d'entre eux ne présentent pas de dysfonctionnement de leur machinerie oxydative (Moreno-Sanchez, 2009). Il s'agit donc d'altérations réversibles. Paradoxalement et malgré un besoin énergétique accru par rapport aux cellules normales du fait de leur prolifération soutenue, les cellules cancéreuses vont donc privilégier la glycolyse aérobie, une voie métabolique présentant un faible rendement du point de vue de la synthèse en ATP. Dans ces conditions, on peut donc se questionner sur les avantages d'un métabolisme reposant presque exclusivement sur la glycolyse. Cependant, bien que le rendement en ATP de la glycolyse soit faible, l'augmentation du flux glycolytique est telle que la quantité d'ATP produite par cette voie peut dépasser celle habituellement constatée lorsque la phosphorylation oxydative est prépondérante (Guppy *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 2001). La prépondérance de cette voie métabolique permet aussi aux cellules cancéreuses de générer de nombreux intermédiaires métaboliques, nécessaires aux biosynthèses, et ce, afin de maintenir un état de prolifération chronique. A ce propos, le glucose est le nutriment le plus abondant au sein de l'organisme. Par ailleurs, le maintien d'un métabolisme presque exclusivement glycolytique, en concourant à la mise en place d'un microenvironnement tumoral acide et appauvri en O<sub>2</sub>, va largement contribuer au développement de la malignité des cellules transformées (Figure 17).



**Figure 17. De nombreux facteurs contribuent à la régulation du phénotype métabolique des cellules cancéreuses (D'après Cairns *et al.*, 2011).**

### IV-3. Origine et bases moléculaires de l'effet Warburg

La reprogrammation métabolique de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse est un mécanisme complexe. Ainsi, celle-ci est la résultante de nombreuses modifications moléculaires s'opérant au cours de la transformation des cellules cancéreuses. Cette dernière est liée à l'activation d'oncogènes ou à l'inhibition de suppresseurs de tumeurs (cf. Figure 18) (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Jose *et al.*, 2011), ce qui va permettre aux cellules de survivre, et même de proliférer, malgré une quantité limitée de nutriments (Vander Heiden *et al.*, 2009).



**Figure 18. Origine moléculaire de la reprogrammation métabolique dans les cellules cancéreuses (Kroemer & Pouyssegur, 2008).**

Parmi les acteurs moléculaires connus pour réguler cette reprogrammation métabolique dans le cancer, certains, qui constituent des cibles bien identifiées du B[a]P. Certains de ces acteurs seront détaillés dans ce qui suit. Une attention particulière sera portée sur le transporteur NHE1 dans la partie IV-4, celui-ci ayant fait l'objet de ce travail de thèse.

### **IV-3-1. Régulation positive**

#### **IV-3-1. a) L'hexokinase II**

Cette enzyme est régulièrement fortement exprimée dans le cancer; elle possède la particularité de catalyser la première étape de la glycolyse, catalysant la transformation du glucose en glucose-6-phosphate. Il a été démontré que la régulation de l'HKII, enzyme clé de la glycolyse, jouait un rôle prépondérant dans l'acquisition du phénotype Warburg. Ainsi, une augmentation précoce de son expression aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* a été reliée aux premières phases de la cancérogénèse hépatique. Dans ce cas, la surexpression de l'HKII coïncidait avec l'acquisition d'un phénotype hautement prolifératif, ainsi qu'avec la reprogrammation métabolique vers la glycolyse aérobie, jouant un rôle déterminant dans la croissance tumorale et la survie cellulaire (Mayer *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2002). L'HKII interagit directement avec les mitochondries au niveau du VDAC. Cette interaction limite la sortie de l'ATP mitochondrial depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol, mais va également pouvoir bloquer l'exécution de l'apoptose, en limitant significativement l'interaction des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak avec le VDAC. L'HKII apparaît donc comme un puissant régulateur de l'exécution apoptotique, sous le contrôle de la voie Akt (Majewski *et al.*, 2004; Gall *et al.*, 2011). L'association mitochondriale de l'HKII est notamment régulée par la voie Akt (Robey & Hay, 2005; Stiles, 2009). Ainsi, la phosphorylation de la thréonine 473 de l'HKII par Akt serait un signal d'adressage mitochondrial de cet enzyme, augmentant significativement la quantité d'HKII liée à la mitochondrie (Roberts *et al.*, 2013). La contribution de l'HKII à l'effet Warburg est donc double, puisqu'en plus d'assurer la survie par sa liaison sur le VDAC, bloquant ainsi l'ouverture du PTP, elle va également être à l'origine d'une augmentation importante du flux glycolytique (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2009; Krasnov *et al.*, 2013).

#### **IV-3-1. b) PI3K/Akt**

De nombreux cancers présentent des mutations à l'origine de pertes de fonction de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) ou au contraire de gains de fonction de la PI3K. L'hyperactivation de la voie PI3K/Akt dans les tumeurs est connue de longue date pour amplifier l'expression des enzymes de la glycolyse (Elstrom *et al.*, 2004). Cependant, cette hyperactivation serait également impliquée dans la régulation de certains effecteurs de

OXPHOS (Goo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). La voie PI3K est connue pour réguler certaines isoformes de transporteurs du glucose dont GLUT1, augmentant ainsi l'entrée de glucose dans les cellules, et stimulant l'activité de la PFK (De Berardinis *et al.*, 2007). Au niveau hépatique, il a par ailleurs été démontré *in vitro* dans des lignées humaines de CHC, et *in vivo* chez la souris, que l'induction de la PKM2 (*Pyruvate Kinase subtype M2*) par cette voie jouerait un rôle de premier ordre dans la reprogrammation métabolique des cellules hépatiques au cours de la cancérogénèse (Nemazanyy *et al.*, 2013).

#### **IV-3-1. c) c-myc**

Le facteur de transcription c-myc est apparu comme un contributeur majeur de l'effet Warburg. La surexpression de l'oncoprotéine c-myc a en effet été montrée comme régulant le métabolisme glycolytique, stimulant à la fois l'entrée du glucose et la glycolyse (Osthus *et al.*, 2000); cette stimulation serait par ailleurs étroitement liée à la division cellulaire (Osthus *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2008; Dang, 2013). C-myc serait également impliqué dans la régulation du catabolisme de la glutamine (Dang, 2010). Paradoxalement à sa contribution dans l'effet Warburg, cet oncogène interviendrait aussi dans la biogenèse mitochondriale (Morrish & Hockenbery, 2014).

#### **IV-3-1 d) HIF1 $\alpha$**

En condition hypoxique, la déshydroxylation d'HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-Inductible Factor 1-alpha*) va le stabiliser en bloquant sa prise en charge par l'E3 ubiquitine ligase VHL (Von Hippel-Lindau). L'isoforme  $\alpha$  va alors pouvoir se dimériser avec l'isoforme  $\beta$  constitutivement exprimée. Le dimère HIF1 ainsi formé va réguler un nombre très important de gènes du métabolisme énergétique en se fixant sur les motifs HRE (Hypoxia Response Element) de leur promoteur (Tennant *et al.*, 2009). Ainsi, HIF1 $\alpha$  va généralement activer de nombreux gènes de la glycolyse comme la PFK1, la GAPDH, la PKM2, la LDHA ou encore l'HKII; de façon concomitante, ce facteur de transcription va induire la répression de certaines enzymes du cycle de Krebs (PDK1 et GLS2) (Kim *et al.*, 2006; Gameiro *et al.*, 2013) et de la phosphorylation oxydative (Hervouet *et al.*, 2008).

#### **IV-3-1. e) K-ras**

La transformation des cellules associée à l'oncogène K-ras en condition aérobie, semble plutôt reposer sur la voie des pentoses phosphate et le catabolisme de la glutamine pour alimenter le TCA, que sur une reprogrammation très marquée vers la seule glycolyse (Weindberg *et al.*, 2010). De plus, il est apparu que l'intégrité du métabolisme mitochondrial devait être préservé pour induire la cancérogénèse médiée par K-ras *in vivo* (Weindberg *et al.*, 2010), une augmentation du métabolisme mitochondrial sous l'impulsion de cet oncogène ayant même été rapporté (Telang *et al.*, 2007).

#### **IV-3-2. Régulation négative**

##### **IV-3-2. a) p53**

La protéine p53 joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique, modulant à la fois la glycolyse et l'OXPPOS (Vousden & Ryan, 2009).

En l'absence de mutation, l'augmentation de p53 engendre généralement une diminution de la glycolyse, ainsi que de l'expression des transporteurs GLUT 1 et 4, participant ainsi au rôle suppresseur de tumeurs de p53. Cependant, les mutations ou les pertes de fonctions de cette protéine retrouvées dans le cancer, conduisent souvent à la perte de ce rôle régulateur, favorisant ainsi la glycolyse. Un tel effet inhibiteur du point de vue de la glycolyse pourrait être dû à l'inhibition de la voie PI3K/Akt par la protéine PTEN, positivement régulée par p53 (Cairns *et al.*, 2011). L'inhibition de la voie NFκB par p53 contribuerait également à cette régulation négative. Une activation de cette dernière voie, en lien avec une augmentation du flux glycolytique et de la prolifération cellulaire en l'absence de contrôle par p53, a déjà été décrite (Kawauchi *et al.*, 2008). La perte de fonction de p53 est également à l'origine d'une très forte diminution de la protéine TIGAR (*TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*). Or TIGAR est une protéine qui est connue pour réprimer la glycolyse au niveau de la PFK2/FBPase-2 (*6-PhosphoFructo-2-Kinase/Fructose-2,6-BiphosPhatase*), et ce, au profit de la voie des pentoses phosphates afin de générer du NADPH. La perte de TIGAR va donc se traduire par une forte induction de la glycolyse (Bensaad *et al.*, 2006; Green & Chipuk, 2006).

Parallèlement à ses effets répresseurs sur la glycolyse, la protéine p53 sauvage est connue pour positivement réguler certains composants d'OXPPOS, en induisant notamment l'expression de SCO2 (*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2assembly protein*) (Matoba *et al.*,

2006), protéine impliquée dans la biogenèse et l'assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire (Yang *et al.*, 2010).

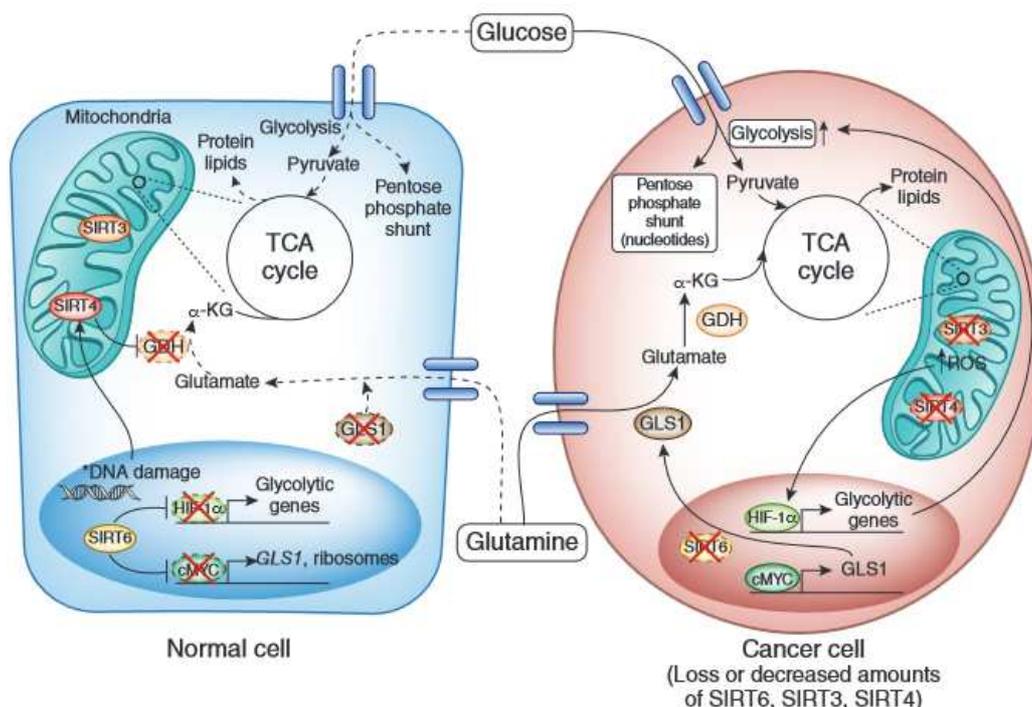
#### **IV-3-2 b) L'AMPK**

L'AMPK (*5'-AMP-activated protein Kinase*) semble réguler négativement l'effet Warburg. De ce fait, l'inactivation de l'AMPK $\alpha$  contribue fortement à la mise en place d'une reprogrammation métabolique vers la glycolyse aérobie (Faubert *et al.*, 2013). Cette inhibition de la voie AMPK au cours de la reprogrammation métabolique dans le cancer serait principalement médiée par l'activation de la voie PI3K. Cette inactivation de l'AMPK via la PI3K serait à l'origine de la répression de l'expression des principaux régulateurs transcriptionnels du métabolisme; cette répression passerait notamment par une diminution de la phosphorylation, par l'AMPK, de PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) sur ses thréonine 177 et sérine 538 par l'AMPK. L'originalité de cette étude résulte dans le fait que la reprogrammation vers la glycolyse n'est pas la résultante d'une régulation positive directe de l'expression et de l'activité des enzymes de la glycolyse, mais repose au contraire sur l'inhibition active de l'AMPK, conduisant à une diminution de l'expression des gènes du TCA et d'OXPPOS, à l'origine de dysfonctionnements mitochondriaux (Antico Arciuh *et al.*, 2013). La perte de l'activité de l'AMPK a été observée dans plusieurs types de tumeurs, et joue un rôle dans leur reprogrammation métabolique, favorisant ainsi la croissance et la prolifération. Paradoxalement, l'activation de la voie AMPK pourrait également faciliter le développement tumoral en conférant une plus grande plasticité métabolique aux cellules cancéreuses en situation de stress (Faubert *et al.*, 2015).

#### **IV-3-2. c) Les sirtuines (SIRT)**

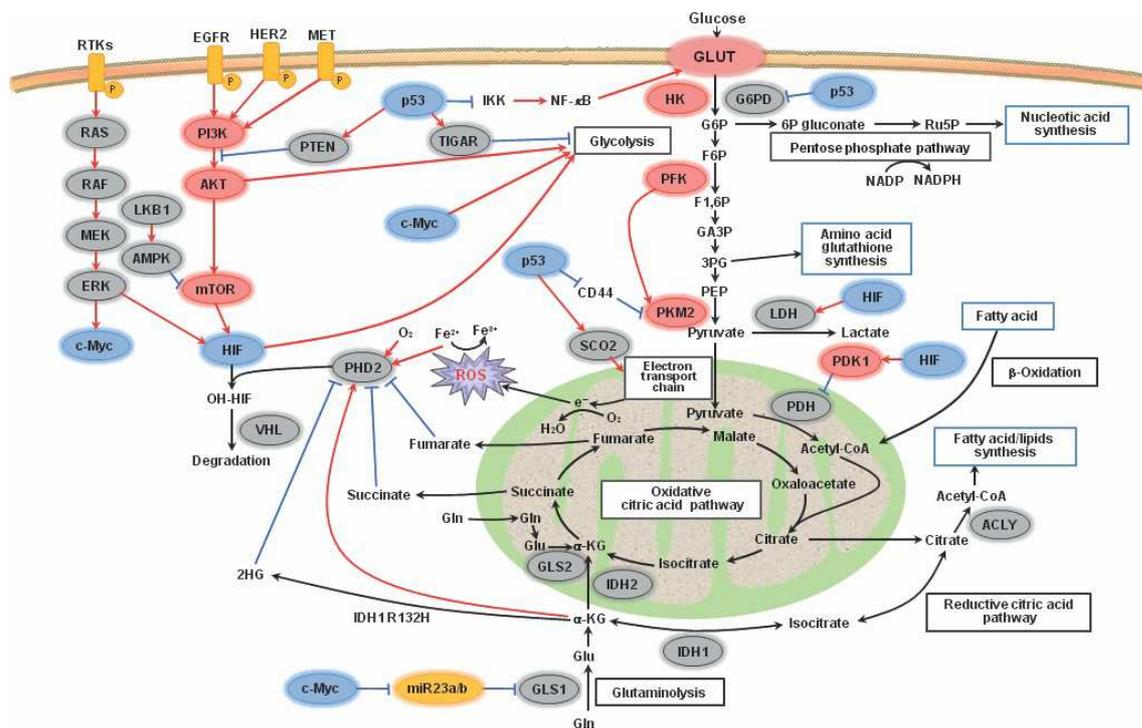
Les sirtuines sont une famille d'enzymes utilisant le coenzyme NAD<sup>+</sup>. Elles sont notamment impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, l'adaptabilité au stress ainsi que dans la longévité et le vieillissement cellulaire; cette dernière caractéristique ayant été démontrée chez plusieurs organismes modèles comme la levure, le ver et la drosophile (Haigis & Sinclair, 2010; Chalkiadaki & Guarente, 2015). Ces enzymes ont d'abord été classifiées comme des histones désacétylases de classe III mais possèdent en réalité de nombreuses autres activités biologiques: ADP-ribosylation, désuccinylation, démalonylation,

dépropionylation ou encore débutyrylation (Zwaans & Lombard, 2014). Leur expression est ubiquitaire mais elles sont plus fortement exprimées dans les tissus métaboliquement actifs comme le cerveau, le coeur, les muscles ou encore le foie, et agissent comme de véritables senseurs métaboliques au sein de la matrice mitochondriale (gonzalez Herrera, 2015). Leur activité revêt un caractère essentiel dans le bon fonctionnement du métabolisme mitochondrial, permettant d'orchestrer les réactions métaboliques en fonction du statut énergétique ainsi que de l'état rédox des cellules *via* des modifications post-translationnelles (Cantó *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014). A ce jour, comme illustré sur la figure 19, l'inhibition de trois isoformes, la 3, la 4 et la 6, sont connues pour jouer un rôle dans la reprogrammation métabolique des tumeurs (Schumacker, 2011; Finley & Haigis, 2012; Guarente, 2014), et constitueraient des cibles privilégiées pour contrecarrer la mise en place d'un phénotype de type Warburg dans les cellules cancéreuses, en essayant notamment de restaurer leur fonction. Elles permettraient, entre autres, de contrebalancer les effets de HIF1 $\alpha$  et de c-myc (Guarente, 2014).



**Figure 19. Implication des sirtuines dans l'effet Warburg (Guarente, 2014).**

Ainsi, chaque voie de signalisation pourrait promouvoir des modifications métaboliques qui lui sont propres, en fonction du contexte cellulaire (Jang *et al.*, 2013; Maya-Mendoza *et al.*, 2015; Mikawa *et al.*, 2015). Par ailleurs, la caractérisation métabolique tumorale est d'autant plus difficile à réaliser que souvent, de nombreuses voies de signalisation sont simultanément dérégulées. La contribution respective de chacun de ses oncogènes est récapitulée sur la figure 20 ci-dessous.



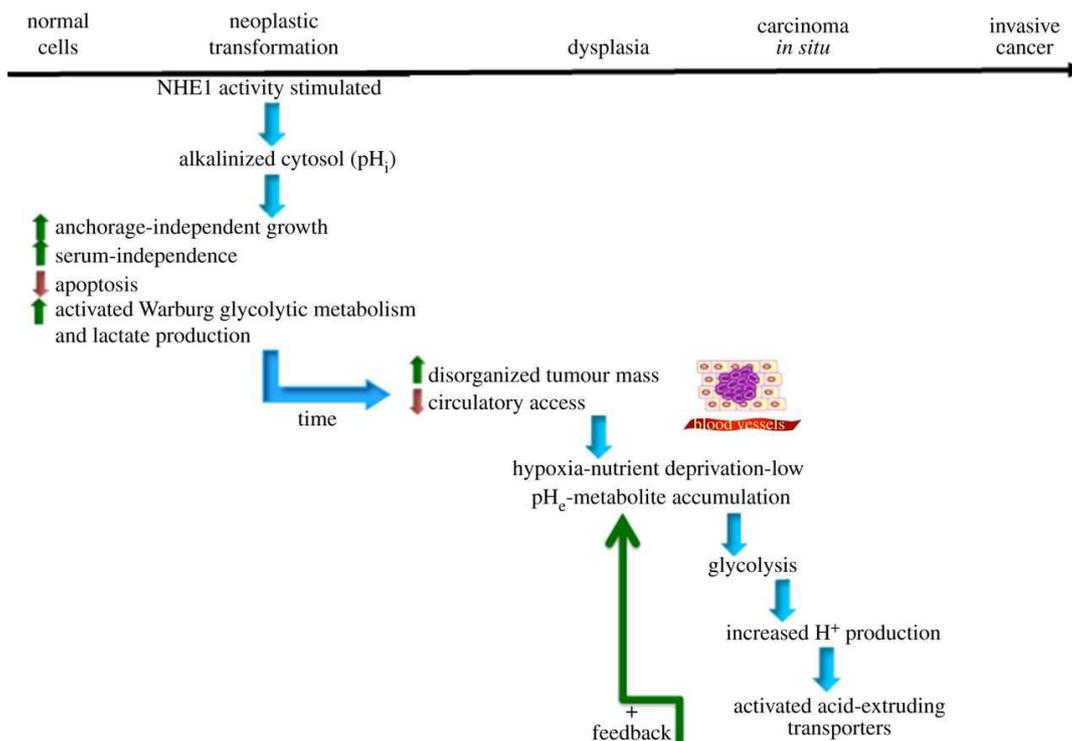
**Figure 20. Régulation du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses par les principaux oncogènes (Soga, 2013).**

#### IV-4. Implication de NHE1 dans la reprogrammation métabolique et la survie des cellules cancéreuses

Parmi les régulateurs clés du pH intracellulaire, on retrouve les systèmes d'échange sodium/proton. L'isoforme 1 de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) fait partie d'une famille de protéines transmembranaires dont la fonction biologique principale est la régulation du pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ). Son activité permet l'échange électroneutre d'un cation sodium à partir du compartiment extracellulaire contre un proton de l'espace intracellulaire. NHE1, dont l'expression est ubiquitaire, est localisée au niveau des membranes plasmiques, et comprend douze hélices transmembranaires, ainsi que des domaines N- et C-terminaux cytosoliques.

L'extrémité N-terminale ainsi que les douze hélices transmembranaires sont impliquées dans le transport des ions, tandis que son extrémité C-terminale constitue une véritable plateforme de signalisation protéique, impliquée notamment dans la régulation de l'échangeur (Wakabayashi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2013).

Le pH constitue l'une des variables physiologiques les plus importantes, influençant de nombreux processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, l'activité des facteurs de croissance, la sécrétion de protéases, la mort cellulaire, l'activité enzymatique, le potentiel de membrane cellulaire, l'activité mitochondriale, le volume des cellules, la synthèse d'ADN ou la différenciation. Cependant, les flux de protons et leurs systèmes de régulation sont également fréquemment dérégulés dans le cancer, et ces régulations de l'homéostasie du  $\text{pH}_i$  constituent un évènement précoce contribuant à la transformation cellulaire (Reshkin *et al.*, 2000; Alfarouk *et al.*, 2014). En effet, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une inversion du gradient de pH. Dans les cellules normales, le  $\text{pH}_i$  oscille généralement entre 6,99 et 7,05 avec un pH extracellulaire ( $\text{pH}_e$ ) compris entre 7,0 et 7,4. En revanche, le pH du microenvironnement tumoral ( $\text{pH}_e$ ) est généralement acide, compris entre 6,2 et 6,9, tandis que le pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ) a tendance à devenir légèrement alcalin, entre 7,12 et 7,7 (Reshkin *et al.*, 2014). Une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de NHE1 a été décrite dans de nombreux modèles de cellules cancéreuses et participe à ce changement de gradient de pH (Sharma *et al.*, 2015). De plus, l'alcalinisation cytosolique résultant de l'activation de NHE1 au cours de la transformation néoplasique jouerait notamment un rôle dans le développement tumoral en favorisant l'effet Warburg (Figure 21). Il faut souligner ici qu'une alcalinisation du cytosol liée à l'activation de NHE1 a déjà été mise en évidence en réponse au B[a]P dans des cellules hépatiques (Huc *et al.*, 2004; Holme *et al.*, 2007), et pourrait contribuer à l'acquisition des différents "hallmarks" du cancer, en premier lieu l'effet Warburg. Cependant, ceci restait à déterminer, dans le cas des HAP en général et du B[a]P, en particulier.



**Figure 21. Rôle du pH dans le développement tumoral en lien avec la reprogrammation métabolique (Reshkin *et al.*, 2014).**

#### IV-4-1. Rôle de NHE1 dans la survie et la migration

Au-delà de son rôle physiologique dans la régulation du pH intracellulaire, visant à protéger les cellules d'une acidification intracellulaire, NHE1 contribue également à la transformation maligne des cellules cancéreuses (Gatenby & Gillies, 2008). La transformation des cellules sous l'impulsion de différents oncogènes, a en particulier été reliée à une alcalinisation intracellulaire résultant de l'activation de NHE1 (Reshkin *et al.*, 2000). Par ailleurs, cette activation de NHE1 lors de la transformation cellulaire va de pair avec une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro*, ainsi qu'une stimulation de la croissance tumorale *in vivo* (Reshkin *et al.*, 2000). Cet effet serait à relier à une régulation du cycle cellulaire par NHE1, stimulant la transition G2/M (Putney & Barber, 2003). La capacité de NHE1 à promouvoir la survie passerait par deux voies de signalisation cellulaire distinctes. Ainsi, l'activation de NHE1 conduirait d'une part à l'activation de la voie de survie Akt (Wu *et al.*, 2004; Schelling & Abu Jawdeh, 2008), mais pourrait également résulter de l'activation de la voie ERK (Mukhin *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2007).

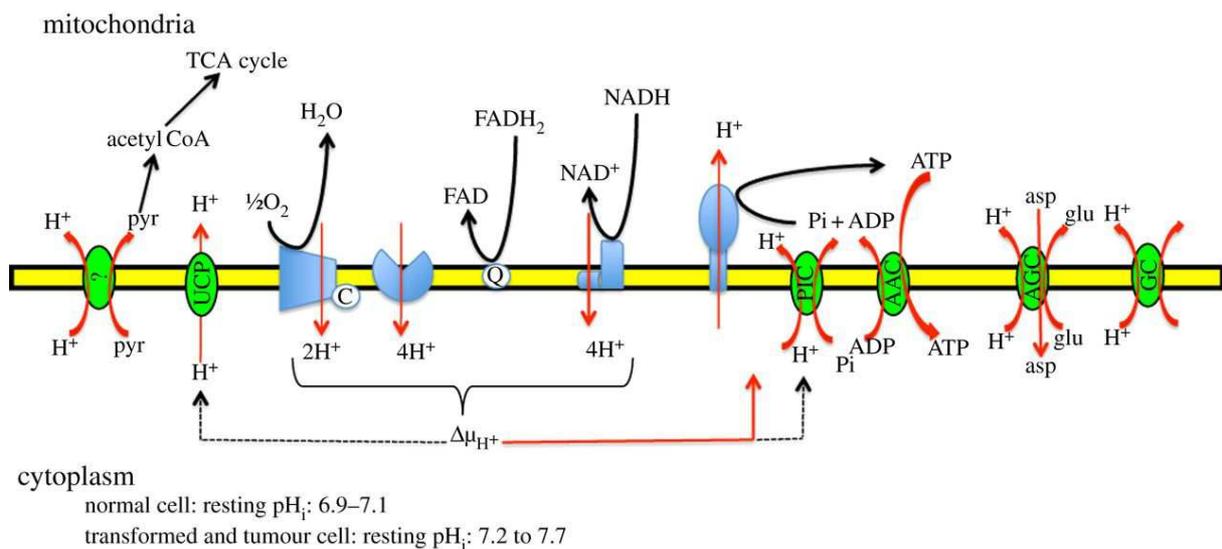
NHE1 participe également à la migration cellulaire. Sa capacité à promouvoir l'acidité du milieu extracellulaire a en effet été reliée à la dégradation de la matrice extracellulaire et au potentiel migratoire des cellules (Stock & Schwab, 2009). NHE1 jouerait un rôle dans l'organisation du cytosquelette, en lien étroit avec la régulation de la forme et du mouvement des cellules. Cette fonction reposerait en particulier sur sa capacité à interagir avec des protéines ERM (*Ezrin, Radixin et Moesin*) de liaison à l'actine dans la matrice cellulaire (Denker *et al.*, 2000), et pourrait par ce biais jouer un rôle dans la formation des points d'adhésion focaux, régissant ainsi le profil d'adhésion cellulaire (Denker & Barber, 2002; Ludwig *et al.*, 2013). Chiang et collaborateurs (2008) ont identifié que NHE1 pouvait, par ce mécanisme, participer à la migration et à l'invasivité tumorale. Ce rôle de NHE1 dans la migration serait notamment régulé par l'EGF (Epithelial Growth Factor) (Chiang *et al.*, 2008). L'action de NHE1 sur l'invasion tumorale reposerait également sur la régulation de certaines MMP (*Matrix MetalloProtease*) (Lin *et al.*, 2011, 2012). Enfin, il apparaît que le rôle de NHE1 au niveau des invadopodes au cours de la migration nécessiterait une production d'ATP glycolytique (Nguyen *et al.*, 2000), localisée au sein même de ces structures dans les cellules cancéreuses (Attanasio *et al.*, 2011).

#### **IV-4-2. Lien entre NHE1 et reprogrammation métabolique dans le cancer**

Peak et collaborateurs avaient déterminé que les stimuli qui favorisaient une alcalinisation intracellulaire activaient dans le même temps la synthèse de glycogène et la glycolyse dans des cultures d'hépatocytes de rat *ex vivo* (Peak *et al.*, 1992). Dès le début des années 2000, Reshkin et ses collaborateurs ont montré que l'alcalinisation consécutive à l'activation de NHE1 dans les cellules embryonnaires fibroblastiques de souris NIH3T3, stimulait fortement le métabolisme glycolytique. Cependant, l'inhibition différentielle de NHE1 ou de la glycolyse, respectivement avec le DMA (5-N,N-diméthylamiloride) ou avec le 2-DG (2-déoxyglucose) dans la lignée de kératinocytes humains HPK1A, leur avait permis de démontrer que l'augmentation de la prolifération était indépendante du shift glycolytique observé (Reshkin *et al.*, 2000). Plus tard, une étude transcriptomique a révélé que l'activité de l'échangeur NHE1 serait capable de réguler l'expression de très nombreux gènes, dont des gènes du métabolisme énergétique. En effet, dans les lignées stables LAPE déficientes en NHE1, environ 10% des gènes différentiellement régulés étaient directement liés au métabolisme énergétique (Putney & Barber, 2004). Le lien entre NHE1 et métabolisme serait très étroit puisque l'activation de NHE1 semble promouvoir la glycolyse et la prépondérance

d'un métabolisme de type glycolytique participe en retour à une stimulation de NHE1 via la production de protons. Cependant, il faut souligner ici que plusieurs transporteurs et protéines impliqués dans la régulation du  $pH_i$  se trouvent activés dans les cellules cancéreuses permettant de contrecarrer cette acidification métabolique (Reshkin *et al.*, 2014).

L'alcalinisation intracellulaire notamment liée à NHE1, va permettre entre autres de réguler l'activité de nombreuses enzymes de la glycolyse. De plus, comme illustré dans la figure 22, le fonctionnement de nombreux processus mitochondriaux sont dépendants du  $pH$ ; ainsi au moins dix transporteurs régulant l'activité métabolique des mitochondries requièrent une régulation très fine du gradient de  $H^+$  entre la mitochondrie et le cytosol (Reshkin *et al.*, 2014). Par ailleurs, les modifications métaboliques s'opérant des les cellules cancéreuses participeraient également à la mise en place du microenvironnement tumoral en perturbant le maintien de ce gradient (Andersen *et al.*, 2014).



**Figure 22. Processus mitochondriaux dépendants du gradient de  $pH$  (Reshkin *et al.*, 2014).** PIC : phosphate inorganic carrier; AAC : ADP/ATP carrier; AGC : aspartate-glutamate carrier; GC : glutamate carrier; UCP : uncoupling protein.

#### IV-5. Métabolisme cancéreux oxydatif et coopération au sein du microenvironnement tumoral

Il est important de souligner que toutes les cellules cancéreuses ne présentent pas un métabolisme glycolytique, et que plusieurs populations métaboliques différentes sont généralement identifiées au sein d'une même tumeur (Obre & Rossignol, 2015; Romero *et al.*, 2015). Ces différentes populations de cellules cancéreuses collaboreraient au sein du microenvironnement tumoral. Ainsi, d'un point de vue purement énergétique, cette symbiose permettrait notamment au lactate, produit dans les zones les moins vascularisées du centre de la tumeur, d'alimenter le TCA des cellules majoritairement oxydatives de la périphérie (cf. Figure 23) (Whitaker-Menezes *et al.*, 2011). Ce mécanisme favoriserait par ailleurs l'angiogénèse (Payen *et al.*, 2015).

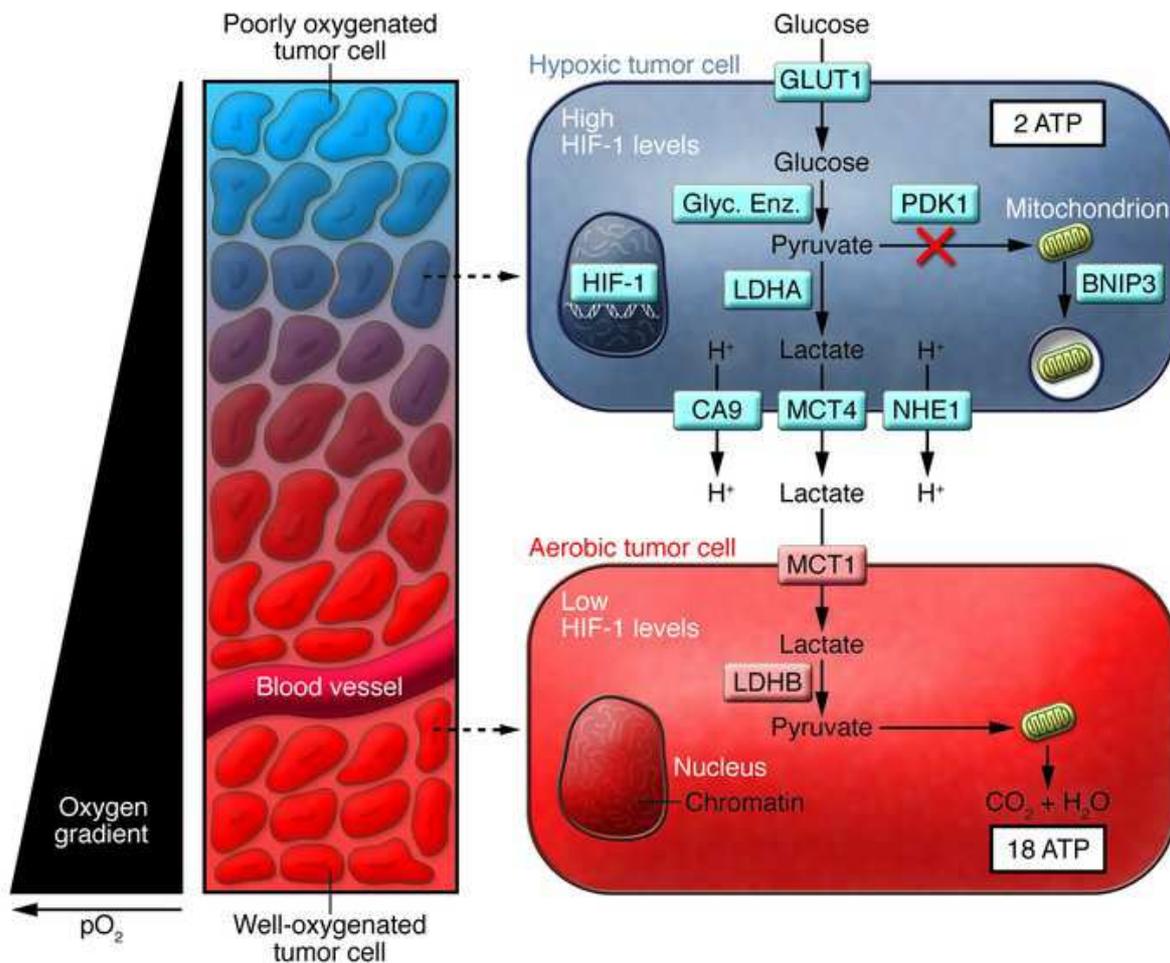


Figure 23. Symbiose métabolique au sein du microenvironnement tumoral (Semenza, 2008).

#### **IV-6. Cross-talk entre reprogrammation métabolique et transition épithélio-mésenchymateuse**

En 2013, Sherbakov et ses collaborateurs ont mis en évidence que le déroulement de l'EMT protégeait deux lignées mammaires (HBL-100 et MCF-7) lors de conditions hypoxiques (Scherbakov *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été montré que l'EMT induisait une reprogrammation métabolique dans deux lignées de cancers mammaires (MCF-7 et BT-474) (Kondaveeti *et al.*, 2015). La stimulation de l'EMT semblait promouvoir l'interaction de la pyruvate kinase M2 avec le facteur de transcription TGIF2 (*TGK- $\beta$ -induced factor homeobox 2*) dans le noyau, bloquant notamment la transcription de l'E-cadhérine. Ces données suggèrent donc le rôle d'une protéine clé du métabolisme énergétique, à savoir la PKM2, dans la régulation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (Hamabe *et al.*, 2014; Giannoni *et al.*, 2015).

Une diminution de l'expression de la CS (citrate synthase) a également été reliée avec une reprogrammation métabolique de type Warburg dans des lignées cancéreuses (Lin *et al.*, 2012). Ainsi, l'extinction de l'expression de la citrate synthase (CS) a été décrite pour induire d'importantes modifications morphologiques dans diverses lignées cancéreuses humaines, *via* un processus d'EMT. Dans ces mêmes conditions, l'EMT liée à l'absence de la CS, non seulement augmentait fortement le potentiel de prolifération et de migration *in vitro*, mais accélérail également fortement la malignité (croissance et migration) des tumeurs *in vivo* chez la souris (Lin *et al.*, 2012). Enfin, le lactate rejeté par les cellules hypoxiques peut être recyclé par les cellules normoxiques pour produire de l'ATP, mais son accumulation comme déchet dans le microenvironnement tumoral est aussi connu pour favoriser l'EMT, l'invasion et l'angiogenèse (Icard *et al.*, 2014).

Enfin, l'alcalinisation intracellulaire résultant de l'activation de NHE1 est décrite comme étant un mécanisme clé dans la transformation tumorale, nécessaire à l'acquisition et au maintien de la reprogrammation glycolytique, et serait tout aussi indispensable aux changements morphologiques observés (Reshkin *et al.*, 2000).

**La régulation du métabolisme énergétique apparaît éminemment complexe, impliquant de nombreuses voies de signalisation. En outre, comme nous avons pu le voir, la reprogrammation métabolique dans le cancer est un processus déterminant dans la survie, la migration et l'EMT, et plus globalement dans l'acquisition du phénotype**

cancéreux. Dès lors, la dérégulation de ces voies de signalisation par les contaminants de l'environnement pourrait avoir une incidence majeure sur ces mécanismes, et pourrait par ce biais largement contribuer à la transformation tumorale.

#### IV-7. Impact des hydrocarbures sur le métabolisme énergétique

Dès 1982, des travaux ont clairement suggéré que les mitochondries étaient des cibles cellulaires clés dans les processus de cancérogénèse médiés par les polluants de l'environnement (Backer & Weinstein, 1982). La figure 24 montre l'importance du compartiment mitochondrial dans la régulation du génome nucléaire. Ainsi, en ciblant la mitochondrie, les polluants pourraient fortement altérer toute la signalisation intracellulaire, en lien avec le contrôle du cycle cellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN mais aussi la régulation de la mort cellulaire (Shaughnessy, 2014).

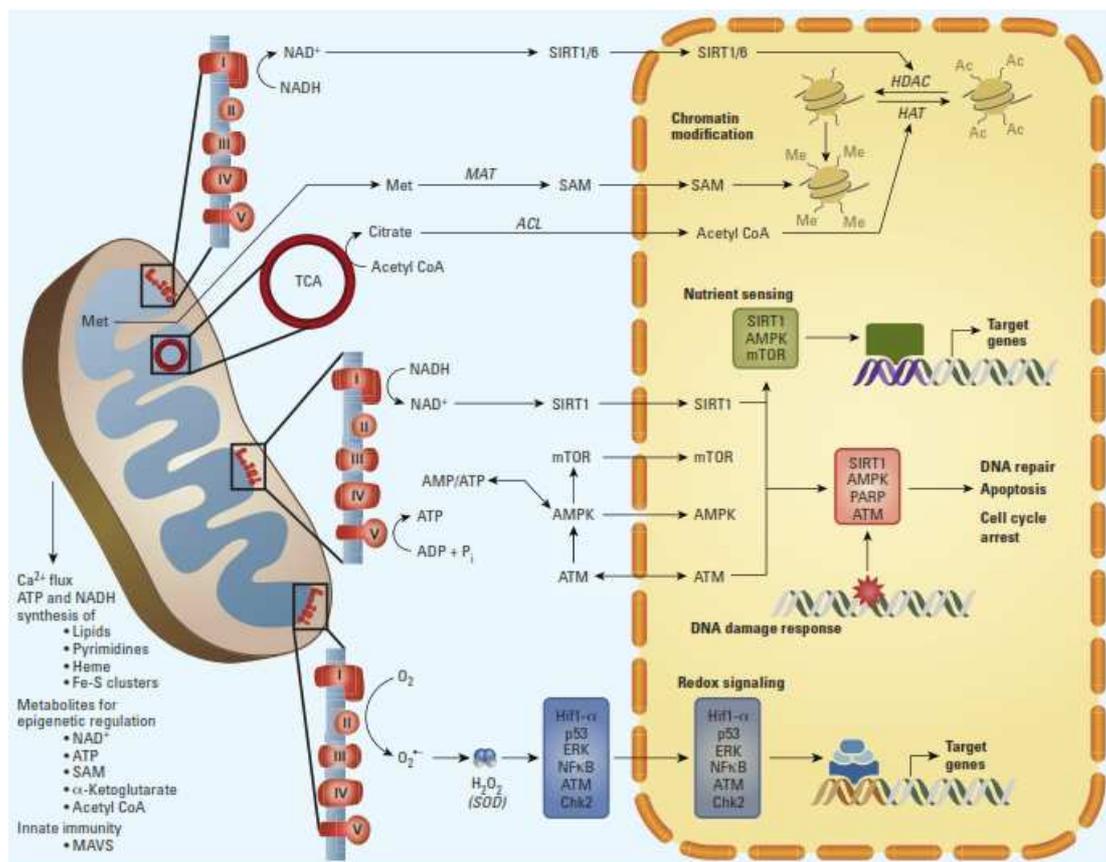


Figure 24. Régulation du génome nucléaire par le métabolisme mitochondrial (Shaughnessy *et al.*, 2014).

Concernant les hydrocarbures, peu de données existent quant à leur impact sur le métabolisme énergétique. Il a en particulier été montré que l'expression de huit gènes nucléaires codant pour des protéines de la chaîne de transport d'électrons et de la phosphorylation oxydative était modifiée dans des échantillons de foie de souris C54BL/6 exposées à  $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de TCDD, un fort ligand du RAh (Forgacs *et al.*, 2010). Au niveau hépatique, des effets importants de la TCDD sur le métabolisme mitochondrial ont également été recensés. L'effet le plus marquant était une diminution de la quantité d'ubiquinone dans des souris exposées à la TCDD. La déplétion en coenzyme Q mise en évidence, couplée à une augmentation de la respiration cellulaire, conduirait à un emballement de l'activité ubiquinol cytochrome c réductase au niveau du complexe III, et à une réduction du pool d'ATP intracellulaire. Ces effets conduiraient à terme à une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial ainsi qu'à une production accrue d'ERO en lien avec des dommages de l'ADN mitochondrial. De façon intéressante, ces effets seraient notamment dus à un effet de la TCDD, qui diminuerait l'expression de la HMG-CoA réductase, un précurseur du coenzyme Q (Shertzer *et al.*, 2006). Concernant le B[a]P, il a été mis en évidence des altérations de la machinerie oxydative dans des mitochondries issues de foies de rats traités au B[a]P (Salazar *et al.*, 2004). Les auteurs ont ainsi détecté une consommation accrue en oxygène en raison d'une augmentation de l'expression des cytochromes b,  $c_1$  et  $a + a_3$  après seulement 48 heures d'exposition, ainsi qu'une entrée de calcium plus importante dans les mitochondries. Ces auteurs avaient alors corrélé ces modifications à une adaptation du métabolisme mitochondrial aux nouvelles contraintes énergétiques imposées au cours des processus de transformation néoplasique (Salazar *et al.*, 2004). Il est important de signaler ici qu'une étude protéomique récente réalisée dans des cellules Hepa1c1c7 traitées au B[a]P suggèrent des altérations d'OXPPOS (Kalkhof *et al.*, 2015). Par ailleurs, une étude chez le zebrafish traité au B[a]P, a montré une augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondrial. Les auteurs concluent malgré tout que les effets du B[a]P sont clairement liés à sa concentration chez le zebrafish (Kim *et al.*, 2014). L'adressage mitochondrial du cytochrome P450 1B1 serait également fortement impliqué dans les effets mitochondriaux des HAP (Bansal *et al.*, 2014).

**Dans les deux chapitres suivants, deux cibles majeures étudiées au cours de cette thèse, et potentiellement impliquées dans les effets mitochondriaux et la reprogrammation métabolique identifiés en réponse au B[a]P dans la lignée F258, seront présentées.**

## Chapitre V: le monoxyde d'azote (NO)

### V-1. Généralités

Le monoxyde d'azote (NO), d'abord connu sous le nom d'EDRF (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*), a été simultanément caractérisé par deux équipes en 1987 (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Ce gaz est un médiateur chimique impliqué dans de très nombreux processus biologiques, intervenant notamment dans la physiologie du système vasculaire, dans l'immunité ou encore contrôlant l'activité neuronale de différentes régions du système nerveux central. Sa demi-vie est extrêmement faible, estimée en moyenne à moins de 5s, et évaluée expérimentalement entre moins d'une seconde dans un cœur perfusé de cochon d'inde, et plus de 30 secondes dans certains tampons (Villanueva & Giulivi, 2010).

### V-2. Les NO synthases

#### V-2-1. Activité

Le précurseur pour la synthèse de NO est un acide aminé essentiel, la L-arginine. Les NO synthases (NOS) sont les enzymes qui vont catalyser cette transformation *via* deux réactions successives de monooxygénation. La L-argine va ainsi d'abord être transformée en N $\omega$ -Hydroxy-L-Arginine, qui après réduction, va être transformée en NO et L-citrulline (cf. Figure 25).

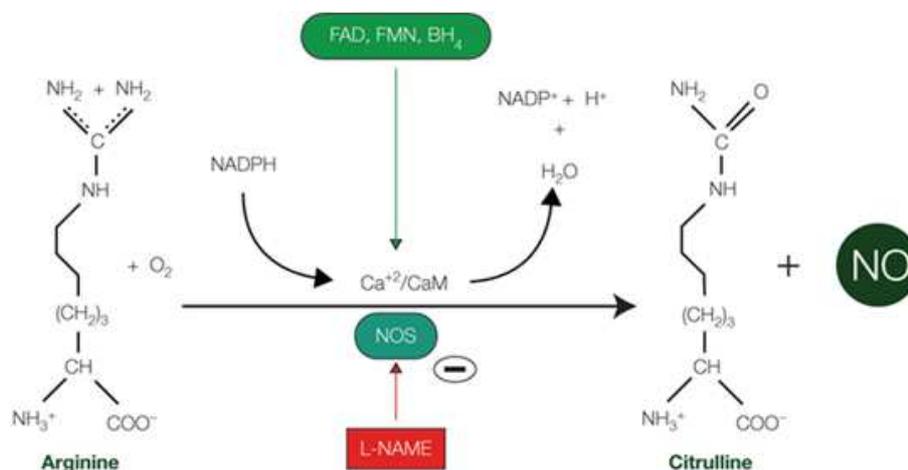
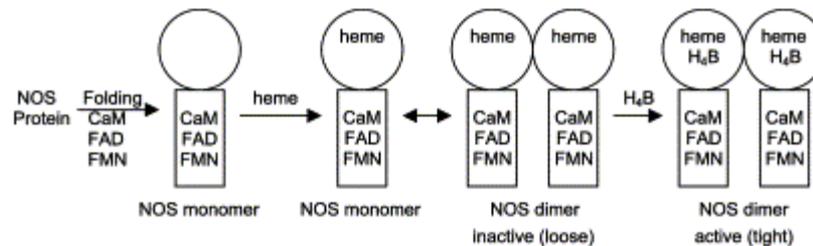


Figure 25. Biosynthèse du NO à partir de la L-arginine (D'après Freire *et al.*, 2009).

Cette réaction complexe nécessite que la NOS soit sous la forme d'homodimères, chacune de ses sous-unités étant liée à la calmoduline (CaM) au niveau de sa partie C-terminale. La présence de NADPH, d'oxygène, de fer, de tétrahydrobioptérine (H<sub>4</sub>B), de FAD et de FMN est également requise (Figure 26).



**Figure 26. Modèle d'activation des NO Synthases (D'après Aktan, 2004).** CaM : calmodulin; FAD : Flavin Adenine Dinucleotide; FMN : Flavine MonoNucléotide; H<sub>4</sub>B : tétrahydrobioptérine.

Ainsi, avant dimérisation, chaque monomère va pouvoir assurer le transfert d'électrons depuis le NADPH réduit vers le FAD puis le FMN. Cette activité réductase sera à l'origine d'une faible production d'anion superoxyde à partir de l'oxygène moléculaire (Stuehr *et al.*, 2001). C'est la liaison du domaine réductase à la CaM qui va potentialiser l'activité réductase, et ainsi favoriser le transfert des électrons au sein du monomère (Abu-Soud & Stuehr, 1993). Cependant, la dimérisation est indispensable pour permettre la liaison du cofacteur H<sub>4</sub>B (Figure 26). En effet, les monomères ne sont pas capables de catalyser la production de NO à partir de la L-arginine (Klatt *et al.*, 1996). C'est la présence d'hème qui va permettre la transformation de deux monomères en une unité dimérique fonctionnelle (List *et al.*, 1996), assurant notamment le transfert des électrons d'un monomère à l'autre, du FMN de l'un des monomères vers le cofacteur hémique du second (Brunner *et al.*, 1998).

Après dimérisation, chaque domaine réductase est alors capable d'alimenter le domaine oxygénase de l'autre monomère, et ainsi de catalyser la synthèse du NO à partir de la L-arginine. Cette synthèse met en jeu deux étapes d'oxydation successives, conformément à la réaction présentée en figure 27 (Stuehr *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2009). Ces modalités de fonctionnement sont communes aux différentes isoformes de NOS.

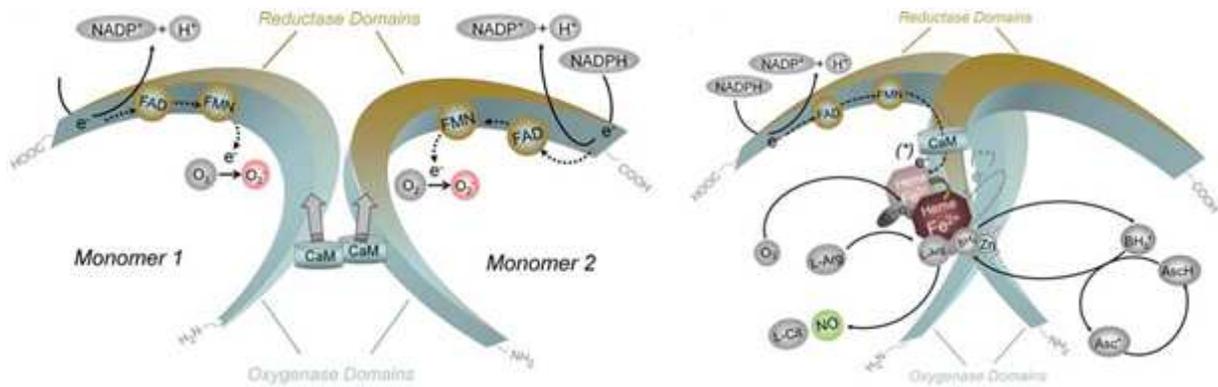


Figure 27. Fonctionnement des NO Synthase (D'après Förstermann & Sessa, 2012).

Par ailleurs, d'autres modalités de synthèse du NO et de ses dérivés ont également été identifiées. La réduction des nitrites en NO par la eNOS en condition hypoxique a été suggérée (Mikula *et al.*, 2009). Par ailleurs, de nombreuses enzymes ont été décrites comme pouvant générer du NO à partir du pool de nitrite cellulaire (Cf. Figure 28). Dans le cerveau, le cœur ou encore le foie, existerait notamment une voie biochimique intra-mitochondriale de production d'espèces réactives de l'azote dont le précurseur ne serait pas l'arginine. Cette production serait localisée au niveau de la chaîne respiratoire (Lacza *et al.*, 2006).

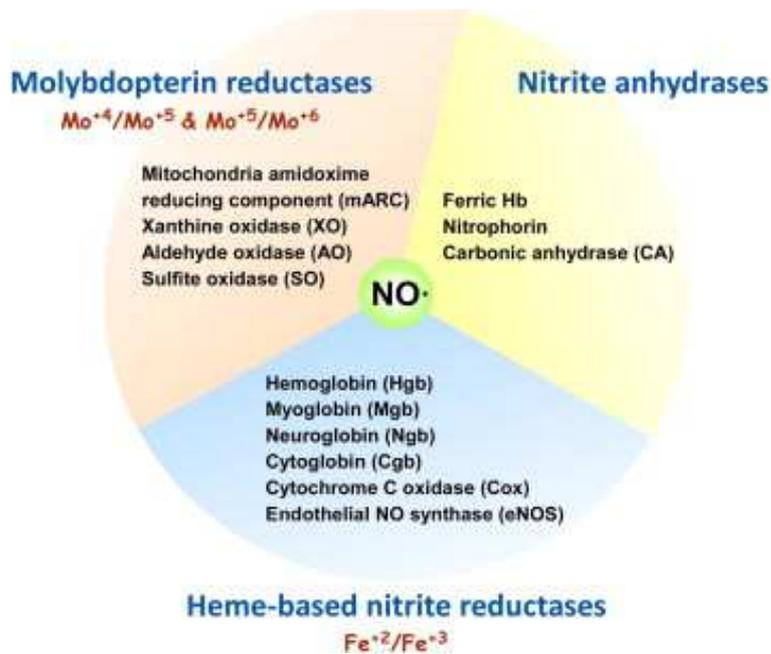


Figure 28. Enzymes impliquées dans la réduction des nitrites en NO

(D'après Kim-Shapiro & Gladwin, 2014).

Il est à noter que, dans les cellules hypoxiques, la synthèse réduite des polyamines a été associée à une production accrue de NO. En effet, cette diminution de synthèse permet de réorienter le métabolisme de l'arginine vers la production de NO. Cette modalité de production du NO a par ailleurs été reliée à un renforcement du métabolisme glycolytique en régulant notamment la PFK1 via le facteur de transcription HIF1 $\alpha$ , favorisant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses, (Keith *et al.*, 2011; Icard *et al.*, 2014).

### V-2-2. Mécanismes de régulation des NOS

On distingue trois isoformes de NOS réparties en deux types selon que leur expression soit constitutive ou non. La NOS neuronale (nNOS ou NOS1) de 161 kDa, et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3) de 133 kDa, toutes deux ayant hérité du nom du tissu au sein duquel elles ont été identifiées pour la première fois, sont dites constitutives; elles sont exprimées dans de nombreux tissus. Cependant, elles ne sont pas constitutivement actives. Ainsi, leur activité va fortement dépendre de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup>, qui va positivement réguler l'affinité de la CaM pour ces enzymes, et par ce biais permettre leur activation.

L'expression de la NOS2 (131 kDa) n'est quant à elle pas constitutive au sein des tissus. Celle-ci est induite par différents stimuli (dont le LPS, le TNF $\alpha$ , l'hypoxie ou encore le B[a]P), et différentes voies de signalisation sont impliquées dans son induction. Ainsi, le promoteur de cette enzyme peut être activé par les facteurs de transcription AP1 (*Activator Protein 1*), NF- $\kappa$ B, IRF1 suite à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Kleinert *et al.*, 2004; Aktan, 2004). Le promoteur de la iNOS possède également un motif HRE (Hypoxia Response Element) qui va permettre son activation par HIF1 $\alpha$  en condition d'hypoxie (Harris, 2002). Quant au gène suppresseur de tumeur p53, il est connu pour réguler négativement l'expression de la NOS2, et ce, dans le but de limiter l'action pro-oxydante du NO et de ses dérivés (Forrester *et al.*, 1996; Ambs *et al.*, 1998). La NOS2 est donc qualifiée d'inductible (iNOS). En outre et contrairement aux NOS1 et 3, la NOS2 possède une affinité basale plus importante pour le Ca<sup>2+</sup>. Ainsi, dès lors qu'elle va être exprimée, cette isoforme va être constitutivement active; la régulation de son activité n'est donc pas considérée dépendante du Ca<sup>2+</sup> (Mattila & Thomas, 2014).

Malgré tout, des travaux récents semblent dresser un tableau plus complexe, avec des voies de régulation plus variées. Ainsi, les NOS dites constitutives pourraient voir leur niveau

d'expression modulé par de nombreux stimuli, alors que dans certains cas, la NOS2 pourrait être constitutivement exprimée (Mattila & Thomas, 2014).

Ces trois isoformes sont exprimées dans le foie où le NO joue un rôle primordial dans la physiologie et le développement de pathologies associées.

### V-3. Rôles physiopathologiques du NO

Les effets du NO ont été décrits comme étant ambivalents, notamment associés à la concentration de NO synthétisée. Cette diversité d'effets biologiques, en rapport avec la concentration de NO endogène, est illustrée dans la figure 29 ci-dessous.

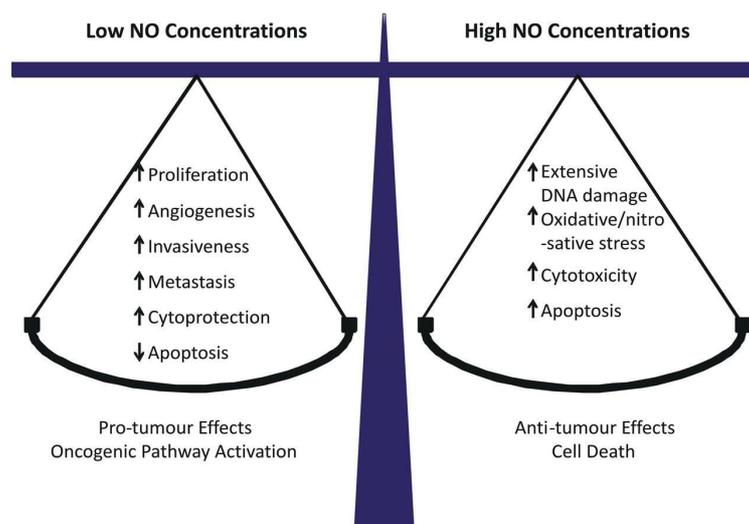


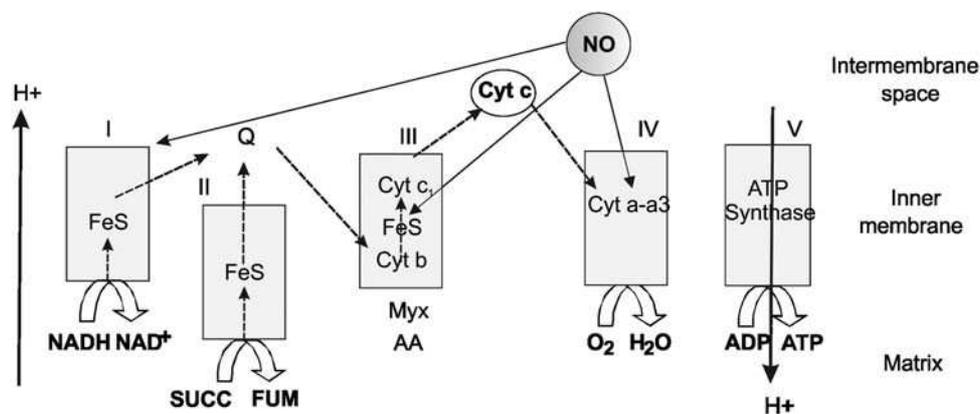
Figure 29. Versatilité du NO dans la régulation de la signalisation cellulaire

(D'après Burke *et al.*, 2013).

#### V-3-1. Effets du NO sur la chaîne de transport d'électrons

Au delà de l'implication du NO dans les fonctions physiologiques telles que le maintien du tonus vasculaire, la transmission synaptique ou encore la motricité bronchique, le NO est aussi connu pour être un régulateur des fonctions mitochondriales. Des effets inhibiteurs du NO sur la respiration mitochondriale ont été identifiés pour la première fois en 1992 (Geng *et*

*al.*, 1992). Cette propriété du NO à inhiber réversiblement la cytochrome c oxydase repose sur la plus grande affinité du NO, comparé à l'O<sub>2</sub>, pour le site actif de la COX (Brown & Cooper, 1994; Cleeter *et al.*, 1994; Brunori *et al.*, 2005; Sarti *et al.*, 2012). Au-delà de son rôle dans la régulation physiologique et réversible de la respiration *via* le complexe IV, une action du NO sur d'autres complexes a également été décrite. Le NO est notamment capable d'inhiber le complexe I par S-nitrosylation, cette modalité d'inhibition pouvant durer dans le temps et être très délétère pour les cellules (Clementi *et al.*, 1998). Le NO pourrait aussi inhiber indirectement le complexe III *via* la formation de peroxy-nitrite (Riobó *et al.*, 2001). L'action du NO sur les complexes de la chaîne respiratoire est résumée sur le schéma ci-dessous (Figure 30).



**Figure 30. Action du NO au niveau de la chaîne respiratoire**  
(D'après Antico Arciuh *et al.*, 2012).

### V-3-2. Conséquences des effets du NO sur le métabolisme mitochondrial

L'impact du NO sur le métabolisme mitochondrial est essentiellement lié à sa capacité à moduler l'activité de la COX (Erusalimsky & Moncada, 2007). Le ralentissement de la chaîne de transport des électrons va promouvoir la production d'anions superoxydes, principalement au niveau des complexes I et III. Cette production mitochondriale d'ERO va être déterminante pour réguler la balance survie/apoptose (Moncada & Erusalimsky, 2002). Pendant l'inhibition du complexe IV par le NO, le potentiel de membrane mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  est maintenu grâce à l'activité réverse de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase. Ainsi, en présence d'un signal pro-apoptotique, l'inhibition de la respiration au niveau du complexe IV permet notamment de ralentir le déroulement de la cascade apoptotique (Beltran *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2001). Enfin, lorsque la respiration mitochondriale est inhibée par le NO, la plasticité métabolique des

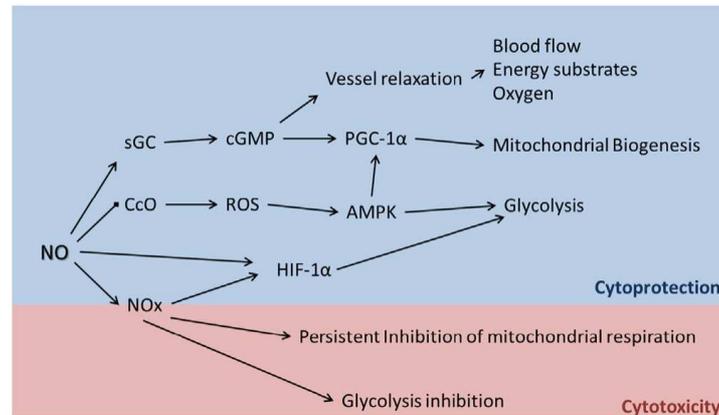
cellules serait également déterminante; en effet, selon le contexte cellulaire, le NO favoriserait plutôt la survie ou au contraire la mort cellulaire, en fonction du potentiel glycolytique des cellules concernées (Almeida *et al.*, 2001). Cette même équipe a par la suite confirmé le rôle d'une telle inhibition de la respiration mitochondriale par le NO par une autre approche. En effet, ils ont montré que cette inhibition agissait comme un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par Fas, et s'opérait en amont de l'activation des caspases effectrices: la stimulation du récepteur Fas dans la lignée lymphocytaire humaine Jurkat entraînant une production précoce de NO, retardant l'activation de l'apoptose (Beltrán *et al.*, 2002). Dès lors, il apparaît qu'une production de NO pourrait agir comme mécanisme de survie en retardant l'exécution de la mort cellulaire dans les situations de stress.

Les conséquences immédiates du dysfonctionnement mitochondrial induit par l'inhibition de la respiration vont être de priver la cellule en énergie. En carence d'oxygène et d'ATP, la voie AMPK va être stimulée pour réajuster au plus vite le métabolisme énergétique (Carling, 2004; Russel *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005). Or, l'activation de cette voie par le NO a déjà été démontrée (Quintero *et al.*, 2006). En lien avec l'activation de la voie AMPK, le NO va alors simultanément stimuler l'entrée de glucose (Mu *et al.*, 2001; Ciudad *et al.*, 2004), et stimuler la glycolyse (Almeida *et al.*, 2004). L'inhibition de la COX par le NO est également responsable d'une libération du pool de  $Ca^{2+}$  mitochondrial. Cette libération de calcium serait susceptible de promouvoir la prolifération et la migration dans les cellules HeLa (Huang *et al.*, 2014).

Les effets physiologiques du NO passent majoritairement par une transduction du signal *via* l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC). C'est par cette voie de signalisation que le NO va réguler de nombreux processus biologiques tels que la neurotransmission, la vasodilatation du système cardiovasculaire ou encore l'agglutination plaquettaire. Cependant, cette voie est également impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique. Ainsi, la synthèse endogène de NO est associée à une stimulation de la glycolyse, *via* l'activation de la voie NO/sGC/cGMP (Chang, 2015). Cependant cette voie serait d'avantage liée à une régulation fine de ces voies métaboliques. Dans ce contexte, une forte stimulation de la glycolyse par le NO serait plutôt le fruit de l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Chang, 2015).

L'augmentation du pool de cGMP *via* ces voies canoniques conduisent également à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la biogénèse mitochondriale: mtTFA

(*mitochondrial Transcription Factor A*), NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor-1*) et PGC1- $\alpha$  (Clementi & Nisoli, 2005).



**Figure 31. Impact de la régulation du métabolisme énergétique par le NO**

**dans la balance survie/apoptose (D'après Chang, 2015).** sGC : soluble Guanylate cyclase; cGMP : cyclic Guanosine MonoPhosphate; PGC-1 $\alpha$  : Peroxysome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Cco : Cytochrome c oxydase; ROS : Reactive oxygen species; AMPK : AMP-activated protein kinase; NOx : NO derivatives; HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-inductible factor 1-alpha.

L'activation des mécanismes précédemment décrits (Figure 31), agirait comme un mécanisme cytoprotecteur constitutif, témoignant de l'importance du métabolisme mitochondrial dans l'homéostasie cellulaire (Erusalimsky & Moncada, 2007; Finocchietto *et al.*, 2009; Chang, 2015). Enfin, cette plasticité métabolique en réponse à l'inhibition du complexe IV ferait aussi intervenir les processus de biogénèse et de fission mitochondriale médiés par une production de NO par la eNOS; ceci agirait comme un mécanisme de compensation vis-à-vis du dysfonctionnement mitochondrial résultant (Benard G *et al.*, 2013).

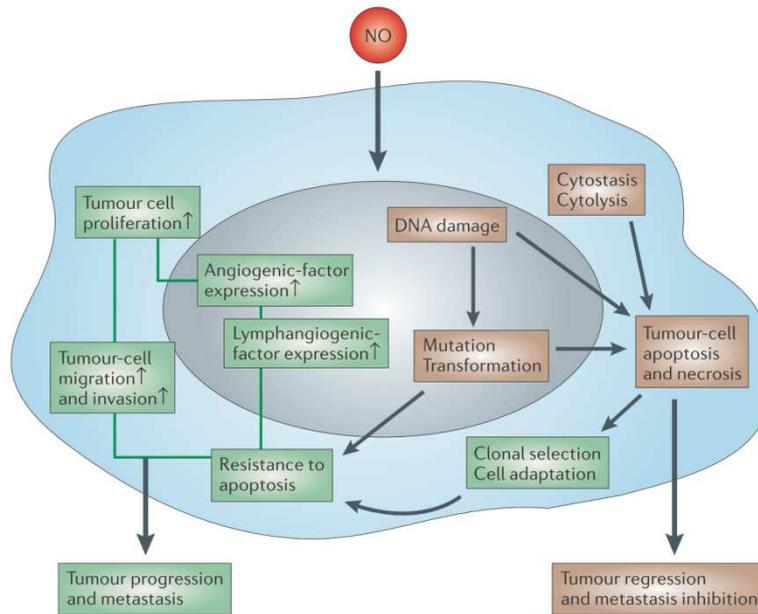
### V-3-3. Effets promoteurs de cancer du NO

Hormis le ralentissement de la chaîne respiratoire qui pourrait promouvoir la survie cellulaire (cf. V-3-2), les contributions du NO au développement tumoral sont multiples (Figure 32) et vont intervenir tout au long du développement tumoral, favorisant la transformation des cellules, la formation de lésions néoplasiques et les processus d'angiogenèse et de métastase. Par ailleurs, les mécanismes biologiques à l'origine de ces effets délétères du NO vont être nombreux et variés (Choudhari *et al.*, 2013).

Ainsi, le NO va tout d'abord pouvoir contribuer à la cancérogénèse du fait de son potentiel génotoxique, à l'origine de lésions à l'ADN (Gal & Wogan, 1996). En effet, le NO peut générer des espèces hautement réactives, d'où un stress oxydant et/ou nitrosant, par l'intermédiaire du peroxy-nitrite (réactions d'oxydation, de nitration et de nitrosylation oxydative) et du trioxide diazoté (réaction de nitrosation) (Massion *et al.*, 2002). Par ailleurs, le NO pourrait aussi compromettre les mécanismes de réparation de l'ADN (Wink *et al.*, 1998; Felley-Bosco, 1998).

Dès 1997, des travaux ont permis de démontrer un rôle du NO dans l'inhibition de l'apoptose (Kim *et al.*, 1997). Le NO peut en effet directement inhiber l'activité des caspases effectrices *via* des mécanismes de S-nitrosylation (Chung *et al.*, 2001; Maejima *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'inhibition des caspases pourrait être médié indirectement, *via* une augmentation du pool de cGMP (Kim *et al.*, 1999). Le NO pourrait aussi contrecarrer les effets pro-apoptotiques de p53 (Cobbs *et al.*, 2003), et bloquer la libération du cytochrome c. A ce propos, il a été montré dans des mitochondries isolées de foie de rat, que le NO pouvait inhiber, avec un IC<sub>50</sub> d'environ 11 nM, l'ouverture du PTP; ce mécanisme réversible impliquerait une inhibition de l'accumulation calcique mitochondriale. En revanche, à plus forte concentration, le NO accélérerait l'ouverture du PTP (Brookes *et al.*, 2000). Une telle inhibition du PTP par le NO pourrait également faire intervenir une induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-2 (Chung *et al.*, 2001) ou l'inhibition du clivage de celle-ci (Kim *et al.*, 1998). La capacité du NO à diminuer la sensibilité des cellules à l'apoptose pourrait aussi passer par une diminution de la synthèse de céramide (Choi *et al.*, 2002). Le monoxyde d'azote (NO) ou certains de ses dérivés seraient en mesure de perturber les interactions entre la caspase 9 et l'apoptosome, et ainsi favoriser la survie (Zech *et al.*, 2003). Enfin, la capacité du NO à promouvoir la survie et la transformation, notamment des hépatocytes, pourrait également passer par sa capacité à réguler la survivine (Ikeguchi *et al.*, 2002).

L'action du NO sur le système immunitaire va constituer une autre modalité selon laquelle ce composé va contribuer au développement tumoral (Ohshima & Bartsch, 1994). Au même titre que les ERO, le NO et ses dérivés sont des molécules de premier ordre dans la régulation de la signalisation cellulaire (Roberts *et al.*, 2010). Ainsi, lorsque des productions plus importantes de NO vont s'opérer sous l'effet d'un stress, elles vont pouvoir contribuer à l'établissement d'un environnement inflammatoire, propice au développement tumoral (Samadi *et al.*, 2015).



**Figure 32. Contribution du NO à la progression tumorale (Fukumura *et al.*, 2006).**

Le NO est également déterminant dans la régulation de l'angiogenèse (Cooke, 2003). Un tel effet du NO a notamment été retrouvé dans des modèles de carcinomes hépatocellulaires (Sun *et al.*, 2005). Enfin, la production de NO va aussi pouvoir promouvoir les métastases (Cheng *et al.*, 2014). Ces processus vont notamment être liés non seulement à l'activation de MMP (Ishii *et al.*, 2003), mais aussi à l'inhibition de l'expression de certaines intégrines comme l'intégrine beta1 (Sun *et al.*, 2006; Gupta & Vlahakis, 2009).

Pour finir, il est important de signaler qu'à très forte concentration, le NO va plutôt exercer un potentiel anti-tumoral (Burke *et al.*, 2013) (cf. Figure 29). C'est pourquoi, au-delà de la variété de rôles biologiques du NO, ainsi que son ambivalence vis-à-vis du devenir de la cellule, la compréhension des mécanismes régulés par le NO reste éminemment complexe. En effet, du fait de sa labilité, les effets biologiques vont dépendre de la concentration en NO, de la durée de stimulation, ou encore du contexte cellulaire ou tissulaire.

#### **V-3-4. Lien entre NO et EMT**

Un lien évident entre le niveau de NO intracellulaire et les processus de transition épithélio-mésenchymateuse semble se dessiner. Pour autant, l'impact du NO sur ce processus semble très dépendant du modèle cellulaire. Ainsi, le traitement de cellules tumorales par des agents libérateurs de NO comme le DETA NONOate, *in vitro* ou *in vivo*, semble les sensibiliser aux

stimuli pro-apoptotiques, mais semble également limiter leur potentiel métastatique en impactant fortement le déroulement de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Baritaki *et al.*, 2010; Bonavida & Baritaki, 2011). Cette propriété du NO à bloquer la mise en place de l'EMT a également été démontré dans des hépatocytes murins. Ainsi, la surexpression de la NOS inductible (iNOS) dans ces cellules bloquait les processus d'EMT induits par le TGF beta (Pan *et al.*, 2009). La capacité du NO à inhiber l'EMT serait liée à une inhibition de l'activité de certaines protéines impliquées dans le déroulement de l'EMT, par des processus de nitrosylation, notamment au niveau de NF-κB (p50), de Snail et de YY1 (*Yin Yang 1*) (Bonavida & Baritaki, 2011). A l'inverse, la surexpression de la NOS inductible dans des cancers du sein agressifs de type basal (ER-), avait pour effet d'amplifier les processus d'EMT (Switzer *et al.*, 2012). De même, parmi les cancers du sein triple-négatifs (TNBC), *ie.* les plus agressifs, pathologie pour laquelle une forte expression de la iNOS est un facteur de mauvais pronostic, l'inhibition chimique de la production de NO inhibait des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT tels que Snail, Slug, Twist 1 ou encore ZEB1 (Granados-Principal *et al.*, 2015). Par ailleurs, de faibles apports exogènes en NO dans des modèles de cellules cancéreuses pulmonaires humaines (H23, H292 et H460), amplifiait significativement la résistance vis-à-vis de la mort cellulaire ainsi que le potentiel migratoire de ces cellules, en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (Chanvorachote *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données démontrent donc que le NO contribue aux processus d'EMT, en facilitant cette transition.

#### **V-4. Impact du NO vis-à-vis de la toxicité du B[a]P**

Même si les études sont rares, un rôle du NO dans la modulation du métabolisme oxydatif du B[a]P a été démontré. En effet, dès 1994, Stadler et collaborateurs avaient mis en évidence au niveau hépatique, qu'un apport de NO exogène inhibait de façon dose-dépendante l'activité d'au moins quatre isoformes de cytochrome P450, dont les isoforme 1A1 et 1A2. Cet effet résultait de la fixation du NO sur le cofacteur hémique de la protéine. Cette inhibition faisait également intervenir des mécanismes transcriptionnels (Stadler *et al.*, 1994). Une autre étude, parue en 2005, montrait que le B[a]P induisait lui-même l'expression de la NOS2. Cette étude, menée sur une lignée de cellules épithéliales œsophagiques de rat (RE-149), montrait que cette induction de la NOS2 en réponse au B[a]P était à la fois dose- et temps-dépendante, et qu'elle impliquait l'activation des voies ERK et NFκB. Ceci suggérait un nouveau mécanisme par lequel le B[a]P pouvait manifester son potentiel cancérigène (Chen *et al.*, 2005). Il a



## Chapitre VI: ATP Inhibitor Factor 1 (IF1), l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATPase

Comme énoncé précédemment (cf. III-2-4.b), l'activité du complexe V est réversible. Ainsi, sous certaines conditions, l'activité de synthèse d'ATP de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase va pouvoir être transitoirement substituée par une activité d'hydrolyse de l'ATP. Lorsque les conditions sont défavorables, manque ou absence d'oxygène, et que la force motrice est limitée, ce changement d'activité du complexe V va ainsi permettre de sauvegarder le potentiel de membrane mitochondriale  $\Delta\psi_m$  en extrudant les protons à l'extérieur de la matrice mitochondriale, et ce, afin de maintenir l'intégrité de l'organite. Cependant, même si ce mécanisme est protecteur vis-à-vis des mitochondries, il va s'opérer au détriment des réserves d'ATP. Dès lors, même si ce mécanisme s'avère très efficace du point de vue de la préservation du pool mitochondrial, il n'est pas viable sur le long terme; en effet, il conduira inexorablement à la mort des cellules s'il est maintenu sur des périodes trop longues. Dans ces conditions, le peptide endogène IF1 (ATP Inhibitor Factor 1) permet de lutter efficacement contre ce gaspillage énergétique, en bloquant l'activité d'hydrolase de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase. IF1 constitue donc un système de protection rapide et efficace, permettant une régulation très fine de l'activité d'hydrolase du complexe V (Di Pancrazio *et al.*, 2004). Il serait également susceptible d'inhiber l'activité de synthèse de ce complexe (García-Bermúdez *et al.*, 2015).

Ce petit peptide mitochondrial a été identifié et purifié pour la première fois en 1963 suite aux recherches de Pullman et Monroy sur des mitochondries isolées de cœur de bœuf (Pullman & Monroy, 1963). Ce Gène a la particularité d'être hautement conservé au sein du domaine Eucaryote (Yamada *et al.*, 1997; Ichikawa *et al.*, 1999).

IF1 est codé par le génome nucléaire par le gène ATP1F1 porté par le chromosome 1 chez l'homme et le chromosome 5 chez le rat. La protéine va ensuite subir des modifications post-traductionnelles afin de générer l'une des formes matures du peptide. On distingue ainsi trois isoformes distinctes de la protéine IF1 obtenues par épissage alternatif. L'isoforme 1 (Q9UII2-1) est la plus longue, et est constituée de 106 acides aminés pour un poids moléculaire de 12,249 kDa; elle est considérée comme la forme canonique du peptide IF1. C'est également la forme préférentiellement exprimée dans de nombreux tissus, notamment chez l'homme (Sanchez-Cernizo *et al.*, 2010). Les isoformes 2 (Q9UII2-2) et 3 (Q9UII2-3) sont composées respectivement de 71 et 60 acides aminés pour des poids moléculaires de 7,912 et 6,592 kDa.

La demi-vie du peptide IF1 est très courte et a été estimée à environ 100 min dans la lignée HCT116 dérivée de carcinome de colon humain (Sanchez-Arago *et al.*, 2013).

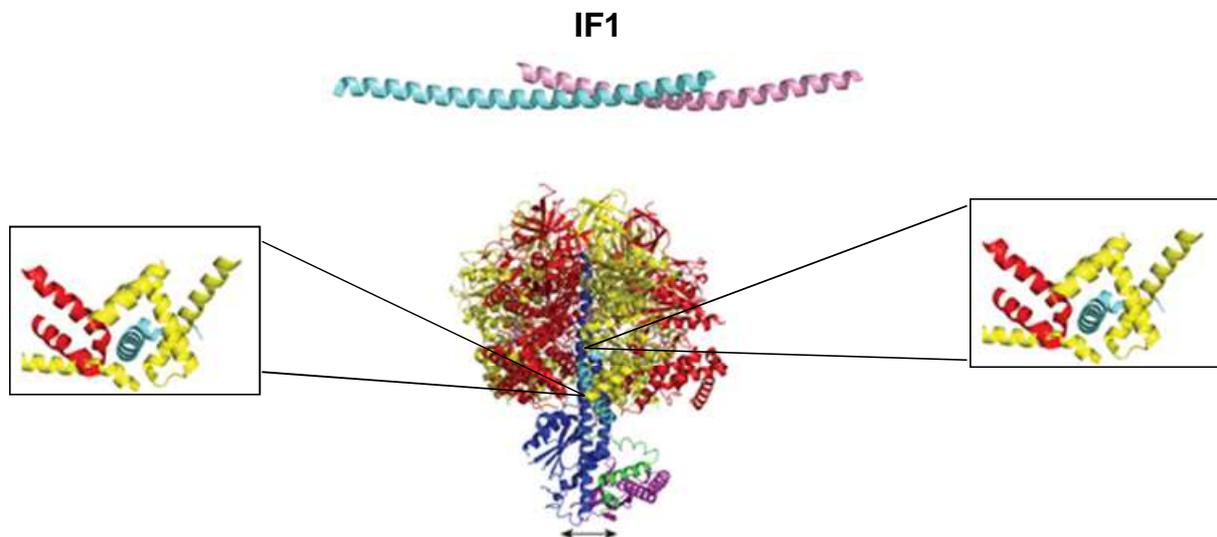
### VI-1. Structure d'IF1

La partie N-terminale allant du 1<sup>er</sup> au 25<sup>ème</sup> acide aminé constitue la séquence d'adressage du peptide vers la matrice mitochondriale. Cette partie est clivée une fois le processus d'import terminé. Chez l'homme, on distingue différents pools d'IF1 au sein des mitochondries selon que la forme primaire ait été clivée après le 24, 25 ou 26<sup>ème</sup> acide aminé. La partie N-terminale pourrait interagir avec la sous-unité  $\gamma$  située au centre du domaine F1 de la F0F1ATPase, comme représenté dans la figure 34 (Gledhill *et al.*, 2007; Bason *et al.*, 2014).

La partie intermédiaire constitue la région inhibitrice du peptide. C'est également la région impliquée dans l'oligomérisation du peptide.

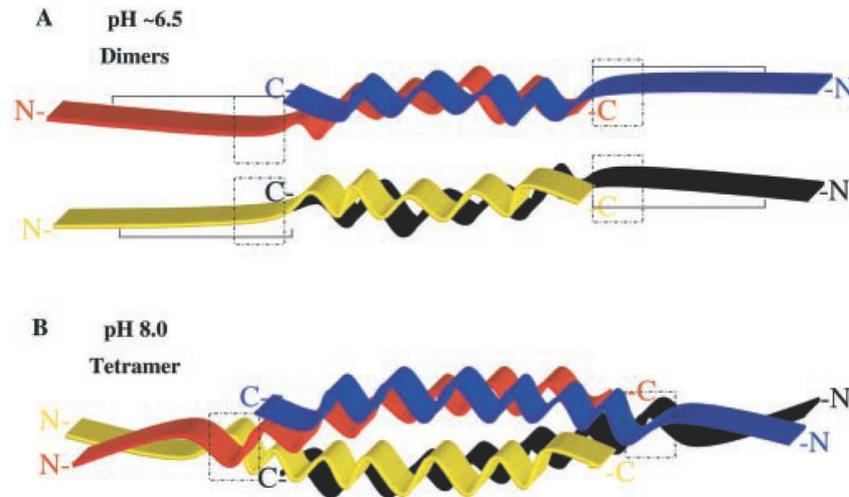
La partie C-terminale est quant à elle impliquée dans la dimérisation du peptide, lui permettant de d'associer simultanément à deux domaines F1 (Cabezón *et al.*, 2000).

Le site de liaison d'IF1 sur l'ATPase est représenté schématiquement sur la figure 34 ci-dessous.



**Figure 34. Modèle d'interactions du peptide IF1( bleu clair) avec la F0F1ATPase (Adapté de Walker, 2013).**

La capacité d'IF1 à se lier à sa cible repose sur une activation qui dépend de la valeur du potentiel hydrogène au sein de la matrice mitochondriale; ce potentiel régule en effet la transition entre l'état tétramérique quiescent et la forme dimérique active du peptide inhibiteur (Figure 35). Dans ce contexte, une acidification du pH matriciel (généralement situé autour de 8) vers un pH proche ou inférieur à la neutralité, jusqu'à 6,5, va permettre de révéler le potentiel d'inhibition du peptide IF1. Ce mécanisme a été identifié pour la première fois par Cabezon et ses collaborateurs au début des années 2000. Ils avaient alors démontré qu'une telle acidification du pH matriciel était à l'origine de la protonation des résidus histidine situés en C-terminal du peptide IF1. En particulier, le résidu histidine situé en position 49 semble particulièrement impliqué dans ce processus pH-dépendant. En effet, la substitution de ce résidu par une lysine avait pour effet de prévenir la dimérisation du peptide lors d'une acidification matricielle. Ce modèle d'oligomérisation et d'interconversion du peptide a également été confirmé en induisant des cross-links à partir de peptides purifiés mis en présence d'un agent inducteur de cross-links, le diméthyl suberimidate (Cabezon et al., 2000a, 2000b).



**Figure 35. Modulation de la structure d'IF1 en fonction du pH mitochondrial**  
(D'après Cabezon *et al.*, 2000).

## VI-2. Capacité d'IF1 à promouvoir la survie

Plusieurs études ont rapporté que la délétion du peptide IF1 avait un impact important sur le maintien de l'intégrité du réseau mitochondrial, en particulier en situation de stress, et plus globalement sur la capacité à survivre des cellules. En effet, IF1 pourrait finement réguler les processus inhérents à la régulation de l'homéostasie mitochondriale (Campanella *et al.*, 2009). Le knockout d'IF1 dans la lignée humaine HeLa, un modèle de cellules épithéliales utérines cancéreuses, a permis de confirmer son rôle dans les situations de stress. En effet, bien que la suppression d'IF1 ne semble aucunement délétère pour cette lignée, IF1 apparaît en revanche essentiel pour assurer la survie de ces cellules cancéreuses dès lors que les conditions deviennent défavorables, comme ont pu le démontrer Fujikawa et collaborateurs (2012), en générant des clones stables de la lignée HeLa dépourvus d'IF1. Ainsi, en condition d'ischémie induite chimiquement *via* un co-traitement concomitant avec du cyanure de potassium KCN et du 2-DG (2-deoxyglucose), l'absence d'IF1 accélère l'apparition de la mort cellulaire. Par ailleurs, cette même étude a également permis de démontrer que les cellules déficientes en IF1 présentaient une sensibilité accrue au paraquat, un produit phytosanitaire puissant parmi les plus utilisés au monde; cet effet serait dû à une plus forte production d'ERO en l'absence d'IF1 (Fujikawa *et al.*, 2012). D'autres études comme celle de Nakamura et collaborateurs (2013), ont permis de démontrer que la suppression du gène *ATPIF1* n'engendrait pas *in vivo* d'altérations morphologiques, physiologiques ou comportementales, et ne perturbait pas non plus le développement chez la souris (Nakamura *et al.*, 2013). La suite de leurs investigations a également mis en évidence que la délétion de ce gène n'était à l'origine d'aucune perturbation du point de vue de l'organisation tissulaire, du flux autophagique, de la morphologie des mitochondries ou encore du point de vue de la synthèse d'ATP mitochondriale. Ceci suggère fortement que malgré sa présence ubiquitaire chez les Eucaryotes, la protéine IF1 n'est pas essentielle chez la souris. Ce résultat va malgré tout de pair avec le rôle physiologique d'IF1 puisque l'activité de ce peptide semble surtout primordiale dans les situations de stress. Cette équipe n'a cependant pas testé cette éventualité en évaluant la résistance au stress des animaux KO pour IF1 comparativement aux animaux sauvages. On peut donc largement entrevoir que, sans ce rôle protecteur d'IF1 à la mitochondrie, ces animaux pourraient être exposés à un plus haut niveau d'ERO, conduisant à une apparition précoce de pathologies et éventuellement subir un vieillissement prématuré.

### VI-3. IF1 et mitochondrie

Le maintien de l'intégrité du réseau mitochondrial, tant du point de vue structural que fonctionnel, est essentiel pour la survie des cellules. En cas de dépolarisation de la membrane mitochondriale, la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase va alors modifier son activité. Comme précisé précédemment, cette inversion d'activité de ce complexe multienzymatique va viser à préserver au maximum le pool de mitochondries. La substitution de son activité d'ATP synthase par une activité d'ATPase va alors permettre de transloquer des protons vers la matrice mitochondriale afin de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial  $\Delta\Psi_m$ . Cependant, ce mécanisme va être très énergivore, comme ont pu le révéler les travaux de Jennings et collaborateurs, qui ont permis de mesurer la part d'ATP hydrolysé pour le maintien du  $\Delta\Psi_m$  (Jennings *et al.*, 1991). Ainsi, l'utilisation de l'oligomycine A, inhibiteur chimique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, montre, dans un modèle de tissu musculaire strié issu de myocarde de chien soumis à des épisodes d'ischémie totale, qu'environ 35% de l'ATP total est mobilisé au seul maintien du  $\Delta\Psi_m$ , et ce, pendant les premières 90 min de l'ischémie. Par ailleurs, en plus de préserver le pool d'ATP intracellulaire et de ralentir sa déplétion, ces travaux sur l'inhibition de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase laissaient également entrevoir le lien étroit avec la régulation du flux glycolytique puisque la glycolyse anaérobie était moins soutenue dans les tissus dont le complexe V était inhibé (Jennings *et al.*, 1991).

N'étant pas énergétiquement viable, ce mécanisme va pouvoir s'opérer sur des périodes relativement courtes, notamment tant que la glycolyse permet de répondre aux besoins en ATP nécessaire au maintien de l'intégrité mitochondriale. Physiologiquement, la cellule va ainsi pouvoir assurer sa survie en jugulant ce gaspillage d'ATP. Ce mécanisme fait alors intervenir IF1, l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase. Au même titre que l'inhibition chimique, l'action du peptide permet de protéger les cellules lorsque l'oxygénation des tissus est réduite (Rouslin, 1991).

Le niveau d'expression d'IF1 au sein des tissus semble également avoir une incidence notable sur la structure des mitochondries et l'organisation du réseau mitochondrial. L'impact d'IF1 sur cet organe pourrait cependant être fortement dépendant du modèle. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre une augmentation du contenu mitochondrial en peptide inhibiteur et des modifications de l'ultrastructure du réseau mitochondrial. Les effets d'IF1 sur l'ultrastructure des mitochondries ont été rapportés au début des années 2000, en particulier grâce à sa capacité à générer des dimères de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. Ces études structurales,

réalisées à partir de protéines purifiées issues de cœur de bœuf, ont permis de mettre à jour que les dimères de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase résultent d'une liaison entre les sous-unités F<sub>1</sub>, par le biais d'un dimère constitué de deux molécules d'IF1 du côté matriciel (Cabezón *et al.*, 2000; Cabezón *et al.*, 2003). En parallèle, certaines études vont démontrer que ces mêmes dimères de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, en particulier les sous-unités e et g, sont impliqués dans la biogénèse de la membrane interne mitochondriale ainsi que dans son organisation (Paumard *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 2002; Arselin *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2006; Strauss *et al.*, 2008). En 2005, des études réalisées par microscopie électronique spécifiquement pour caractériser les mécanismes de dimérisation de l'ATPase vont révéler l'implication d'IF1 dans ce processus, et vont ainsi suggérer le rôle d'IF1 dans la régulation de l'ultrastructure des mitochondries, en lien avec l'état métabolique des cellules (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005). En 2008, Campanella et ses collaborateurs vont approfondir ces données *in vitro* dans différents modèles de lignées cellulaires. Leur stratégie visant à étudier l'impact du niveau d'expression d'IF1 sur l'ultrastructure des mitochondries, va clairement mettre en évidence le rôle de la protéine IF1 dans la régulation de la structure des mitochondries (Campanella *et al.*, 2008).

Il a été démontré, dans un modèle de cellules HeLa, qu'IF1 représentait un point de contrôle précoce, permettant de protéger les cellules en bloquant la cascade apoptotique induite par la staurosporine (STS) ou l'étoposide (ETO). Campanella et ses collaborateurs ont récemment proposé que cette action inhibitrice vis-à-vis de l'apoptose, reposait essentiellement sur la capacité d'IF1 à réguler la dynamique mitochondriale. Ainsi, la surexpression d'IF1 dans les cellules HeLa, a pour effet d'augmenter la masse mitochondriale tout en préservant la structure des crêtes, et ce, même en présence d'agents pro-apoptotiques. Enfin, il apparaît clairement dans cette étude que le niveau d'IF1 régule positivement le nombre de crêtes au sein des mitochondries. IF1 pourrait protéger les cellules vis-à-vis de l'apoptose en favorisant la formation de dimères de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, ce qui aurait pour effet de retarder considérablement le déclenchement de la voie intrinsèque, en bloquant le relargage du cytochrome c. La protection conférée par IF1 serait alors double puisqu'il permettrait également de prévenir la libération de Ca<sup>2+</sup> depuis le réticulum endoplasmique (RE), en empêchant la fixation précoce du cyt c sur les récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, ce qui limiterait l'influx calcique dans la mitochondrie, prévenant l'ouverture du PTP (Faccenda *et al.*, 2013a, 2013b). Enfin, IF1 pourrait également protéger de la mort cellulaire en bloquant la translocation de DRP1 (*Dynamine-Related Protein 1*); impliqué dans la fission mitochondriale ainsi que la translocation et l'oligomérisation de Bax à la mitochondrie (Faccenda *et al.*, 2013a, 2013b).

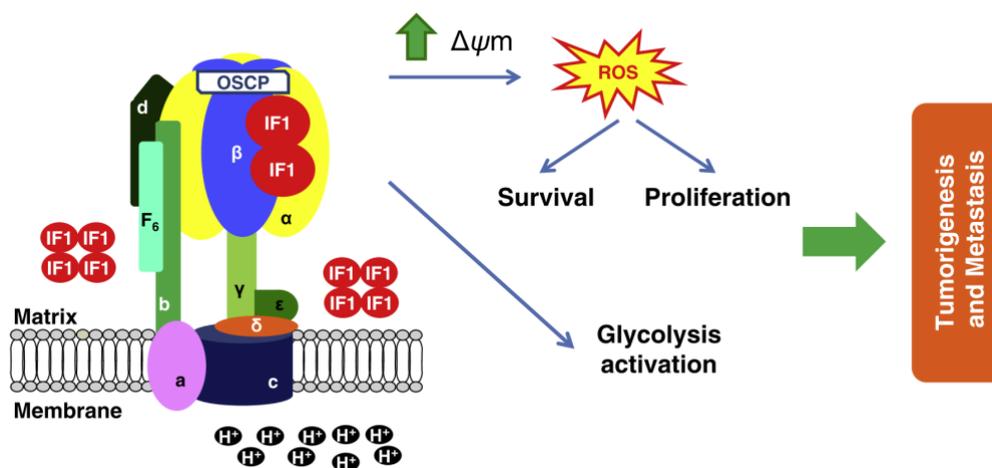
Le niveau d'ERO est également lié au niveau d'expression de la protéine IF1. En effet, une quantité importante d'IF1 à la mitochondrie abaisserait le niveau du stress oxydant (Formentini *et al.*, 2012). La faible production d'ERO qui en résulterait, agirait alors comme un signal puissant en mesure de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses.

Dès lors, il apparaît qu'IF1 exerce réellement un rôle physiologique clé au sein des mitochondries, de par sa capacité à réguler très finement le métabolisme cellulaire, en particulier lorsque les cellules sont confrontées à un stress; il joue ainsi un rôle prépondérant dans la survie cellulaire. De nombreux travaux ont permis d'établir un lien entre la régulation de la phosphorylation oxydative et l'exécution de la mort cellulaire, ces deux mécanismes étant structurellement et fonctionnellement intégrés (Green *et al.*, 2014). La perméabilisation de la membrane mitochondriale *via* l'ouverture du PTP constitue un point de non retour dans l'établissement de la cascade apoptotique. Les travaux du groupe de Paolo Bernardi ont permis d'identifier la nature de ce PTP, formé à partir de dimères d'ATP synthase mitochondriale (Giorgio *et al.*, 2013). On peut ainsi légitimement émettre l'hypothèse d'une fonction annexe d'IF1 dans le contrôle de la perméabilisation mitochondriale, d'autant qu'il est également connu que la dynamique mitochondriale, fortement impactée par le niveau d'expression d'IF1, détermine la tendance naturelle d'une mitochondrie à se perméabiliser en réponse à un signal pro-apoptotique.

#### **VI-4. Contribution d'IF1 à l'acquisition du phénotype Warburg par les cellules cancéreuses**

Dès 1997, le rôle de la protéine IF1 dans la mise en place de l'effet Warburg a été suggéré. Les travaux de Capuano et collaborateurs ont en effet permis d'établir un lien entre la surexpression d'IF1 et la prépondérance d'un métabolisme glycolytique dans des mitochondries isolées à partir de biopsies de carcinome hépatocellulaire humain (Capuano *et al.*, 1997). En 2010, Sanchez-Cenizo et collaborateurs démontraient l'implication du peptide IF1 dans une telle reprogrammation métabolique dans différentes cellules cancéreuses. C'est également la première étude qui réalise une analyse différentielle du niveau d'expression d'IF1 entre des tissus sains et leur équivalent tumoral (Sánchez-Cenizo *et al.*, 2010). La forte expression d'IF1 dans les cellules cancéreuses sera par la suite confirmée dans les lignées HepG2 et JHH-6 (Domenis *et al.*, 2011). IF1 apparaît donc être une molécule clé au sein des mitochondries, permettant l'adaptation des cellules au stress ainsi que la survie des cellules cancéreuses (Yadav & Chandra, 2013). Dans ce contexte, l'équipe de José Manuel Cuezva,

avait corrélié l'augmentation de l'expression du peptide IF1 avec une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans plusieurs modèles cellulaires (NRK, Hepa 1-6 et HepG2). Ils ont pu associer cette hyperpolarisation de la membrane mitochondriale à un ralentissement de la machinerie oxydative mitochondriale au profit du métabolisme glycolytique, cette reprogrammation métabolique favorisant la survie et la prolifération de ces lignées, comme illustré dans la figure 36 (Sánchez-Cenizo *et al.*, 2010; Formentini *et al.*, 2012).



**Figure 36. Contribution d'IF1 au processus de cancérogénèse (D'après Martinez-Reyes & Cuezva, 2014).**

Récemment, une équipe italienne a obtenu des résultats différents de ceux publiés jusqu'alors, permettant de jeter un nouveau regard sur les fonctions biologiques d'IF1 dans la lignée humaine d'ostéosarcome humaine 143B. Les auteurs ont ainsi corrélié l'augmentation du peptide inhibiteur à une augmentation du rendement de la phosphorylation oxydative et de la respiration cellulaire. La présence d'IF1 serait alors déterminante pour maintenir un niveau suffisant de dimères d'ATP synthase et la fonctionnalité du PTP, même si des analyses ont révélé des degrés de dimérisation similaire dans les cellules déficientes en IF1. Selon ces auteurs, de tels effets seraient liés à la capacité d'IF1 à promouvoir la formation des crêtes mitochondriales (Barbato *et al.*, 2015).

L'analyse du niveau d'expression d'IF1 dans des cohortes de patients souffrant de différents types de cancers ciblant le colon, les poumons, les seins ou encore les ovaires, a établi que plus de 90% des biopsies étudiées présentaient une forte quantité du peptide inhibiteur; comparativement, l'expression d'IF1 dans les tissus contrôles restait négligeable. Il a

cependant été observé que les tissus présentant une forte expression d'IF1 dans les conditions basales comme l'endomètre, les reins ou encore l'estomac, ne voyaient pas leur niveau d'expression d'IF1 modulé dans leur pendant cancéreux (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013). Cette étude a également permis d'établir que le cœur et le foie sont les tissus présentant la plus forte expression d'IF1 dans les conditions physiologiques, mais le comparatif avec un tissu cancéreux n'a pas été effectué pour ces organes. Les auteurs n'ont ainsi retenu que les tissus pulmonaires, mammaires et ovariens pour mener leur étude mécanistique. Malgré cela, ces chercheurs ont pu confirmer *in vitro* les données, et corrélérer la surexpression d'IF1 avec un flux glycolytique accrue, un plus haut niveau d'ERO générées à la mitochondrie ainsi qu'une résistance significative à l'apoptose. Les auteurs suggèrent qu'IF1 pourrait constituer un excellent marqueur de prédiction de cancer et de risque de rechute. En effet, pour les cancers du sein et du colon, une faible expression d'IF1 va de pair avec un mauvais pronostic de survie ainsi qu'un risque plus élevé de récurrence (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013). Une étude similaire sur une cohorte de patients atteints de cancers de l'estomac a quant à elle démontré qu'un haut niveau d'expression d'IF1 pour ce type de cancers était associé à une prolifération accrue des cellules cancéreuses, ainsi qu'à leur capacité migratoire et invasive (Yin *et al.*, 2015). Il ressort donc de cette étude qu'une forte expression d'IF1 dans des tumeurs est plutôt un facteur de mauvais pronostic, et son extinction aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* semble fortement affecter le développement tumoral. IF1 pourrait donc constituer un excellent marqueur clinique, et représenter une cible thérapeutique pertinente dans le cas du cancer de l'estomac (Yin *et al.*, 2015). Enfin, au niveau hépatique, une équipe chinoise s'est également intéressée à l'expression d'IF1 dans une cohorte de patients atteints de CHC. Ils ont pu identifier que l'expression d'IF1 était directement corrélée au degré d'avancement de la pathologie. Comme précédemment pour les cancers de l'estomac, les patients présentant un tissu tumoral riche en IF1, présentait une espérance de vie moindre ainsi qu'un risque de rechute plus important. Une inhibition spécifique de la protéine IF1, *in vivo* chez l'animal, a montré des résultats significatifs en termes de réduction de l'agressivité des CHC, et ce, en limitant l'angiogénèse tumorale, ainsi que le potentiel de migration de la tumeur. Ces résultats soulignent donc l'intérêt d'étudier le niveau d'expression IF1 chez les patients souffrant de CHC, comme facteur de mauvais pronostic; ils suggèrent également qu'IF1 pourrait constituer une cible thérapeutique judicieuse chez ces patients (Song *et al.*, 2014).

## **VI-5. Implication d'IF1 dans les processus de migration**

Plusieurs études ont permis d'établir un lien entre l'expression d'IF1 et les processus de migration et de métastase. Notamment, une équipe chinoise a montré qu'IF1 était en mesure de promouvoir des processus d'angiogenèse, favorisant ainsi le potentiel métastatique des carcinomes hépatocellulaires. Ce mécanisme ferait intervenir une transition de type épithélio-mésenchymateuse, avec en amont l'activation de Snai1 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui favoriserait plus tardivement l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Song *et al.*, 2014). Une seconde étude a démontré que le knockdown d'IF1 était en mesure de ralentir le développement de tumeur mais également de fortement réduire le potentiel invasif de cette dernière à la fois *in vitro* dans le modèle de cellules cancéreuses gastriques humaines SGC-7901, mais aussi *in vivo* dans un modèle de xénogreffes sur souris nude immuno-déficientes (Yin *et al.*, 2015).

Par ailleurs, également en lien avec l'angiogénèse, trois études complémentaires ont identifié d'autres mécanismes impliquant le peptide inhibiteur IF1 dans ce processus, et qui seraient à même de favoriser ou d'inhiber l'acquisition d'un phénotype migratoire. Ainsi, il a été montré que la liaison de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I) sur les ATPase de surface SATP, ou ecto-F1-ATPase, stimulerait la prolifération, l'angiogenèse et le potentiel migratoire des cellules endothéliales progénitrices humaines (hEPC). Tout comme l'oligomycine A, un apport exogène du peptide inhibiteur IF1 *in vitro* serait en mesure de contrecarrer l'acquisition de ces effets en bloquant l'interaction d'apoA-I avec les ecto-F1-ATPase (González-Pecchi *et al.*, 2015). Enfin, cet effet inhibiteur d'IF1 vis-à-vis des SATP exprimées à la surface des cellules endothéliales, limiterait la production d'ATP indispensable aux processus de migration et de prolifération au cours de l'angiogénèse. Un tel effet d'IF1 dans la promotion des processus de migration cellulaire et des métastases pourrait donc être indirectement lié à sa capacité à bloquer la signalisation anti-angiogénique de l'angiostatine (Burwick *et al.*, 2005; Freeman *et al.*, 2011).

## **VI-6. Régulation d'IF1**

Du fait de la forte implication du peptide IF1 dans l'acquisition d'un métabolisme énergétique de type Warburg et plus globalement dans la survie des cellules dans un nombre important de cancers, il semble désormais primordial de caractériser les voies impliquées dans la régulation de ce peptide inhibiteur. Comme suggéré par mes travaux de thèse, il pourrait également

constituer un excellent marqueur d'exposition vis-à-vis de certains toxiques de l'environnement. Une meilleure compréhension des modalités de régulation d'IF1 est donc fondamentale afin de permettre l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant IF1. Cependant, il n'existe à ce jour que peu de données sur la régulation du peptide IF1, bien que différents mode de régulation semblent impliqués.

Parmi les pistes majeures, une équipe Taïwanaise a identifié le facteur de transcription HIF-1 comme l'un des régulateurs de l'expression d'IF1. Dans cette étude, ils ont utilisé un modèle de sepsis induit par la méthode CLP (*Cecal Ligation Puncture procedure*) chez le rat Sprague-Dawley, ainsi qu'un modèle d'hypoxie chimio-induite par le  $\text{CoCl}_2$  (chlorure de cobalt (II)) sur la lignée cellulaire clone 9, une lignée épithéliale hépatique non transformée de rat. Leurs résultats dans ces deux modèles semblent établir que l'activation de HIF-1 $\alpha$  dans le foie permet de réguler positivement l'expression d'IF1 (Huang *et al.*, 2011).

Comme décrit précédemment, l'action inhibitrice d'IF1 sur la F0F1ATPase entraîne une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, associée à une production d'ERO, notamment sous la forme d'anions superoxydes. Cette production d'ERO va avoir pour effet d'activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, favorisant alors la survie et la prolifération des cellules (Formentini *et al.*, 2012). Cette étude, menée dans des modèles cellulaires de cancer colorectal humain (HCT116 et SW620), avait mis en évidence une activation indirecte du facteur de transcription NF- $\kappa$ B *via* une modulation du niveau du stress oxydant. En effet, la neutralisation des ERO mitochondriales au moyen de la molécule Mito Q bloquait d'une part l'activation de NF- $\kappa$ B en empêchant la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , et d'autre part l'activation transcriptionnelle de Bcl-XL. Ceci aboutissait au blocage de la prolifération et de la résistance vis-à-vis de l'apoptose induites par le peptide IF1 (Formentini *et al.*, 2012). Au niveau hépatique, il a cependant été montré que le peptide IF1 était directement transcrit par NF- $\kappa$ B dans des hépatocarcinomes humains (Song *et al.*, 2014). Les auteurs proposent que les partenaires IF1/NF- $\kappa$ B fonctionneraient comme une boucle de rétroaction positive qui non seulement amplifierait le potentiel oncogène d'IF1, mais permettrait aussi de le maintenir sur la durée. Un haut niveau d'expression de la protéine IF1 permettrait alors de favoriser la fixation de TRF1 (*TNF receptor-associated factor 1*) sur NIK (*NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase*), supprimant les interactions entre ce dernier et le complexe TRAF2-cIAP2 (*TNF receptor-associated factor 2/Baculoviral IAP repeat-containing protein 3*). Cette stabilisation de NIK, favoriserait alors l'activation de NF- $\kappa$ B, qui à son tour, régulerait transcriptionnellement le contenu cellulaire en IF1, accentuant ainsi graduellement son action pro-cancéreuse. Cette

même équipe a d'ailleurs identifié la séquence de liaison du facteur de transcription NFκB (GGGGTTTCCC) sur le promoteur du gène IF1 (Song *et al.*, 2014).

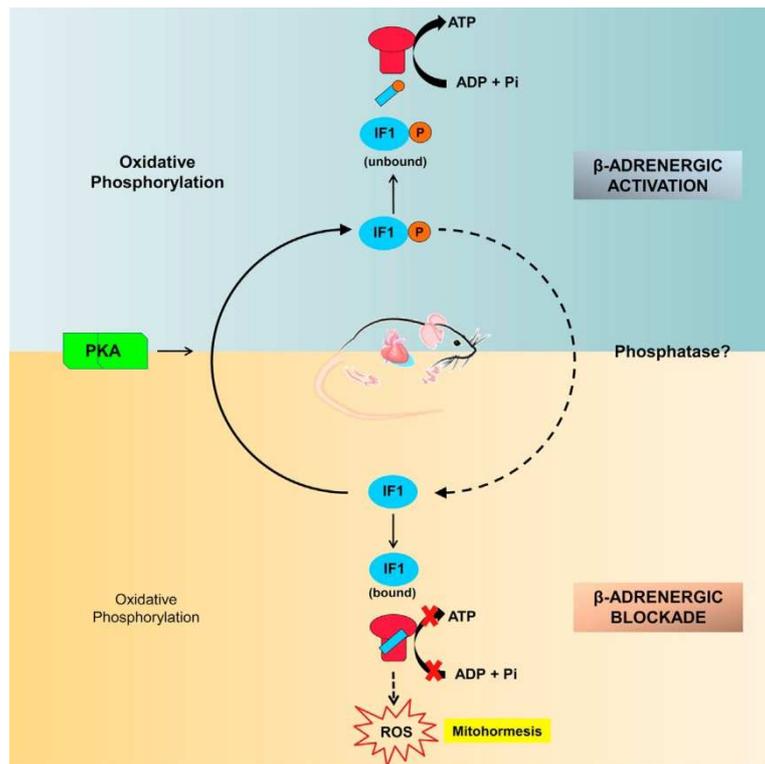
Enfin, des analyses de DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction*) ont été effectuées sur des rats Sprague-Dawley ayant subi une administration soit d'un stéroïde synthétique, la PCN (prégnénolone-16alpha-carbonitrile), soit d'un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone; ces molécules sont connues pour stimuler le métabolisme hépatique et favoriser l'élimination des xénobiotiques de par leur capacité à interagir avec le récepteur PXR (*Pregnane X Receptor*). L'analyse du niveau d'expression d'IF1 dans différents organes dont les reins, les poumons, le cœur ou encore les testicules, avait permis de démontrer que l'induction d'IF1 sous l'effet de ces molécules se limitait exclusivement au tissu hépatique. Cette étude suggère donc que le gène IF1 fait partie d'un panel de gènes plus vaste sous le contrôle du récepteur PXR, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie cellulaire en cas de stress toxique (Jiménez *et al.*, 2000).

Un rôle de la protéine IEX-1 (*Immediate Early response gene X-1*), également rencontrée sous la dénomination de IER3 (*Immediate Early Response 3*), dans la régulation du peptide IF1 a aussi été suggéré. L'interaction d'IEX-1 avec la partie C-terminale du peptide IF1, entre les 66<sup>ème</sup> et 73<sup>ème</sup> acides aminés, pourrait compromettre la stabilité de ce dernier, et ainsi favoriser sa dégradation par une protéase mitochondriale encore non identifiée (Shen *et al.*, 2009). Par ailleurs, cette étude a également permis de mettre en évidence que les effets mitochondriaux d'une surexpression d'IEX-1 étaient quasi identiques à ceux observés suite à l'extinction du gène IF1 par des shRNA. Dans ces deux conditions, les auteurs ont pu observer une diminution de la production d'ERO ainsi que du  $\Delta\Psi_m$  dans la lignée cellulaire ovarienne de hamster chinois CHO. Enfin, un dernier résultat très intéressant de cette étude, montre que l'invalidation du gène IEX-1 dans un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), a pour effet d'amplifier la prolifération et la survie cellulaire, en lien avec une reprogrammation métabolique des cellules, favorisant alors un métabolisme glycolytique (Shen *et al.*, 2009). Une certaine analogie entre les induction d'IEX-1 et d'IF1 est par ailleurs à souligner; en effet, l'induction d'IEX-1 diminuerait également significativement la production d'ERO, et serait ainsi capable de conférer une protection vis-à-vis de différents stimuli pro-apoptotiques (Shen *et al.*, 2006). Cependant, les fonctions cellulaires d'IEX-1 semblent éminemment complexes comme en témoignent les travaux de Wu et collaborateurs, montrant à la fois des activités pro- et anti-apoptotiques d'IEX-1 (Wu *et al.*, 2013). Enfin, une autre étude récente a montré une accumulation rapide d'IF1 en présence d'un inhibiteur des

protéases à sérine : l'AEBSF (Fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl), suggérant l'implication d'une protéase mitochondriale ATP-dépendante, peut-être Lon ou ClpXP, dans la dégradation d'IF1 (Sánchez-Aragó *et al.*, 2013b).

Un motif de liaison à la calmoduline a également été mis en évidence dans la séquence du peptide IF1. Celui-ci permettrait une interaction entre ces deux protéines avec une stœchiométrie de 1 :1. Sur le peptide IF1 d'origine bovine, la séquence 33-42 a été identifiée comme la région de liaison à la calmoduline (Contessi *et al.*, 2005). Cette interaction serait à la fois dépendante du pH et du  $\text{Ca}^{2+}$ . Le complexe IF1-calmoduline pourrait se former à l'extérieur des mitochondries. Dans ce contexte, les auteurs suggèrent que cette modalité de régulation d'IF1 serait plutôt impliquée dans la maturation ou l'adressage du peptide, mais pourrait également participer à une autre fonction cellulaire d'IF1 non encore identifiée (Contessi *et al.*, 2005).

Enfin, une étude qui vient tout juste de paraître a permis d'établir que la voie  $\beta$ -adrénergique serait aussi impliquée dans la régulation d'IF1. La stimulation de cette voie aboutit à l'activation de la PKA, qui phosphorylerait IF1 au niveau de la sérine 39 dans la forme humaine du peptide IF1. La forme phosphorylée d'IF1 ne serait alors plus capable de se lier à la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, favorisant à la fois les activités de synthèse et d'hydrolyse de l'ATP du complexe V (Figure 37). Les auteurs ont par ailleurs démontré qu'IF1 se trouverait sous la forme non phosphorylée dans différents modèles de cancers humains, mais également en situation d'hypoxie, inhibant OXPHOS et stimulant en contrepartie la glycolyse et la prolifération. Dans ce contexte, c'est donc la forme non phosphorylée qui se fixerait sur la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase (García-Bermúdez *et al.*, 2015).



**Figure 37. Mode de régulation par phosphorylation du peptide IF1 par l'intermédiaire de la voie  $\beta$ -adrénergique (García-Bermúdez *et al.*, 2015).**

IF1 émerge donc comme un acteur clé de la survie et de la transformation des cellules cancéreuses, favorisant la reprogrammation métabolique, l'EMT ainsi que la migration cellulaire. Néanmoins, rien n'est connu pour le moment quant à une éventuelle action des contaminants de l'environnement sur la régulation de ce peptide inhibiteur; c'est pourquoi nous nous sommes attelés à évaluer les effets du B[a]P sur ce dernier.

## Principaux objectifs de la thèse

Les travaux de notre équipe avaient précédemment mis en évidence des dysfonctionnements mitochondriaux sous l'effet du B[a]P dans la lignée épithéliale hépatique de rat F258. Il avait notamment été montré que les voies NHE1 et p53 convergeaient vers la mitochondrie, induisant la relocalisation de l'hexokinase II (HKII) vers le cytoplasme. Ce mécanisme est apparu comme déterminant, puisque la libération de l'HKII de la mitochondrie était responsable d'un dysfonctionnement mitochondrial, à l'origine de l'apoptose (Huc *et al.*, 2007). Plus tard, le couple GSK3 $\alpha$ /c-myc a été identifié comme jouant un rôle dans ce processus de relocalisation de l'HKII (Dendelé *et al.*, 2012). Nos travaux antérieurs à cette thèse avaient également détecté une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans les cellules F258 en réponse à une faible concentration de B[a]P (Huc *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données a montré que la mitochondrie était un organe cible du B[a]P dans notre modèle cellulaire, suggérant un possible effet de ce cancérigène sur le métabolisme énergétique. Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse a été de poursuivre l'étude des dysfonctionnements mitochondriaux induits par le B[a]P, notamment utilisé à une faible concentration, et d'analyser les conséquences sur le métabolisme énergétique dans les cellules F258.

Plus spécifiquement, le premier objectif a donc visé à identifier l'origine de l'hyperpolarisation mitochondriale induite par le B[a]P. Nous avons pu déterminer qu'une production de NO, résultant de l'induction de la iNOS, était responsable de cet effet mitochondrial. De plus, nous montrons aussi que cette production de NO est à l'origine d'une voie de survie. Ces résultats ont fait l'objet de l'article 1.

Le but du second objectif, en lien avec l'hyperpolarisation préalablement identifiée, a été d'analyser les perturbations métaboliques potentiellement associées. Nous avons ainsi pu démontrer qu'une reprogrammation métabolique s'opérait sous l'effet du B[a]P dans notre modèle. Ces résultats sont regroupés dans l'article 2.

Le dernier objectif a été, toujours en lien avec l'hyperpolarisation comme point de départ, d'étudier les effets du B[a]P sur l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, à savoir IF<sub>1</sub>, et de tester son rôle dans les effets métaboliques observés. Les résultats de cette partie seront présentés dans l'article 3.



# **RESULTATS**



## Article 1

### **Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential**

(Article publié dans *Toxicology in vitro*)

#### **Contexte scientifique de l'étude**

L'équipe avait identifié que le B[a]P induisait une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans la lignée F258 (Huc *et al.*, 2003). Or, une telle hyperpolarisation jouerait un rôle dans la progression ainsi que dans la croissance tumorale (Heerdt *et al.*, 2006). Dans ce contexte, outre ses effets apoptotiques impliqués dans l'initiation et la promotion tumorale, le B[a]P pourrait, en ciblant la mitochondrie, également contribuer à la phase de progression.

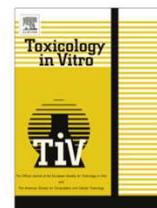
#### **Objectifs**

Identifier l'origine ainsi que le rôle de cette hyperpolarisation mitochondriale induite par le B[a]P.

#### **Résumé des principaux résultats**

Nos résultats montrent que dans les cellules F258, le B[a]P est à l'origine d'une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale. Nous avons ensuite pu identifier l'origine de cette hyperpolarisation ; elle résulte de l'activation de la iNOS par une voie dépendante du RAh, et possiblement de p53. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que la production de NO résultant de l'activation de la iNOS, agit comme un signal de survie, à même de contrecarrer des effets toxiques du B[a]P. Ce signal de survie pourrait faire intervenir l'hyperpolarisation mitochondriale.





# Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential



Kévin Hardonnière<sup>a,b</sup>, Laurence Huc<sup>c,d</sup>, Normand Podechard<sup>a,b</sup>, Morgane Fernier<sup>a,b</sup>, Xavier Tekpli<sup>e</sup>, Isabelle Gallais<sup>a,b</sup>, Odile Sergent<sup>a,b</sup>, Dominique Lagadic-Gossmann<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>UMR Inserm 1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET), Rennes, France

<sup>b</sup>Université de Rennes 1, SFR Biosit, Rennes, France

<sup>c</sup>INRA, ToxAlim (Research Centre in Food Toxicology), 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse, France

<sup>d</sup>Université de Toulouse, INP, UPS, TOXALIM, 31027 Toulouse, France

<sup>e</sup>Stem Cell Group, Nordic EMBL Partnership Centre for Molecular Medicine Norway (NCMM), University of Oslo, Oslo, Norway

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 December 2014

Revised 12 June 2015

Accepted 13 June 2015

Available online 15 June 2015

### Keywords:

Benzo[a]pyrene

Nitric oxide

Mitochondrial membrane hyperpolarization

AhR

Apoptosis

Survival

## ABSTRACT

Benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype molecule of polycyclic aromatic hydrocarbons, exhibits genotoxic and carcinogenic effects, which has led the International Agency for Research on Cancer to recognize it as a human carcinogen. Besides the well-known apoptotic signals triggered by B[a]P, survival signals have also been suggested to occur, both signals likely involved in cancer promotion. Our previous work showed that B[a]P induced an hyperpolarization of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in rat hepatic epithelial F258 cells. Elevated  $\Delta\Psi_m$  plays a role in tumor development and progression, and nitric oxide (NO) has been suggested to be responsible for increases in  $\Delta\Psi_m$ . The present study therefore aimed at evaluating the impact of B[a]P on NO level in F258 cells, and at testing the putative role for NO as a survival signal, notably in link with  $\Delta\Psi_m$ . Our data demonstrated that B[a]P exposure resulted in an NO production which was dependent upon the activation of the inducible NO synthase. This enzyme activation involved AhR and possibly p53 activation. Preventing NO production not only increased B[a]P-induced cell death but also blocked mitochondrial hyperpolarization. This therefore points to a role for NO as a survival signal upon B[a]P exposure, possibly targeting  $\Delta\Psi_m$ .

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as benzo[a]pyrene (B[a]P) are major environmental contaminants, notably found in ambient air, cigarette smoke and smoked food. The prototype molecule of PAHs, B[a]P, is well-known to exhibit diverse genotoxic and carcinogenic effects, which has led the International Agency for Research on Cancer to recognize it as a human carcinogen from group 1 (IARC, 2010). Indeed, notably due to its metabolism by cytochromes P450 into reactive molecules and reactive oxygen species (ROS), B[a]P can trigger the formation of DNA adducts or lead to DNA oxidative alterations (Baird et al., 2005; Wells et al., 1997; Zedeck, 1980). Such a genotoxic action along

with non-genotoxic effects of B[a]P may be important for the final outcome: cell survival and possible mutations, or apoptosis (Huc et al., 2006; Salas and Burchiel, 1998; Solhaug et al., 2004). So far, our work has mainly dealt with the early mechanisms underlying the apoptosis induced by low concentrations of B[a]P in hepatic cells (F258 rat hepatic epithelial cells and rat primary hepatocytes) (Huc et al., 2006, 2007; Collin et al., 2014). We have thus demonstrated the involvement of two main pathways leading to apoptosis: a DNA damage-related p53 pathway and a membrane remodeling-dependent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 1 (NHE1) pathway, both involved in mitochondrial alterations (Huc et al., 2006, 2007; Tekpli et al., 2010a). Besides pro-apoptotic signals, B[a]P *per se* or its reactive metabolites have also been demonstrated to elicit anti-apoptotic/survival signals, such as activation of the AKT pathway, inhibition of the pro-apoptotic protein Bad, increase in intercellular communication, up-regulation of RIP1 (Solhaug et al., 2004; Tekpli et al., 2010b; Wang et al., 2013). All these signals might favor the promotion step of the carcinogenic process.

Diverse studies have shown that an elevation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) is a characteristic of tumor

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; B[a]P, benzo[a]pyrene;  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial membrane potential; iNOS, inducible nitric oxide synthase; P450, cytochrome P450; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon.

\* Corresponding author at: Inserm U1085/IRSET, Université Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France.

E-mail address: [dominique.lagadic@univ-rennes1.fr](mailto:dominique.lagadic@univ-rennes1.fr) (D. Lagadic-Gossmann).

development and progression. For example, an elevated intrinsic  $\Delta\Psi_m$  in colon carcinoma cells has been involved in the enhanced survival capacity of the cells e.g. in response to hypoxia, thereby avoiding apoptosis, escaping anoikis, and invading the basement membrane (Heerdt et al., 2006). Regarding B[a]P, our previous results have evidenced such an increase in  $\Delta\Psi_m$  in F258 rat hepatic epithelial cells exposed to this carcinogen (Huc et al., 2003; Holme et al., 2007). The F258 cell line is of particular interest since, due to its high constitutive expression of CYP1B1, it is sensitive to low B[a]P concentrations, and hence might reveal low dose effects relevant to environmental exposure (Holme et al., 2007). Although the B[a]P-induced mitochondrial hyperpolarization in F258 cells appears to depend on the p53 pathway (Huc et al., 2003), its origin remains to be thoroughly analyzed. We have thus hypothesized that nitric oxide (NO) might be responsible for B[a]P-induced increase in  $\Delta\Psi_m$ , since NO has already been proposed as a regulator of  $\Delta\Psi_m$  (Beltrán et al., 2002; Nagy et al., 2003). Indeed, B[a]P is known to induce the inducible NO synthase (iNOS) (Chen et al., 2005a,b), and NO has also been described to be a pro-survival signal during carcinogenesis (Choudhari et al., 2013). In this context, this study has been carried out in order to test whether B[a]P induced an NO production in F258 cells, and if so, whether such a production might play a role as a survival signal, by targeting mitochondria.

Our present data show for the first time that B[a]P induced an AhR/p53-dependent NO production via iNOS induction, and that NO may play a role as a survival signal in F258 cells, possibly through regulating  $\Delta\Psi_m$ .

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Chemicals

Benzo[a]pyrene (B[a]P),  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF), 1-Methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazanyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH223191), DEVD-AMC (Asp-Glu-Asp-7-amin o-4-methylcoumarin), 3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)), Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), NG-Methyl-L-arginine acetate salt (LNMMMA), 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine sodium, 2-(N,N-Diethylamino)-diazeneolate 2-oxide sodium salt hydrate (NONOate), pifithrin  $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ), N-Acetyl-3-(nitrosothio)-DL-valine, S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin solution (TCDD) were all purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). N-(Diaminomethylene)-4-isopropyl-3-(methylsulfonyl) benzamide (Cariporide) was purchased from Santa Cruz (Frankfurt, Germany). 4,5-Diaminofluorescein Diacetate (DAF-2DA) was purchased from Calbiochem. Hoechst 33342, 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate (DAF-FM) and MitoTracker Red CMXRos were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). All these products were used as a stock solution in DMSO; final concentration of this vehicle in culture medium was <0.00005% (v/v), and control cultures received the same concentration of vehicle as treated cultures. Rabbit iNOS antibody (ab3523) was purchased from Abcam (Paris, France), mouse monoclonal p21 antibody ([F-5]: sc-6246) from Santa Cruz, and rabbit polyclonal CYP1B1 antibody (CYP1B1-A) from Alpha Diagnostic Intl (San Antonio, USA). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from DAKO (Les Ulis, France).

### 2.2. Cell culture

The present study was performed on the F258 rat liver epithelial cell line. This cell line was originally initiated from normal liver

of 10-day old Fischer rats (Morel-Chany et al., 1978, 1985). Following several culture passages, some of the cells underwent spontaneous transformation (Morel-Chany et al., 1978, 1985). Despite such a transformation, we found that the F258 cells exhibited a relatively normal karyotype with a predominantly diploid population (Supplementary Fig. 1), and was still capable of responding to B[a]P-induced DNA damage as witnessed by the p53 activation leading to cell death (Huc et al., 2006). The choice for these cells was supported by the fact that we previously described it to be sensitive to low concentrations of B[a]P, due to a high constitutive expression of CYP1B1; note that CYP1A1 protein was not detected even upon high concentrations of B[a]P (Holme et al., 2007). The F258 cell line was cultured in Williams' E medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and treated 24 h following seeding, as previously described (Huc et al., 2004; Payen et al., 2001). B[a]P treatments were performed for 24, 48 and 72 h.

### 2.3. Analysis of NO production in F258 cells

#### 2.3.1. Measurement of intracellular NO by flow cytometry

Intracellular NO was measured by flow cytometry using DAF-FM diacetate. After B[a]P treatment, cells were trypsinized, and stained for 40 min at 37 °C with DAF-FM (5  $\mu$ M) in HEPES-buffered solution for further analysis using a FACScalibur flow cytometer (BD Bioscience). NONOate was used as a positive control for NO production and detection (2.5 mM, 40 min incubation). Each measurement was conducted on 40,000 events in the FL1 (530/30 nm) channel and analyzed with Cell Quest software (BD Bioscience). Live cells were gated according to an FSC/SSC dot plot, by excluding low FSC/SSC events.

#### 2.3.2. iNOS immunostaining & imaging

F258 cells, grown on coverslips, were stained with 40 nM Mitotracker Red during the last 30 min of B[a]P exposure. Cells were next washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min and then washed with PBS. Cells were next pre-incubated with PBS containing 4% bovine serum albumin and 0.4% saponin for 1 h, prior to incubation overnight with 10  $\mu$ g/mL anti-iNOS antibody or with isotype-control. After washing in PBS, cells were incubated for 2 h with secondary Alexa fluor 514 goat anti-rabbit antibody (Life technologies). Samples were digitized with 63 $\times$  or 40 $\times$  fluorescence objectives (Zeiss) on the IX83 inverted microscope (Olympus; Rungis, France) equipped with an ultra-high-speed wavelength switching system Lambda DG4 (Sutter Instrument; Novato, USA) and an ORCA Flash 4.0 CMOS camera (Hamamatsu; Massy, France) using cellSense software (Olympus).

#### 2.3.3. Determination of NO levels by fluorescence microscopy

F258 cells grown on glass coverslip were loaded with 40 nM Mitotracker Red and with 10  $\mu$ M DAF-2/DA during the last 30 min of exposure. After treatment, cells were gently washed twice with HEPES-buffered solution and kept at 37 °C before acquisition. As a negative control, cells were incubated in media lacking DAF-2/DA. Processed cells were digitized with 63 $\times$  or 40 $\times$  fluorescence objectives (Zeiss) as for iNOS immunostaining (see above).

### 2.4. Cell toxicity estimation

#### 2.4.1. Apoptotic cell quantification by fluorescence microscopy

Number of apoptotic cells was evaluated by fluorescence microscopy through counting cells exhibiting chromatin condensation and/or fragmentation following staining with the chromatin dye Hoechst 33342. After treatments, cells were stained with 50  $\mu$ g/mL

Hoechst 33342 in the dark for 30 min at 37 °C. Cells were then examined under fluorescence microscopy (Olympus BX60, France). Total population was always more than 400 cells.

#### 2.4.2. ATP quantification

ATP content was evaluated using a luminescence assay kit based upon the reaction of luciferin with ATP in the presence of luciferase (CellTiter-Glo luminescence cell viability assay, Promega; Charbonnières, France), according to the manufacturer's instructions. The amount of ATP was proportional to the luminescent signal measured with a spectrophotometer (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, France).

#### 2.4.3. Caspase activity assays

The caspase-3/7 activity assays were performed using DEVD-AMC tetrapeptide substrate. Caspase activity was measured through a two hours kinetic monitoring of free AMC release at 37 °C on a Spectramax Gemini XS plate reader (Molecular Devices). Free AMC detection was performed using 380 nm excitation and 440 nm emission wavelength. Briefly, both adherent and floating F258 cells were lysed in the caspase activity buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 7.4, 0.1% Tween, 10% glycerol, 1 mM DTT). Forty µg of crude lysate were then incubated at 37 °C in a caspase assay buffer (20 mM PIPES pH 7.2, 100 mM NaCl, 10% sucrose, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 1 mM dithiothreitol) containing 80 µM of DEVD-AMC. Three independent experiments, performed in triplicate, were carried out for each experimental condition. Enzyme activities were determined as initial velocities and expressed as relative intensity/hour.

#### 2.5. RNA isolation and reverse transcription – real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

Total RNA were isolated from F258 cells using the TRIzol method (Invitrogen) and were then subjected to reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis, as previously described (Podechard et al., 2008). Gene-specific primers for CYP1B1, GADD45, p21 and 18S were purchased from Sigma, and the sequences used for each gene were as follows: CYP1B1: forward, CAGCTTTTGCCTGTACCC – reverse, ATGAAGCCGTCCTGTCCAG; GADD45: forward, AGATCGAAAG GATGGACACGG – reverse: GGTCGTCATTCATCCGCA; p21: forward, CTGGGGAGGGCTTCTTTGT – reverse, GCCTGTTTCTGTCTACTGTTC; 18S: forward, CCGGTACAGTGAAGTCCGA – reverse, GATAAATGCACGCGTCCCC. The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. To assess the successful amplification of each target gene, a standard curve was performed for each primer set. The expression levels of target genes were normalized relative to the expression of an 18S RNA endogenous reference and were given as fold change compared to control with vehicle (DMSO).

#### 2.6. Western blotting

After treatment, cells were harvested and lysed for 20 min on ice in RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. Thirty µg of whole-cell lysates were heated for 5 min at 100 °C, loaded in a 4% stacking gel, and then separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polymerase gel electrophoresis (SDS–PAGE). Gels were electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Millipore). After membrane blocking with a Tris-buffered saline (TBS) solution supplemented with 5% bovine serum albumin, membranes were hybridized with primary

antibodies against p21 or CYP1B1 overnight at 4 °C, and next incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h. For protein loading evaluation, primary antibodies against HSC70 or  $\beta$ -actin were used. Immunolabeled proteins were then visualized by chemiluminescence using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm). Image processing was performed using Multi Gauge software (Fujifilm).

#### 2.7. Determination of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ )

Mitochondrial membrane potential  $\Delta\psi_m$  was measured by flow cytometry using DiOC<sub>6</sub>(3). After treatment, cells were trypsinized, stained for 20 min at 37 °C with DiOC<sub>6</sub>(3) (50 nM) in HEPES-buffered solution, and next analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience). FCCP was used as an uncoupling control (50 µM, 20 min incubation). Each measurement was conducted on 40,000 events in the FL1 (530/30 nm) channel and analyzed with Cell Quest software (BD Bioscience). Live cells were gated according to an FSC/SSC dot plot, by excluding low FSC/SSC events.

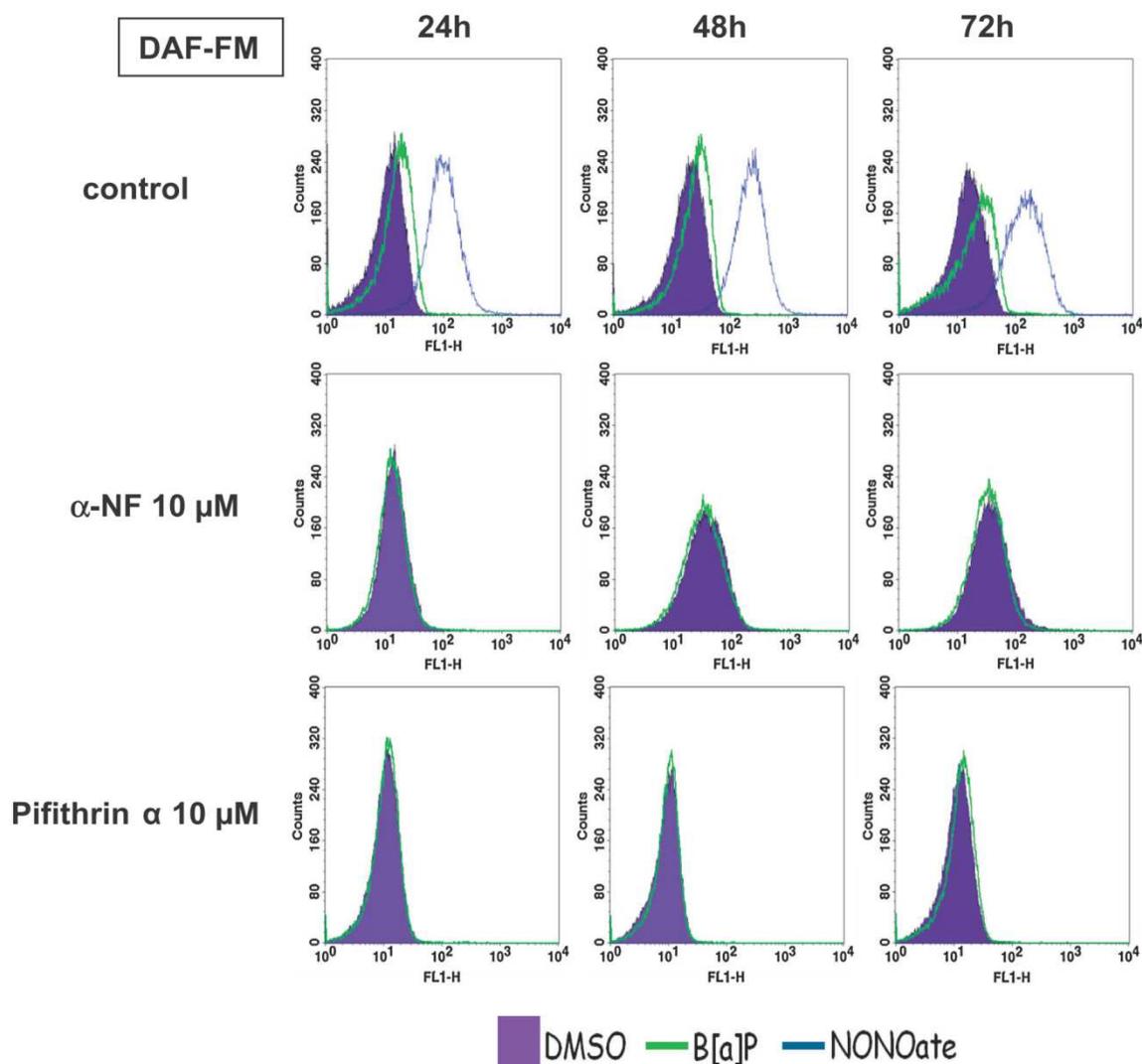
#### 2.8. Statistical analysis

Data were obtained from a minimum of three independent experiments. All data are quoted as mean  $\pm$  SD. Analysis of variance followed by Newman–Keuls test was used to test the effects of B[a]P. Differences were considered significant at the level of  $P < 0.05$ . All statistical analysis were performed using GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software, San Diego, USA).

### 3. Results

#### 3.1. An iNOS-dependent NO production is triggered by B[a]P exposure of F258 rat hepatic epithelial cells, and depends on both AhR and p53

In order to test the effect of B[a]P on endogenous NO, we first used the fluorescent probe DAF-FM and flow cytometry. As shown in Fig. 1, B[a]P induced a rightward shift of the fluorescent peak, like the positive control 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine sodium, 2-(N,N-Diethylamino)-diazene 2-oxide sodium salt hydrate (NONOate), from 24 h, still detected at 72 h, thus indicating an NO production. In order to confirm such a production, another NO-sensitive fluoroprobe, namely DAF2-DA, was also used with detection in fluorescence microscopy. Data in Supplementary Fig. 2A confirm such a result, with the appearance of green fluorescence upon B[a]P, similar to what was observed upon NONOate exposure. To firmly validate the B[a]P-induced NO production and due to the fact that some interference can exist between ROS and DAF-FM (Balcerczyk et al., 2005), exogenous application of known antioxidant molecules, namely superoxide dismutase (SOD)–PEG and catalase–PEG were tested; as shown in Supplementary Fig. 2B, the rightward shift of the DAF-FM fluorescent peak remained unaffected by both compounds, thus validating the B[a]P-induced NO production. We next decided to test the possible involvement of B[a]P metabolism via CYP1 and/or AhR (known to be activated by B[a]P; Nebert et al., 2000), and p53 in the NO production. It is noteworthy that in F258 cells, AhR appeared to be not significantly involved in the regulation of CYP1B1 protein level as previously described (Tekpli et al., 2010a), and confirmed in the present work (Supplementary Fig. 3A). As shown in Fig. 1,  $\alpha$ -naphthoflavone as well as pifithrin- $\alpha$  fully prevented the B[a]P-induced rightward shift of the DAF-FM fluorescent peak, related to NO production. With respect to AhR, Supplementary Fig. 4A clearly showed that the specific inhibitor of AhR, CH223191, prevented the B[a]P-induced



**Fig. 1.** Effects of B[a]P exposure on endogenous nitric oxide (NO) production involves both CYP1-metabolism and/or AhR and p53 activation. In the absence of inhibitors, F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 24, 48 or 72 h (control). When testing inhibitors, F258 cells were pre-treated for 1 h with  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF; 10  $\mu$ M), an inhibitor of both B[a]P-metabolism via CYP1 and AhR, or pifithrin  $\alpha$  (10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, prior to co-exposure to B[a]P (24, 48 and 72 h). Flow cytometry analysis was then performed following cell staining with the fluorophore DAF-FM (as described in Section 2). NONOate (10  $\mu$ M; open blue peak) was used as a positive control for NO production. Histograms of NO production are representative of at least 3 independent experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

NO production. Furthermore, as illustrated in [Supplementary Fig. 4B](#), TCDD, a potent activator of AhR, was also capable of inducing an NO production, thus confirming the involvement of AhR. Finally, as a few studies also suggested a role for  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in the regulation of NO production ([Ishizaki et al., 2008](#)), and as this exchanger has been shown to be activated by B[a]P in F258 cells ([Huc et al., 2004](#)), a possible role for NHE1 was also tested using cariporide. Data in [Supplementary Fig. 5](#) clearly showed that inhibition of NHE1 by cariporide was ineffective toward preventing the B[a]P-induced NO production.

The next set of experiments was performed in order to test the possible involvement of the inducible NO synthase (iNOS) in the B[a]P-induced NO production in F258 cells. To do so, the induction of iNOS upon B[a]P was first studied by immunofluorescence using a primary antibody specifically targeting the iNOS and a secondary fluorescent antibody (see Section 2). As shown in [Fig. 2A](#), a strong induction of iNOS was observed upon B[a]P exposure as soon as 24 h, as visualized by the marked increase of the green

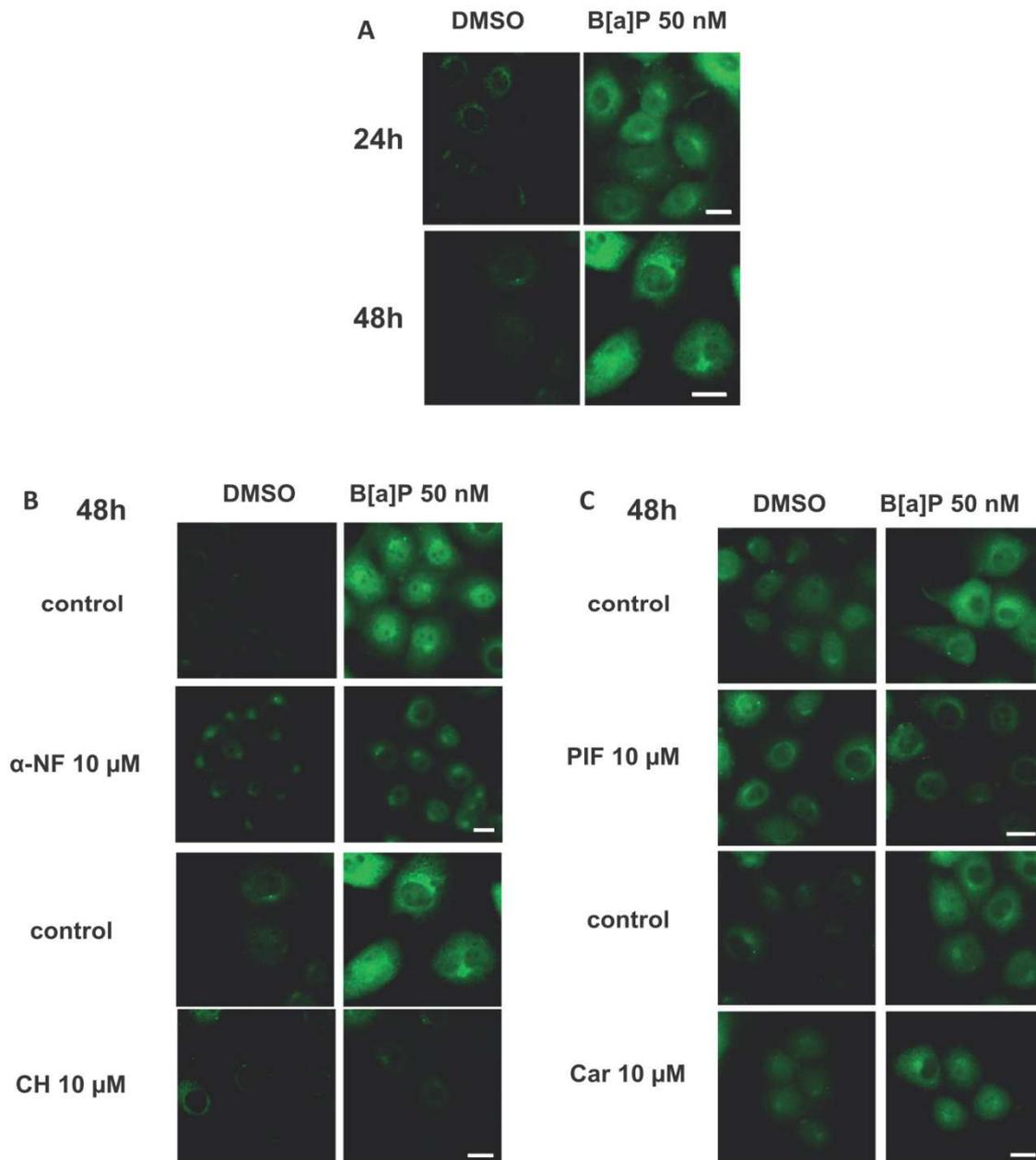
fluorescence in the cytoplasm compared to control cells. Such an effect was also observed after a 48 h exposure.

Regarding the possible mechanisms involved in iNOS induction, similarly to NO production, this induction observed at 48 h was found to be prevented by  $\alpha$ -naphthoflavone, CH223191 (CH; [Fig. 2B](#)) and pifithrin- $\alpha$  (PIF; [Fig. 2C](#)), but remained unaffected by cariporide (Car; [Fig. 2C](#)).

Altogether, these results indicated that B[a]P exposure resulted in an NO production in F258 cells that relied upon an AhR/p53-dependent induction of iNOS.

### 3.2. The B[a]P-induced NO production represents a survival signal which slows down the development of the related cell death

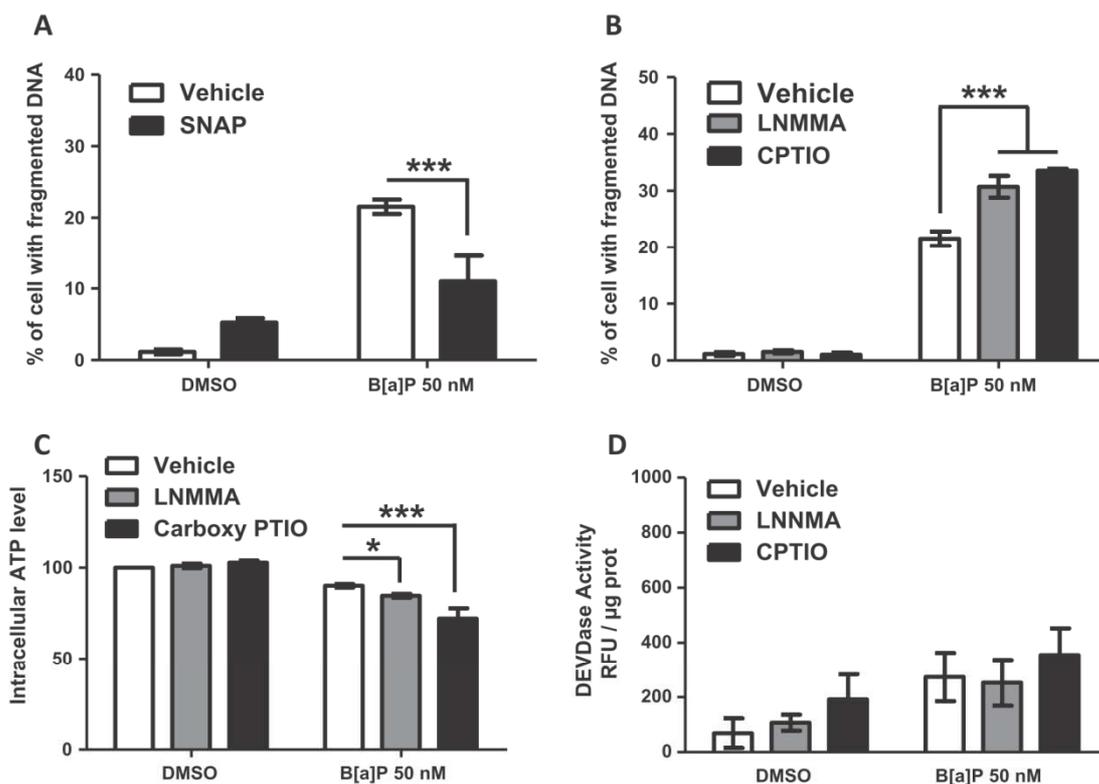
As NO is a known regulator of the balance between cell death and survival ([Choudhari et al., 2013](#); [Burke et al., 2013](#)), we then decided to test the role of NO in the toxic effects induced by B[a]P in F258 cells. First, the effect of an exogenous application



**Fig. 2.** Effects of B[a]P exposure on iNOS levels and involvement of AhR and p53 activations in these effects. F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 24 or 48 h. When testing inhibitors, cells were pre-treated with the inhibitor for 1 h and then co-exposed with B[a]P. (A) Effects of B[a]P on iNOS induction at 24 and 48 h. (B) Effects of AhR inhibition on B[a]P-induced iNOS level using two different inhibitors:  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF; 10  $\mu$ M), an inhibitor of both B[a]P-metabolism via CYP1 and AhR, and CH223191 (CH, 10  $\mu$ M), a specific inhibitor of AhR. (C) Effects of the inhibition of p53 and NHE1 on B[a]P-related iNOS induction using pifithrin  $\alpha$  (PIF, 10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, and cariporide (Car; 10  $\mu$ M), a specific inhibitor of NHE1, respectively. After fixation and permeabilization, immunostaining of cells was performed by incubation of a rabbit monoclonal anti-iNOS antibody followed by an Alexa fluor 514 goat anti-rabbit antibody (as described in Section 2). Cells were then viewed by fluorescence microscopy (magnification 120 $\times$ ). The experiments were repeated 3 times with similar results. Scale bar, 10  $\mu$ m.

of NO, through the use of the NO-donor SNAP (50  $\mu$ M), was tested toward B[a]P-induced apoptosis, as evaluated by Hoechst 33342 staining of the chromatin and cell counting (Fig. 3A). As expected from our previous results, cell exposure to B[a]P (50 nM, 72 h) led to a significant increase of the number of cells with condensed or fragmented chromatin (to  $\sim$ 22%). The presence of SNAP however significantly decreased by about 50% the apoptotic cell number induced by B[a]P exposure. Therefore, application of exogenous NO appeared to be protective. This then led us to test if a similar protection was afforded by the B[a]P-elicited endogenous NO production. As iNOS was induced under our experimental conditions,

we decided to test L-NNMA (500  $\mu$ M), a known inhibitor of NOS, as well as carboxy-PTIO (25  $\mu$ M), an NO scavenger. As shown in Fig. 3B, both compounds significantly enhanced the number of apoptotic cells under B[a]P exposure (by  $\sim$ 50%). This was associated with a further decrease in intracellular ATP level compared to B[a]P alone (Fig. 3C). Finally, as NO has been described to alter caspase activation (Liu and Stampler, 1999), the impact of L-NNMA and carboxy-PTIO on B[a]P-induced caspase 3/7 activation was tested (Fig. 3D). Our data showed that inhibiting NO production did not significantly affect the B[a]P-elicited caspase activation.



**Fig. 3.** B[a]P-induced NO production counteracts the related cell toxicity. F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 72 h. When testing the role of NO, cells were pre-treated for 1 h with (A) the NO-donor SNAP (50 µM), or with (B–D) the NO scavenger carboxy-PTIO (CPTIO, 25 µM) or the NOS inhibitor L-NMMA (500 µM), prior to co-exposure to B[a]P. Following treatments, cell toxicity was evaluated by counting cells with fragmented or condensed chromatin following Hoechst 33342 staining (A and B). In (C), intracellular ATP concentration was evaluated as described in Section 2. (D) Caspase activities (as detected by cleavage of DEVD-AMC) were measured by spectrofluorimetry. Number of experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , B[a]P + NO modulator versus B[a]P-treated cells; \*\*\* $p < 0.001$ , B[a]P + NO modulator versus B[a]P-treated cells.

Taken together, these data suggested that the B[a]P-induced NO production acted as a survival pathway, since its inhibition increased apoptosis independently of caspase 3/7 activation.

### 3.3. The NO-related protective effect does not go through an effect on AhR or p53 activations

In order to test the possible impact of NO on the activation of AhR or p53, we analyzed how specific target genes of AhR and p53 were affected by the presence of the NO donor SNAP or the NO scavenger carboxy-PTIO. Regarding AhR, despite no change of CYP1B1 protein level upon B[a]P (50 nM) exposure (Supplementary Fig. 3A and Tekpli et al., 2010a), we previously found an induction of its mRNA expression in F258 cells (Dendélé et al., 2014). As expected, similar results were presently obtained, and inhibiting AhR by CH223191 reduced CYP1B1 induction, both at 24 and 48 h, therefore indicating a role for AhR in CYP1B1 mRNA induction upon B[a]P 50 nM. However, no marked effect of NO on the B[a]P-related CYP1B1 mRNA induction was observed since carboxy-PTIO and SNAP were ineffective (Fig. 4A). In order to confirm these results, the protein levels of CYP1B1 were evaluated by western blotting. As shown in Fig. 4B, manipulating the intracellular NO did not affect CYP1B1 protein level. Note that despite an effect of pifithrin- $\alpha$  on CYP1B1 mRNA expression (Fig. 4A), no change was detected at the protein level (Fig. 4B). It is also worth noting that in F258 cells, this compound did not prevent early intracellular signals related to B[a]P metabolism such as NHE1 activation (Huc et al., 2007); in this context, this discarded a

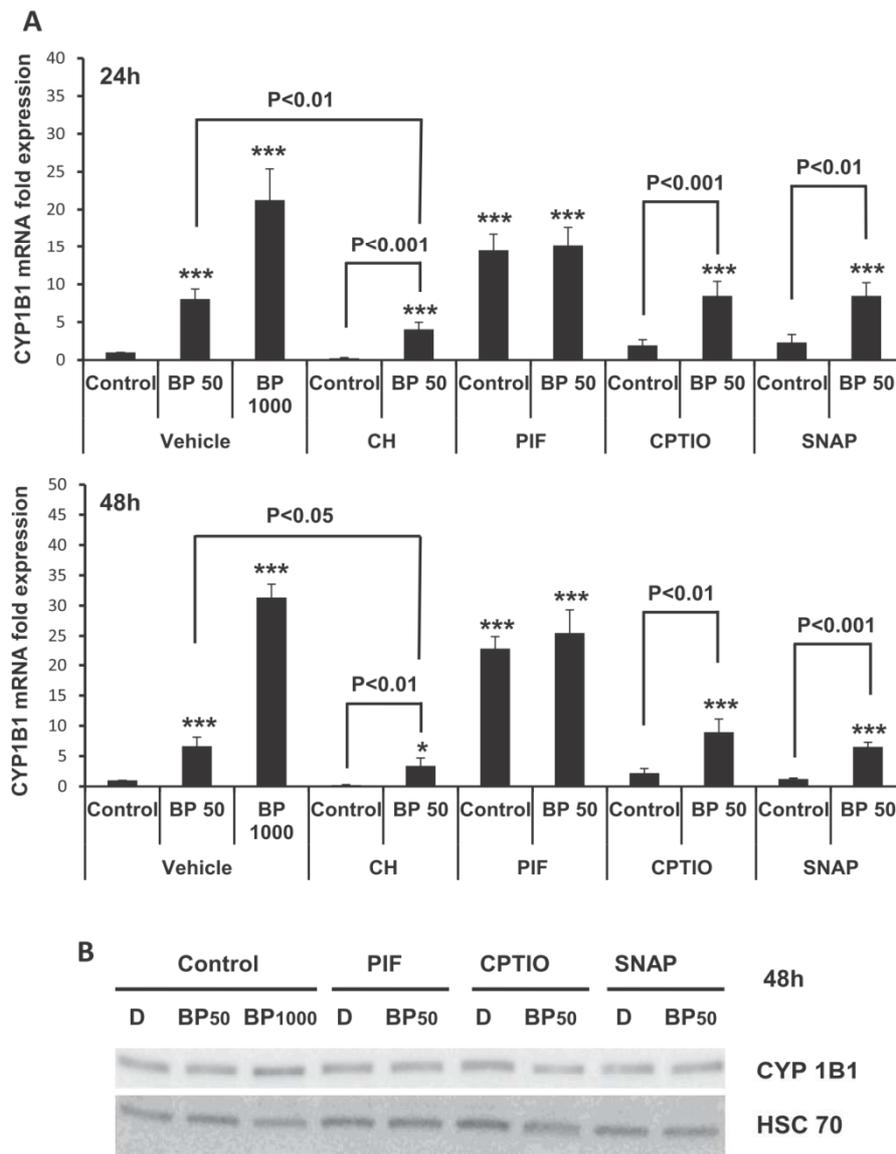
substantial inhibitory effect of pifithrin- $\alpha$  on the CYP1B1 activity in our cell model.

Regarding the p53 activation, the effect of NO on this activation was tested by analyzing the target gene p21. A slight, but significant, induction in the mRNA expression of p21 was thus observed upon B[a]P 50 nM at 24 h (Fig. 5A), with no change at 48 h (Supplementary Fig. 7A), and a clear increase in the level of p21 protein was detected at 48 h (Fig. 5B). Such a difference in the amplitude of effect might stem from the involvement of other p21 regulating mechanisms in F258 cells, such as prevention of the protein degradation (Warfel and El-Deiry, 2013). Nevertheless, it is worth emphasizing that pifithrin- $\alpha$  was capable of preventing the B[a]P-elicited increase in both mRNA and protein levels thus pointing to a role for p53 in the regulation of p21 expression under our experimental conditions. With regard to a potential effect of NO on p53 activation, no marked effect was observed in the presence of CPTIO or SNAP (Fig. 5B). Note that no marked change in GADD45 mRNA expression, another p53 gene target, was also observed following exposure to B[a]P 50 nM when CPTIO or SNAP was tested (Supplementary Fig. 7B).

Taken together, these results indicate that the B[a]P-induced endogenous NO production would not interfere with AhR and p53 activation.

### 3.4. Inhibition of B[a]P-induced NO production prevented the related AhR and p53-dependent mitochondrial membrane hyperpolarization

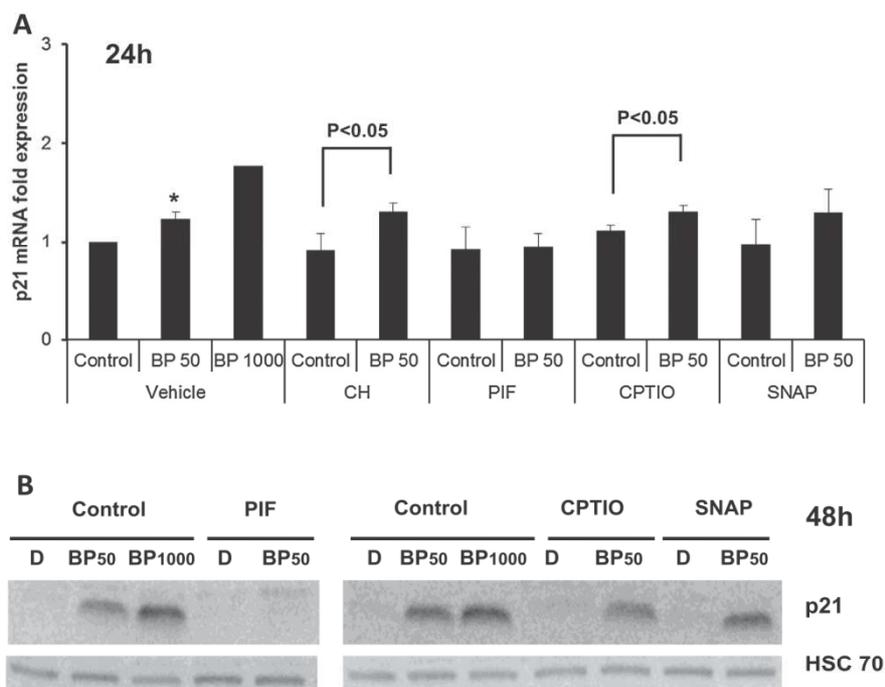
As executive caspases did not seem to be the target of NO, we then decided to focus on mitochondrial membrane potential



**Fig. 4.** Absence of NO effects on the mRNA expression and protein level of CYP1B1 in B[a]P-exposed F258 cells. In the absence of inhibitors or NO modulators, F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM (BP50) or 1  $\mu$ M (BP1000) during 24 h (A) or 48 h (A and B). When testing inhibitors or NO modulators, cells were pre-treated for 1 h with CH223191 (CH, 10  $\mu$ M), a specific inhibitor of AhR, or pifithrin  $\alpha$  (PIF, 10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, or the NO scavenger carboxy-PTIO (CPTIO, 25  $\mu$ M), or the NO-donor SNAP (50  $\mu$ M), prior to co-exposure to B[a]P 50 nM (BP50) for 24 h (A) or 48 h (A and B). After treatments, RT-qPCR analysis of CYP1B1 mRNA expression (A) or western-blotting analysis of CYP1B1 protein level (B) were performed (as described in Section 2). mRNA expression was given relative to control cells with vehicle. Number of experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ : test treatment versus untreated control cells.

( $\Delta\Psi_m$ ). First, the time-course effects of a low concentration of B[a]P (50 nM) was evaluated on the  $\Delta\Psi_m$  of F258 cells. As expected from our previous studies (Huc et al., 2003; Holme et al., 2007), an increase in  $\Delta\Psi_m$  was detected following a 48 h exposure to B[a]P, as visualized by the rightward shift of the DiOC6 fluorescent peak measured by flow cytometry, in contrast to the leftward shift induced by the uncoupler molecule FCCP (50  $\mu$ M) used as positive control for mitochondrial depolarization (Fig. 6A). We further demonstrated here that such a hyperpolarizing effect already occurred from 24 h, and was still observed at 72 h. Using  $\alpha$ -naphthoflavone (10  $\mu$ M), we also showed that B[a]P metabolism and/or AhR activation were involved in this effect on  $\Delta\Psi_m$ , since this inhibitor prevented any shift of the fluorescent peak upon B[a]P (Fig. 6A). As AhR has been previously described to induce mitochondrial hyperpolarization (Tappenden et al., 2011) and appeared to be involved in NO production

(Supplementary Fig. 4A), we next decided to further test the involvement of this receptor under our experimental conditions. As illustrated in Fig. 6A, the specific AhR inhibitor, CH223191 (10  $\mu$ M), markedly inhibited the mitochondrial hyperpolarization, at all exposure times. A role for AhR was also demonstrated using TCDD (10 nM), a very well-known, strong inducer of AhR. Indeed, Supplementary Fig. 6 clearly shows that TCDD led to marked mitochondrial hyperpolarization in F258 cells, starting at 24 h. As we have previously shown that p53, but not NHE1, was involved in mitochondrial hyperpolarization observed following a 48 h exposure to B[a]P (Huc et al., 2003) and in iNOS-dependent NO production (present data), we tested the effects of pifithrin- $\alpha$  (10  $\mu$ M) and cariporide (10  $\mu$ M), two known inhibitors of p53 and NHE1, respectively (Fig. 6B). Whereas cariporide did not prevent the rightward shift of DiOC6 fluorescent peak, pifithrin- $\alpha$  totally inhibited it, whatever the exposure time. This therefore confirms and



**Fig. 5.** Absence of NO effects on the mRNA expression and protein level of p21 in B[a]P-exposed F258 cells. In the absence of inhibitors or NO modulators, F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM (BP50) or 1  $\mu$ M (BP1000) during 24 h (A) or 48 h (B). When testing inhibitors or NO modulators on the p21 mRNA expression (A), cells were pre-treated for 1 h with CH223191 (CH, 10  $\mu$ M), a specific inhibitor of AhR, or pifithrin  $\alpha$  (PIF, 10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, or the NO scavenger carboxy-PTIO (CPTIO, 25  $\mu$ M), or the NO-donor SNAP (50  $\mu$ M), prior to co-exposure to B[a]P 50 nM (BP50) for 48 h. When looking at the p21 protein level (B), similar exposures were carried out. After treatments, RT-qPCR analysis of CYP1B1 mRNA expression (A) or western-blotting analysis of CYP1B1 protein level (B) were performed (as described in Section 2). mRNA expression was given relative to control cells with vehicle. Number of experiments  $\geq 3$  for all conditions, except for B[a]P 1  $\mu$ M ( $n = 2$ ). \* $p < 0.05$ : test treatment versus untreated control cells.

extends our previous data (Huc et al., 2003). Work by Nagy's group has previously described a role for NO in the mitochondrial hyperpolarization that occurred during T cell activation (Nagy et al., 2003). As B[a]P was presently shown to induce an endogenous NO production, we then decided to test the involvement of NO in the related hyperpolarization. To do so, the NO scavenger carboxy-PTIO (25  $\mu$ M) was tested (Fig. 6C). Our results clearly showed that such a manoeuvre markedly prevented mitochondrial hyperpolarization, whatever the exposure time. It is also worth noting that the TCDD-induced NO production was correlated with mitochondrial hyperpolarization (Supplementary Fig. 4B).

These results therefore pointed to mitochondrial membrane hyperpolarization as a target for the B[a]P-elicited, iNOS-dependent endogenous NO production.

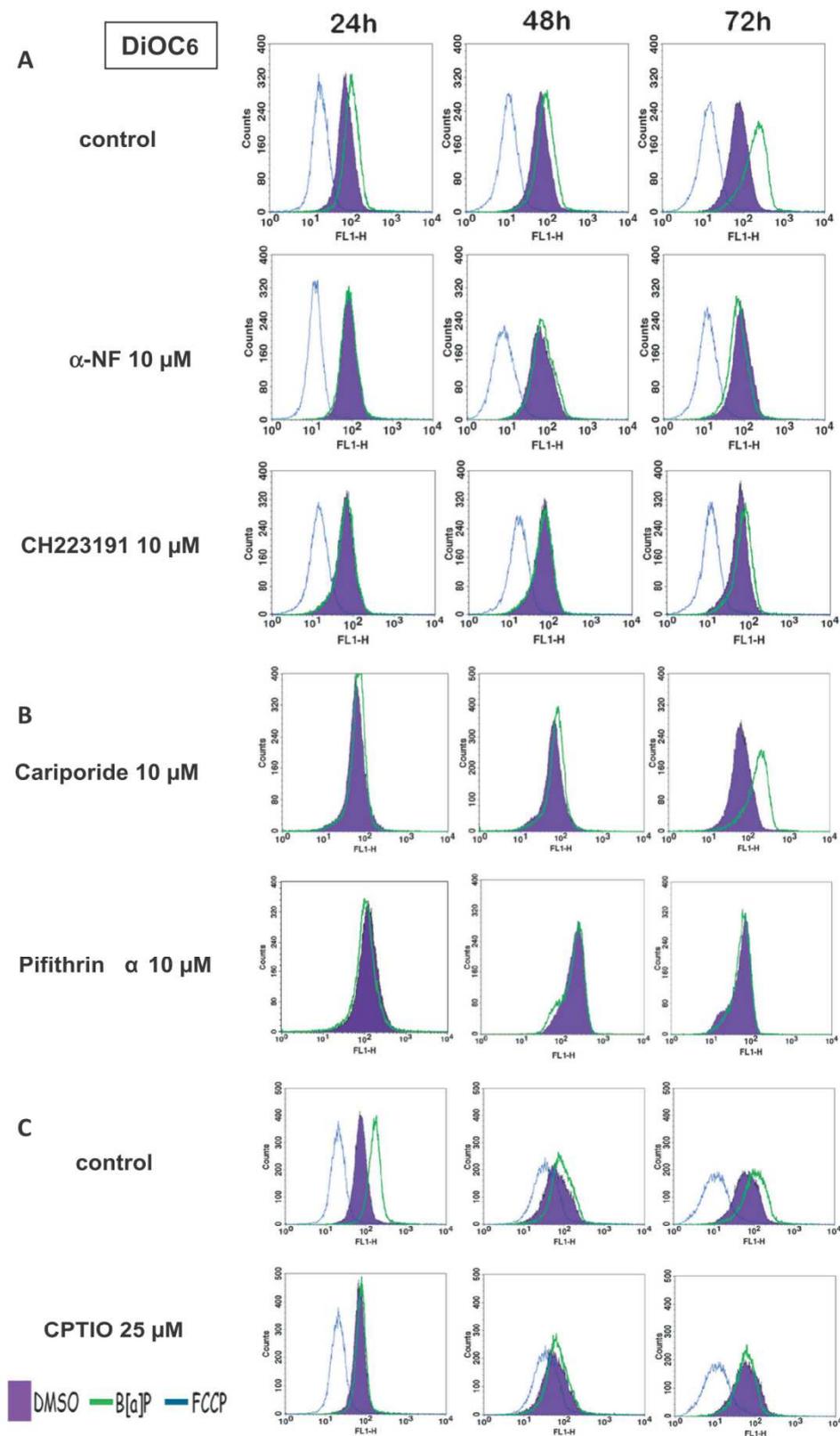
#### 4. Discussion

Benzo[a]pyrene, a widespread environmental carcinogen notably found in cigarette smoke, exhaust fumes and grilled meat, induces cancer in multiple organs, including liver (Wester et al., 2012), and has recently been classified as a human carcinogen from group 1 by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2010). Although this xenobiotic has been shown to affect the different steps of tumor development (i.e. initiation, promotion, progression), the intracellular signaling pathways involved remain to be precisely determined. Our previous work has evidenced a p53-dependent increase in  $\Delta\Psi_m$  in B[a]P-treated F258 rat hepatic epithelial cells (Huc et al., 2003). As an increase in  $\Delta\Psi_m$  has been related to tumor phenotype (Heerdt et al., 2006), and due to the fact that NO is both a regulator of  $\Delta\Psi_m$  (Beltrán et al., 2002; Nagy et al., 2003) and a pro-survival signal during carcinogenesis

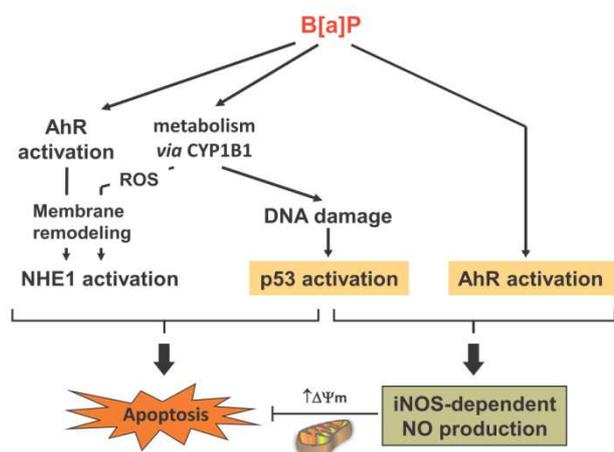
(Choudhari et al., 2013), we then hypothesized that NO might constitute a survival signal upon B[a]P exposure via targeting  $\Delta\Psi_m$ . In the present study, we demonstrate that, in F258 cells, B[a]P exposure induces an endogenous NO production dependent on AhR, and possibly on p53. Furthermore, we show, for the first time to our knowledge, that the B[a]P-elicited, iNOS-dependent NO production may play an important role as a survival signal following PAH exposure, likely by acting on  $\Delta\Psi_m$  (Fig. 7).

An NO production upon B[a]P has already been described both *in vivo* and *in vitro*. Thus, regarding the *in vivo*, it has been shown from blood collected from rats treated for two weeks with B[a]P, that this PAH was responsible for an increase in nitrite content used as a marker of NO production (Kumar et al., 2006). With respect to *in vitro* data, B[a]P was found to lead to a time (3–24 h)- and dose-dependent release of NO from microglial cells, with a significant effect detected from 20 nM B[a]P following a 24 h-treatment (Dutta et al., 2010). In the present study, a NO production was also induced by a low concentration of B[a]P (50 nM) in hepatic cells; in addition we further showed that such a production was maintained following a longer exposure time, since still detected following 72 h. Such a long-term *in vitro* effect might thus corroborate what has been previously described *in vivo* (Kumar et al., 2006). An upregulation of iNOS expression in polymorphonuclear leukocytes, which appeared to be dependent on cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) expression, has been put forward to explain the B[a]P-induced NO production (Kumar et al., 2006). Such an involvement of iNOS was also reported in microglial cells, with an increase in enzyme protein level as soon as 3 h of exposure with 0.2  $\mu$ M B[a]P (Dutta et al., 2010). Induction of iNOS, especially at the protein level, was also detected in B[a]P-treated F258 cells.

As AhR and p53 are both involved in B[a]P effects in F258 cells, we then wanted to know if they were involved in NO production



**Fig. 6.** B[a]P-induced mitochondrial hyperpolarization ( $\Delta\Psi_m$ ) relies upon the activation of both AhR and p53, and on the endogenous NO production. In the absence of inhibitors, F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 24, 48 or 72 h (control) (A–C). When testing inhibitors or NO modulator, (A) cells were pre-treated for 1 h with  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF; 10  $\mu$ M), an inhibitor of both B[a]P-metabolism via CYP1 and AhR, or CH223191 (10  $\mu$ M), a specific inhibitor of AhR, or (B) for 1 h with cariporide (10  $\mu$ M), a specific inhibitor of NHE1, or pifithrin  $\alpha$  (10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, or (C) for 1 h with the NO scavenger carboxy-PTIO (CPTIO, 25  $\mu$ M), prior to co-exposure to B[a]P 50 nM (24, 48 and 72 h). After treatments, flow cytometry analysis was performed following cell staining with the fluoroprobe DiOC<sub>6</sub>(3) (as described in Section 2). FCCP (50  $\mu$ M; open blue peak) was used as a positive control for mitochondrial membrane depolarization (A and C). Histograms of  $\Delta\Psi_m$  are representative of at least 3 independent experiments for all conditions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 7.** A proposed model for the B[a]P-induced endogenous NO production and its implication as a survival signal in F258 rat hepatic epithelial cells. B[a]P metabolism via the constitutively expressed CYP1B1 leads to the activation of NHE1 transporter and p53 pathway, both triggering apoptotic cell death. Note that AhR activation by B[a]P, along with the reactive oxygen species (ROS) production related to CYP metabolism, has been shown to be involved in NHE1 activation, by acting on membrane remodeling (Tekpli et al., 2010a). In parallel, both AhR and p53 activations induce iNOS expression, thereby resulting in an endogenous NO production. Such a production hampers the cell death development, likely by hyperpolarizing mitochondrial membrane.

and iNOS induction upon B[a]P. We found that both CH223191 (AhR inhibitor) and pifithrin- $\alpha$  (p53 inhibitor) prevented both the iNOS induction and NO production. With respect to AhR, a recent study also indicated a role for this receptor in the iNOS induction detected in lungs infected by influenza virus, likely through a paracrine mechanism; indeed, whereas AhR was activated in endothelial cells, iNOS induction was observed both in epithelial cells and macrophages, therefore suggesting the involvement of an iNOS regulator released by endothelial cells (Wheeler et al., 2013). In our experiments, as only one cell type exists in F258 cell line, such a paracrine mechanism would be unlikely to occur. A possible transcriptional regulation of iNOS by AhR might be put forward, especially as two putative AhRE within the *inos* promoter might exist (Wheeler et al., 2013). Although NO is well described as targeting the tumor suppressor p53 notably by affecting its protein stability (Muntané and De la Mata, 2010), our present data also suggested a possible role for p53 in the regulation of iNOS; furthermore, no change in the p53 activation upon NO modulation was observed (Fig. 5 and Supplementary Fig. 7). A p53-dependent iNOS regulation has been previously reported in primary normal human fibroblasts, but in that case, p53 was shown to be a negative regulator, through inhibition of the iNOS promoter (Forrester et al., 1996). Further experiments will then be necessary to explain these contradictory results, especially as an unspecific effect was recently proposed for the inhibition by pifithrin- $\alpha$  of the lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophage-like cells (Mendjargal et al., 2013).

Several studies have reported the ambivalent role of NO in the regulation of cell functions. Indeed, depending on diverse parameters (intracellular concentration, chemical redox environment, duration of exposure), NO can exert either cytoprotection or cytotoxicity (Burke et al., 2013). Regarding the role for NO in the cell response induced by B[a]P, our data clearly indicate a role for endogenous NO production as a survival signal in hepatic cells. Indeed, preventing NO production by carboxy-PTIO (NO scavenger) or L-NMMA (iNOS inhibitor) was found to exacerbate the B[a]P-induced death in F258 cells. It is also noteworthy that exogenous application of a NO donor resulted in a decrease of

B[a]P-induced cell death; this thus corroborates previous results showing a protective effect of gaseous NO toward B[a]P-induced human lung fibroblast cell apoptosis (Chen et al., 2005a). Such a cytoprotective role for endogenous NO in liver cells has been previously demonstrated, for example in the context of the TGF $\beta$ -induced apoptosis in mouse hepatocytes; indeed, this apoptosis was inhibited by the iNOS-related endogenous NO produced upon interleukin 1 $\beta$ /interferon  $\gamma$  exposure (Pan et al., 2009). Likewise, endogenous NO was shown to exhibit possible beneficial effects in liver during TNF-induced shock in mice; indeed, co-treating mice with both TNF and L-NAME (the NOS inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester) or using iNOS<sup>-/-</sup> mice led to a marked sensitization for TNF liver toxicity (Cauwels and Brouckaert, 2007).

Regarding the role of NO as an inhibitor of cell death, various

intracellular mechanisms have been evidenced. Thus, Chen and coworkers have previously shown that the repressive effect of NO on B[a]P-induced cell apoptosis in human lung fibroblast involves inhibition of JNK1 activation (Chen et al., 2005a). Based upon the fact that inhibiting the B[a]P-induced JNK activation was previously found to result in an inhibition of the related apoptosis in F258 cells (Huc et al., 2007), a role for JNK in the protective effect of NO presently detected appears unlikely. Numerous works have shown that NO can inhibit apoptosis by affecting the expression/activity of diverse pro- or anti-apoptotic proteins. Notably, it has been reported that NO either increased the content of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in rat aortic endothelial cells exposed to cytokines, or reduced the up-regulation of the pro-apoptotic protein Bax upon UVA exposure (Liu and Stamler, 1999). Such a regulation is unlikely to occur under our experimental conditions since no change in Bcl-2 and Bax protein content was observed upon B[a]P compared to untreated cells (unpublished data). An effect of NO on the activity of caspase-3, a well-known effector protease of apoptosis, might have also been a clue since the activity of this enzyme has been shown to be inhibited by NO through an S-nitrosation in endothelial cells; such an inhibition then hampered the TNF $\alpha$ - or serum depletion-induced apoptosis (Haendeler et al., 1997). However such a mechanism has to be ruled out in the present study since no further increase in the B[a]P-induced caspase activity was detected in the presence of CPTIO or L-NMMA. As B[a]P has been previously shown to elicit both caspase-dependent and -independent pathways in F258 cells (Huc et al., 2006), it therefore seems that the protective effect of NO in B[a]P-treated F258 cells might stem from the regulation of caspase-independent pathways. NO is known to exhibit anti-oxidant properties by itself or to favor the expression of anti-oxidant molecules (Cauwels and Brouckaert, 2007). In this context and as oxidative stress plays an important role in the activation of the caspase-independent apoptotic pathway in F258 cells exposed to B[a]P through lysosome damage (Huc et al., 2006; Gorria et al., 2008), the NO effect presently detected might have involved a protection toward oxidative stress. Nevertheless, data on the effects of CPTIO and L-NMMA on lipid peroxidation were not conclusive, at least at 48 h (data not shown). Furthermore, if NO anti-oxidant properties would have occurred, co-treating cells with B[a]P and SOD- or catalase-PEG should have led to an enhancement of NO level (Supplementary Fig. 2B). A mere explanation for the effects of endogenous NO toward B[a]P-induced toxicity might also have been through an impact on AhR or p53 activation. As shown in Figs. 4 and 5, such a hypothesis was ruled out since no change in the B[a]P-induced p21 or CYP1B1 expression was detected upon CPTIO or SNAP co-exposure. Finally, one might hypothesize that mitochondrial hyperpolarization would play an important role in the cell protection signaling afforded by the NO protection. Regarding that point, the present study

clearly showed that the B[a]P-induced mitochondrial membrane hyperpolarization, which was found to rely upon both AhR and p53, but not NHE1, was prevented when using CPTIO. This therefore clearly indicated that  $\Delta\Psi_m$  was a target of endogenous NO in our cell model. It is worth noting that mitochondrial hyperpolarization has been related to alterations of the oxidative phosphorylation, evidenced by a decrease in cell respiration (Forkink et al., 2014), with concomitant stimulation of glycolysis in order to maintain ATP production (Sánchez-Cenizo et al., 2010). A similar link between reduced mitochondrial activity and shift toward glycolysis due to NO has been previously reported, for example in ovarian cancer cells (Caneba et al., 2014; Chang et al., 2015). The involvement of such a metabolic reprogramming upon B[a]P is currently under investigation and should allow unraveling the mechanisms underlying the NO brake effect toward B[a]P-induced apoptosis.

In conclusion, our study points to an important role for the endogenous NO production as a survival signal in B[a]P-exposed hepatic cells, likely through mitochondrial hyperpolarization. The evidence of a protective role for NO production toward B[a]P-elicited cell death, along with the known effects of NO on DNA damage and DNA repair (Mikhailenko and Muzalov, 2013; Tang et al., 2013), might contribute to the carcinogenesis induced by B[a]P in liver.

### Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

### Acknowledgements

We wish to thank Drs. Aubin Penna and Kenji Shoji for their scientific advice on fluorescence imaging, and Dr. Doris Cassio for karyotyping experiments. KH was a recipient of a fellowship from French Ministry for Education and Research. We wish to thank the Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques de Rennes (University of Rennes 1) for financial support to KH, and the Ligue Nationale contre le Cancer (committees 22, 35, 49, 85) and the French National Academy of Medicine for financial support to our work.

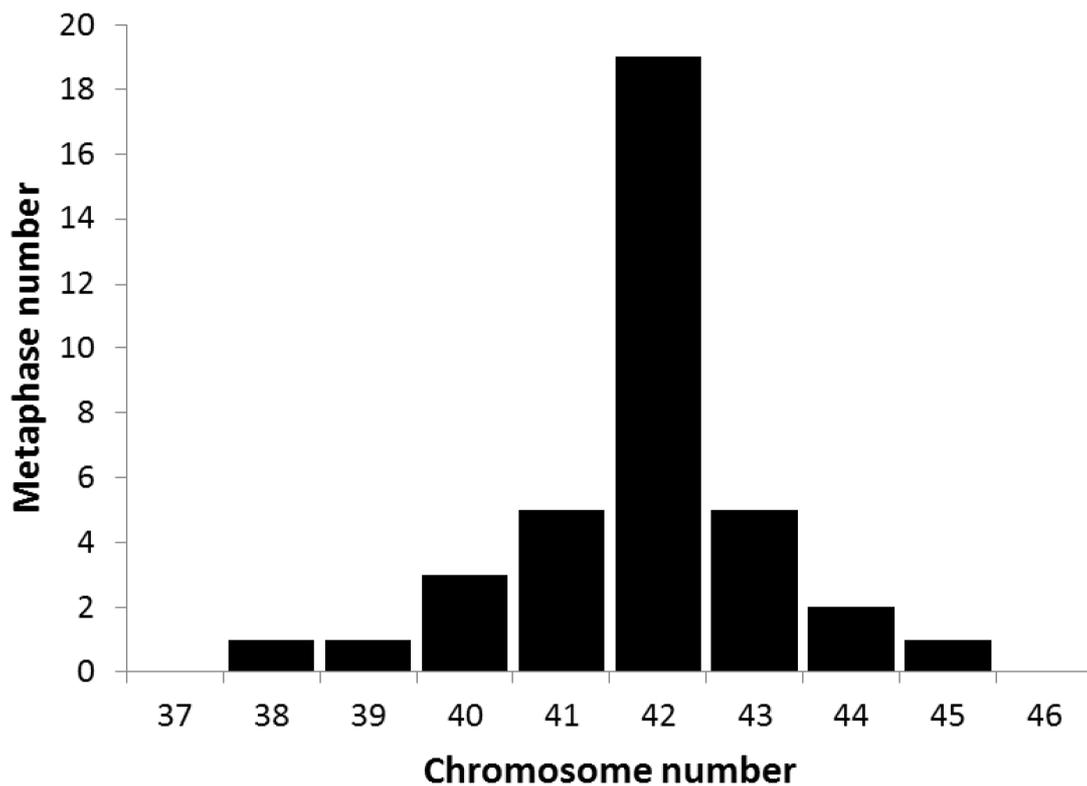
### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.010>.

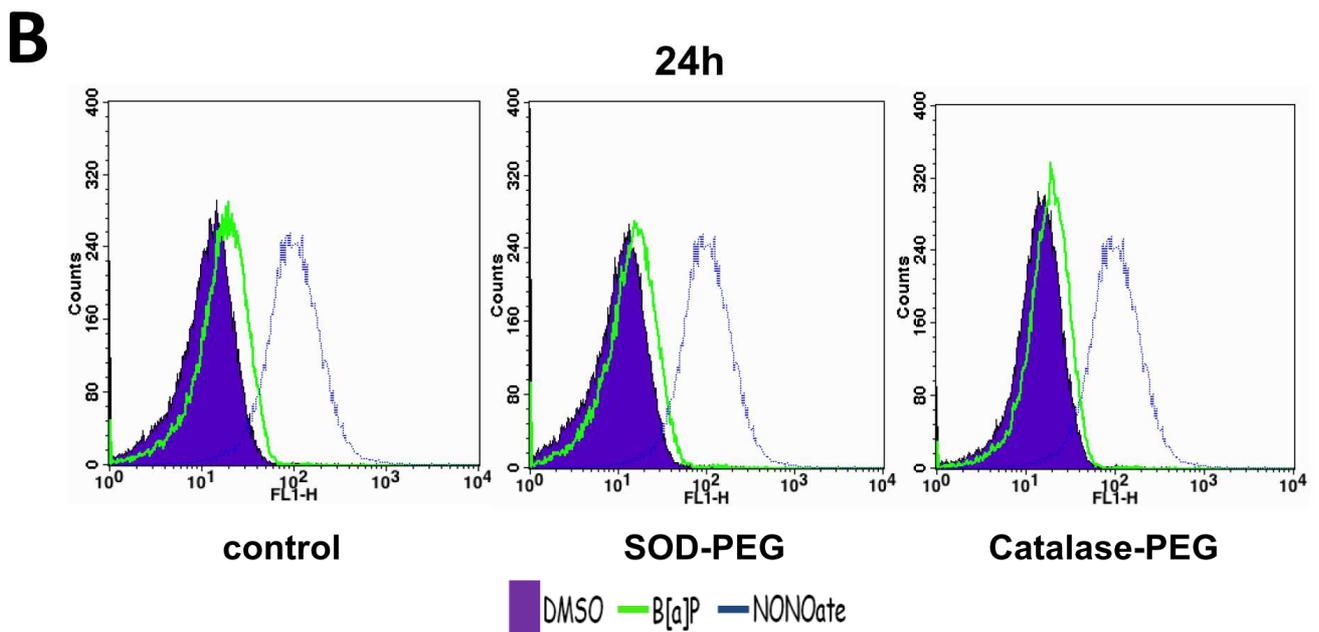
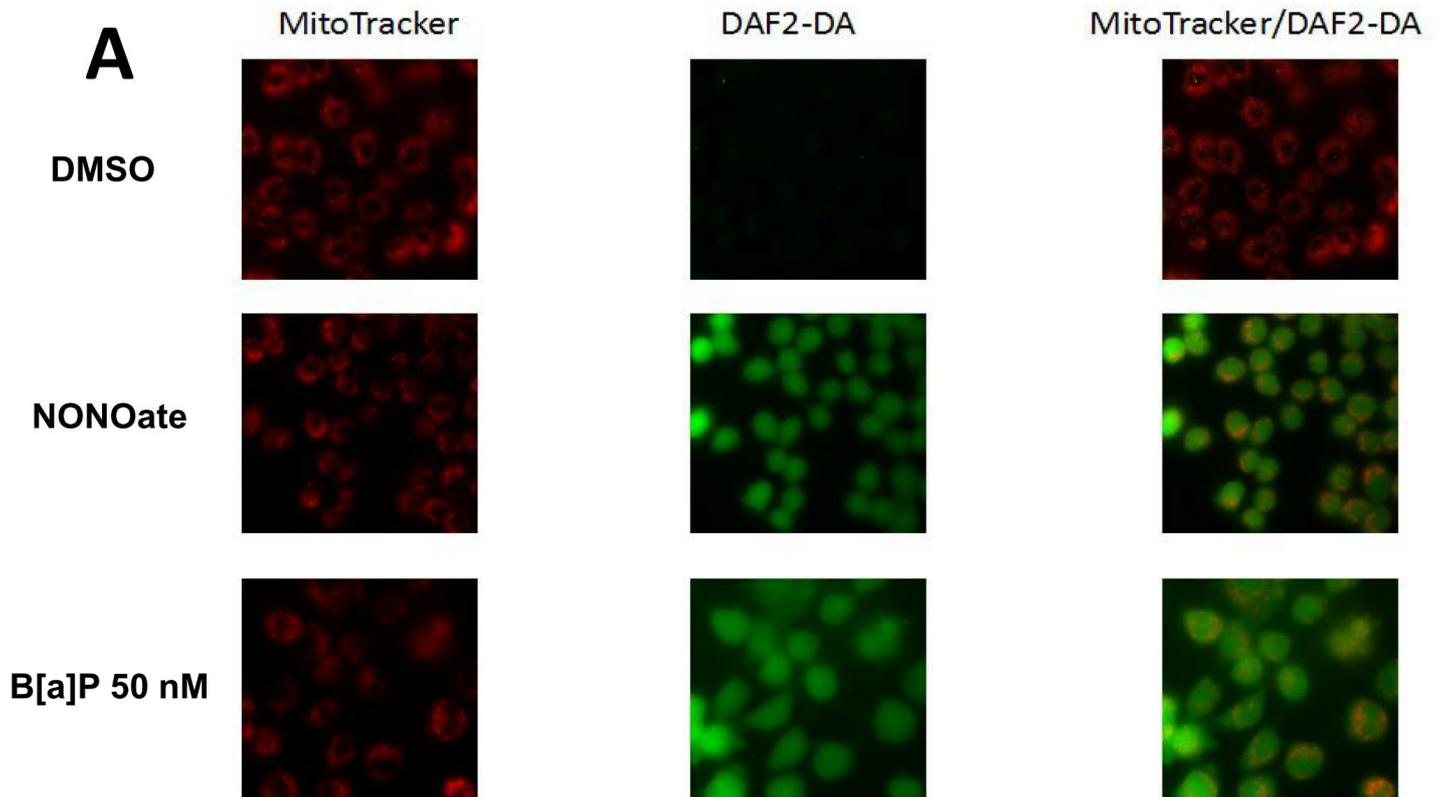
### References

- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114.
- Balcerczyk, A., Soszynski, M., Bartosz, G., 2005. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 327–335.
- Beltrán, B., Quintero, M., García-Zaragoza, E., O'Connor, E., Esplugues, J.V., Moncada, S., 2002. Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8892–8897.
- Burke, A.J., Sullivan, F.J., Giles, F.J., Glynn, S.A., 2013. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* 34, 503–512.
- Caneba, C.A., Yang, L., Baddour, J., Curtis, R., Win, J., Hartig, S., Marini, J., Nagrath, D., 2014. Nitric oxide is a positive regulator of the Warburg effect in ovarian cancer cells. *Cell. Death Dis.* 5, e1302.
- Cauwels, A., Brouckaert, P., 2007. Survival of TNF toxicity: dependence on caspases and NO. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 132–139.
- Chang, C.F., Diers, A.R., Hogg, N., 2015. Cancer cell metabolism and the modulating effects of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 79, 324–336.
- Chen, J.H., Chou, F.P., Lin, H.H., Wang, C.J., 2005a. Gaseous nitrogen oxide repressed benzo[a]pyrene-induced human lung fibroblast cell apoptosis via inhibiting JNK1 signals. *Arch. Toxicol.* 79, 694–704.
- Chen, J., Yan, Y., Li, J., Ma, Q., Stoner, G.D., Ye, J., Huang, C., 2005b. Differential requirement of signal pathways for benzo[a]pyrene (B[a]P)-induced nitric oxide synthase (iNOS) in rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis* 26, 1035–1043.
- Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbail, A.R., Joshi, V., 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* 11, 118.
- Collin, A., Hardonnière, K., Chevanne, M., Vuillemin, J., Podechard, N., Burel, A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossman, D., Sergent, O., 2014. Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 11–22.
- Dendel, B., Tekpli, X., Hardonnière, K., Holme, J.A., Debure, L., Catheline, D., Arlt, V.M., Nagy, E., Phillips, D.H., Ovrebø, S., Møllerup, S., Poët, M., Chevanne, M., Rioux, V., Dimanche-Boitrel, M.T., Sergent, O., Lagadic-Gossman, D., 2014. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. *Chem. Biol. Interact.* 207, 41–51.
- Dutta, K., Ghosh, D., Nazmi, A., Kumawat, K.L., Basu, A., 2010. A common carcinogen benzo[a]pyrene causes neuronal death in mouse via microglial activation. *PLoS One* 5, e9984.
- Forkink, M., Manjeri, G.R., Liemburg-Apers, D.C., Nibbeling, E., Blanchard, M., Wojtala, A., Smeitink, J.A., Wieckowski, M.R., Willems, P.H., Koopman, W.J., 2014. Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex I inhibition is sustained by low activity of complex II, III, IV and V. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1247–1256.
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felley-Bosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R., Harris, C.C., 1996. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2442–2447.
- Gorria, M., Tekpli, X., Rissel, M., Sergent, O., Huc, L., Landvik, N., Fardel, O., Dimanche-Boitrel, M.T., Holme, J.A., Lagadic-Gossman, D., 2008. A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo[a]pyrene in hepatic epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 212–224.
- Haendeler, J., Weiland, U., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 1997. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide* 1, 282–293.
- Heerd, B.G., Houston, M.A., Augenlicht, L.H., 2006. Growth properties of clonic tumor cells are a function of the intrinsic mitochondrial membrane potential. *Cancer Res.* 66, 1591–1596.
- Holme, J.A., Gorria, M., Arlt, V.M., Ovrebø, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N.E., Huc, L., Fardel, O., Lagadic-Gossman, D., 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem. Biol. Interact.* 167, 41–55.
- Huc, L., Gilot, D., Gardyn, C., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Guillouzo, A., Fardel, O., Lagadic-Gossman, D., 2003. Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells: role of p53 and pHi changes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 167–170.
- Huc, L., Sparfel, L., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Guillouzo, A., Fardel, O., Lagadic-Gossman, D., 2004. Identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J.* 18, 344–346.
- Huc, L., Rissel, M., Solhaug, A., Tekpli, X., Gorria, M., Torriglia, A., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossman, D., 2006. Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J. Cell. Physiol.* 208, 527–537.
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossman, D., 2007. C-Jun NH2-terminal kinase-related Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1696–1705.
- IARC, 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 92, 1–853.
- Ishizaki, M., Kaibori, M., Uchida, Y., Hijikawa, T., Tanaka, H., Ozaki, T., Tokuhara, K., Matsui, K., Kwon, A.H., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Okumura, T., 2008. Protective effect of FR183998, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor, and its inhibition of iNOS induction in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Shock* 30, 311–317.
- Kumar, A., Patel, S., Gupta, Y.K., Singh, M.P., 2006. Involvement of endogenous nitric oxide in myeloperoxidase mediated benzo(a)pyrene induced polymorphonuclear leukocytes injury. *Mol. Cell. Biochem.* 286, 43–51.
- Liu, L., Stamler, J.S., 1999. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ.* 6, 937–942.
- Mendjargal, A., Odkhui, E., Koide, N., Nagata, H., Kurokawa, T., Nonami, T., Yokochi, T., 2013. Pifithrin- $\alpha$ , a pharmacological inhibitor of p53, downregulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production via impairment of the MyD88-independent pathway. *Int. Immunopharmacol.* 15, 671–678.
- Mikhailenko, V.M., Muzalov, I.I., 2013. Exogenous nitric oxide potentiates DNA damage and alter DNA repair in cells exposed to ionising radiation. *Exp. Oncol.* 35, 318–324.

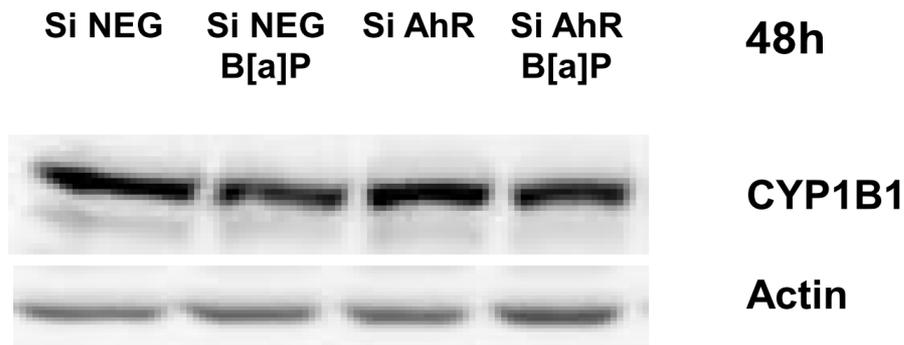
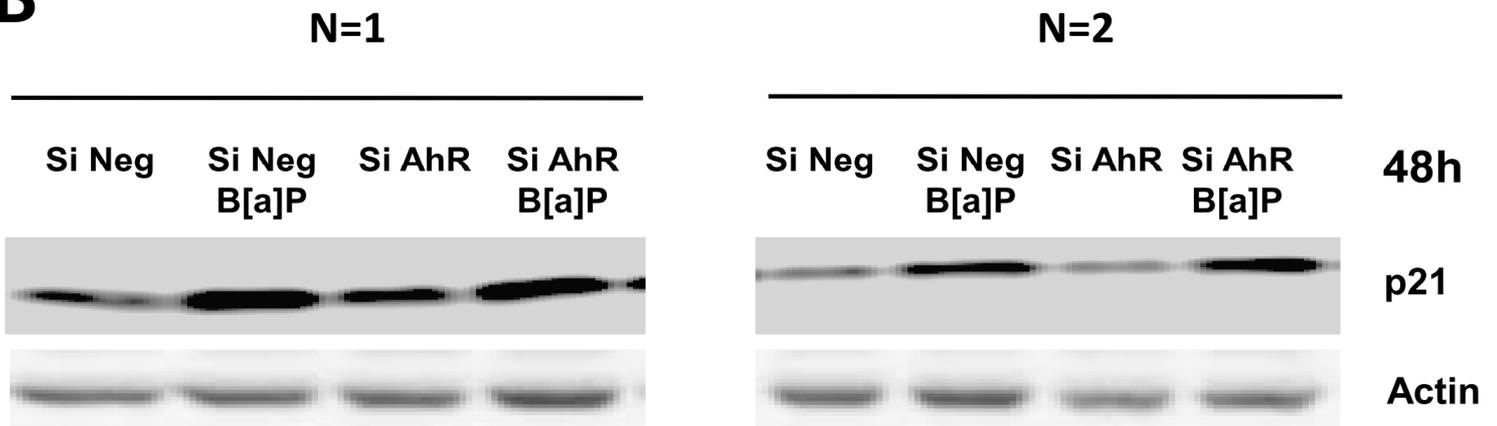
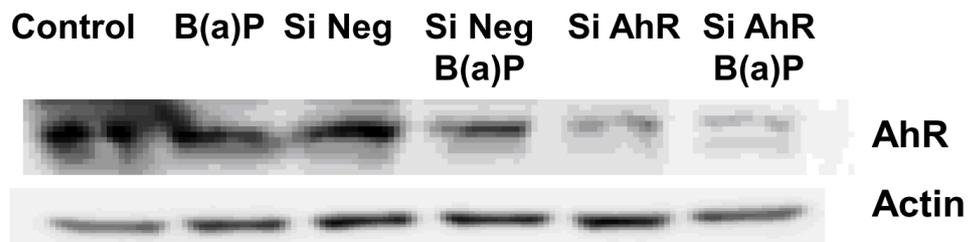
- Morel-Chany, E., Guillouzo, C., Trincal, G., Szajnert, M.F., 1978. "Spontaneous" neoplastic transformation in vitro of epithelial cell strains of rat liver: cytology, growth and enzymatic activities. *Eur. J. Cancer* 14, 1341–1352.
- Morel-Chany, E., Lafarge-Frayssinet, C., Trincal, G., 1985. Progression of spontaneous malignant transformation of epithelial rat liver cell lines. *Cell. Biol. Toxicol.* 1, 11–22.
- Muntané, J., De la Mata, M., 2010. Nitric oxide and cancer. *World J. Hepatol.* 2, 337–344.
- Nagy, G., Koncz, A., Perl, A., 2003. T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by  $Ca^{2+}$ - and redox-dependent production of nitric oxide. *J. Immunol.* 171, 5188–5197.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85.
- Pan, X., Wang, X., Lei, W., Min, L., Yang, Y., Wang, X., Song, J., 2009. Nitric oxide suppresses transforming growth factor-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology* 50, 1577–1587.
- Payen, L., Courtois, A., Langouët, S., Guillouzo, A., Fardel, O., 2001. Unaltered expression of multidrug resistance transporters in polycyclic aromatic hydrocarbon-resistant rat liver cells. *Toxicology* 156, 109–117.
- Podechard, N., Lecureur, V., Le Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., Gordon, J.R., Lagente, V., Fardel, O., 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* 177, 130–137.
- Salas, V.M., Burchiel, S.W., 1998. Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 367–376.
- Sánchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A.D., García-Huerta, P., Sánchez-Aragó, M., Cuezva, J.M., 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 25308–25313.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Låg, M., Schwarze, P.E., Husøy, T., Holme, J.A., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809–819.
- Tang, C.H., Wei, W., Hanes, M.A., Liu, L., 2013. Hepatocarcinogenesis driven by GSNOR deficiency is prevented by iNOS inhibition. *Cancer Res.* 73, 2897–2904.
- Tappenden, D.M., Lynn, S.G., Crawford, R.B., Lee, K., Vengellur, A., Kaminski, N.E., Thomas, R.S., LaPres, J.J., 2011. The aryl hydrocarbon receptor interacts with ATP5 $\alpha$ 1, a subunit of the ATP synthase complex, and modulates mitochondrial function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254, 299–310.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D., 2010a. Membrane remodeling, an early event in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 68–76.
- Tekpli, X., Rivedal, E., Gorria, M., Landvik, N.E., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Baffet, G., Holme, J.A., Lagadic-Gossmann, D., 2010b. The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 231–240.
- Wang, Q., Chen, W., Xu, X., Li, B., He, W., Padilla, M.T., Jang, J.H., Nyunoya, T., Amin, S., Wang, X., Lin, Y., 2013. RIP1 potentiates BPDE-induced transformation in human bronchial epithelial cells through catalase-mediated suppression of excessive reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 34, 2119–2128.
- Warfel, N.A., El-Deiry, W.S., 2013. P21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 52–58.
- Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., Nicol, C.J., Parman, T., Winn, L.M., 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res.* 396, 65–78.
- Wester, P.W., Muller, J.J., Slob, W., Mohn, G.R., Dortant, P.M., Kroese, E.D., 2012. Carcinogenic activity of benzo(a)pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 50, 927–935.
- Wheeler, J.L., Martin, K.C., Lawrence, B.P., 2013. Novel cellular targets of AhR underlie alterations in neutrophilic inflammation and inducible nitric oxide synthase expression during influenza virus infection. *J. Immunol.* 190, 659–668.
- Zedeck, M.S., 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3, 537–567.



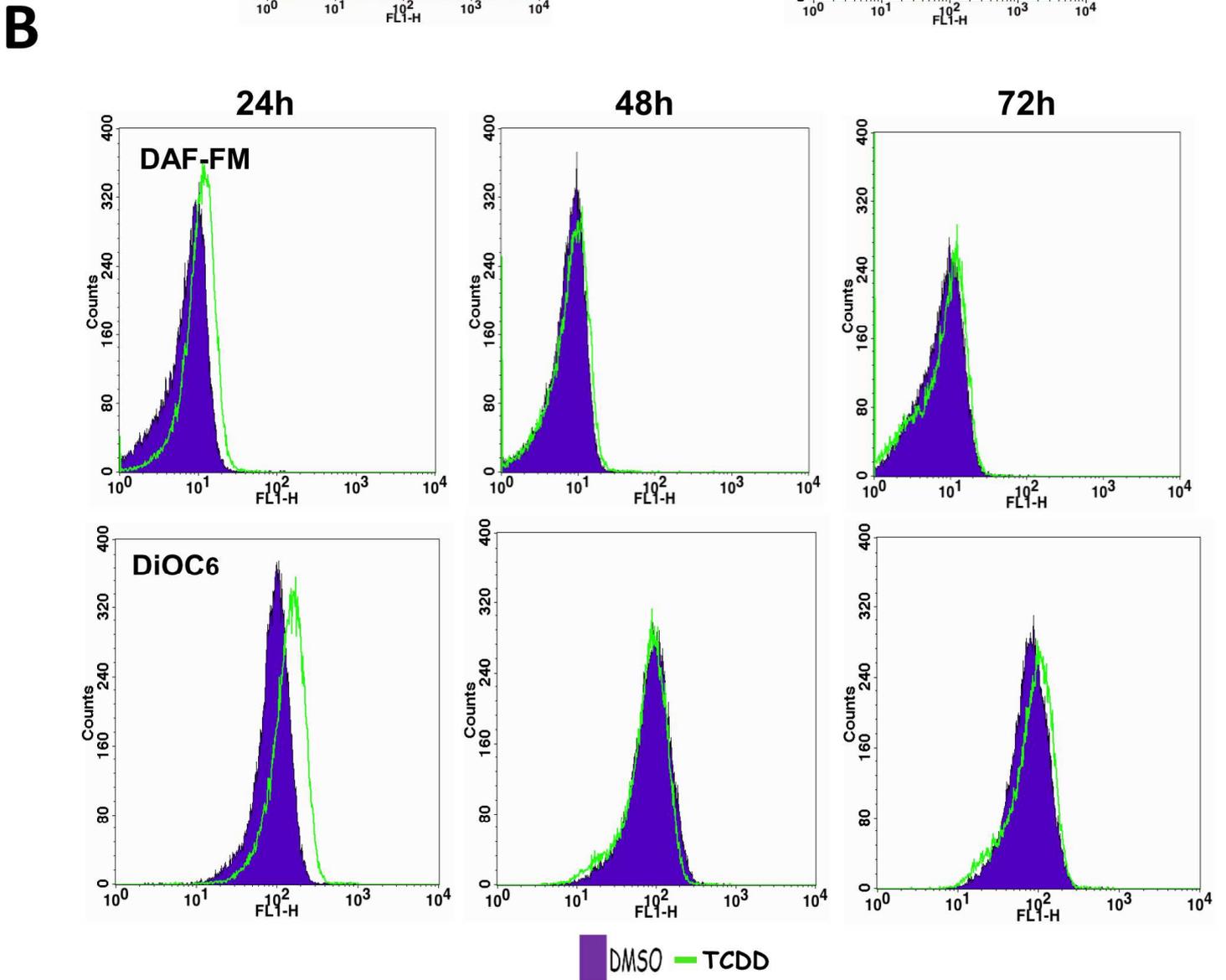
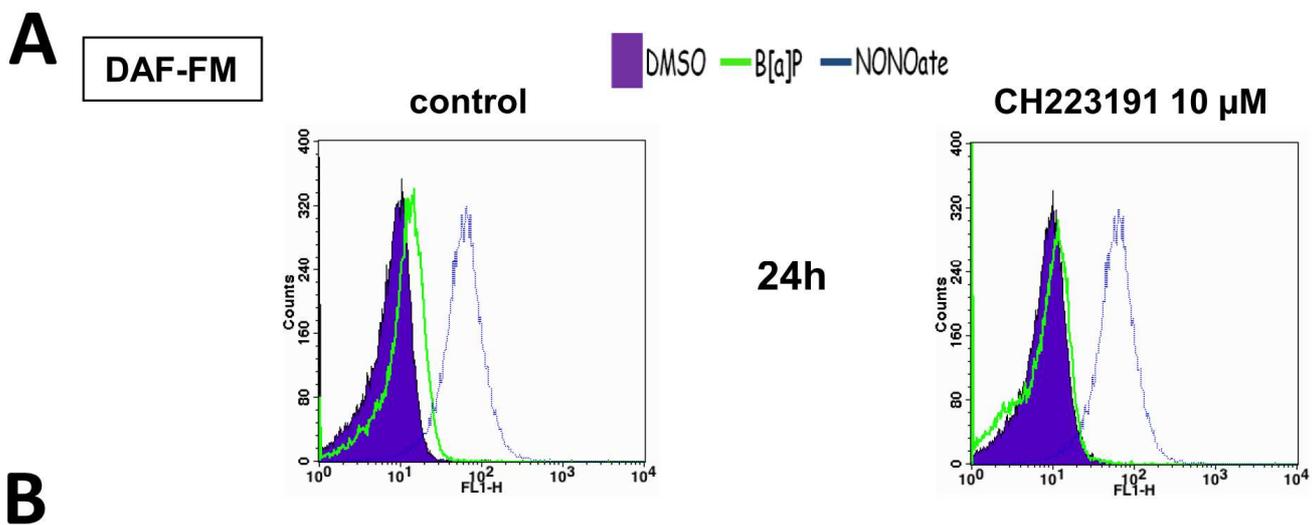
**Supplementary Figure 1. Evaluation of the F258 cell karyotype.** Determination of the chromosomal content was performed on cells arrested in metaphase by colcemid, according to a method previously described (Cassio, D., 2006. A general and reliable method for obtaining high yield metaphasic preparations from adherent cell lines: rapid verification of cell chromosomal content. In: Cell Biology, A Laboratory Handbook (third ed.)-J. Celis (Ed.), 39Academic Press , pp. 387–391).



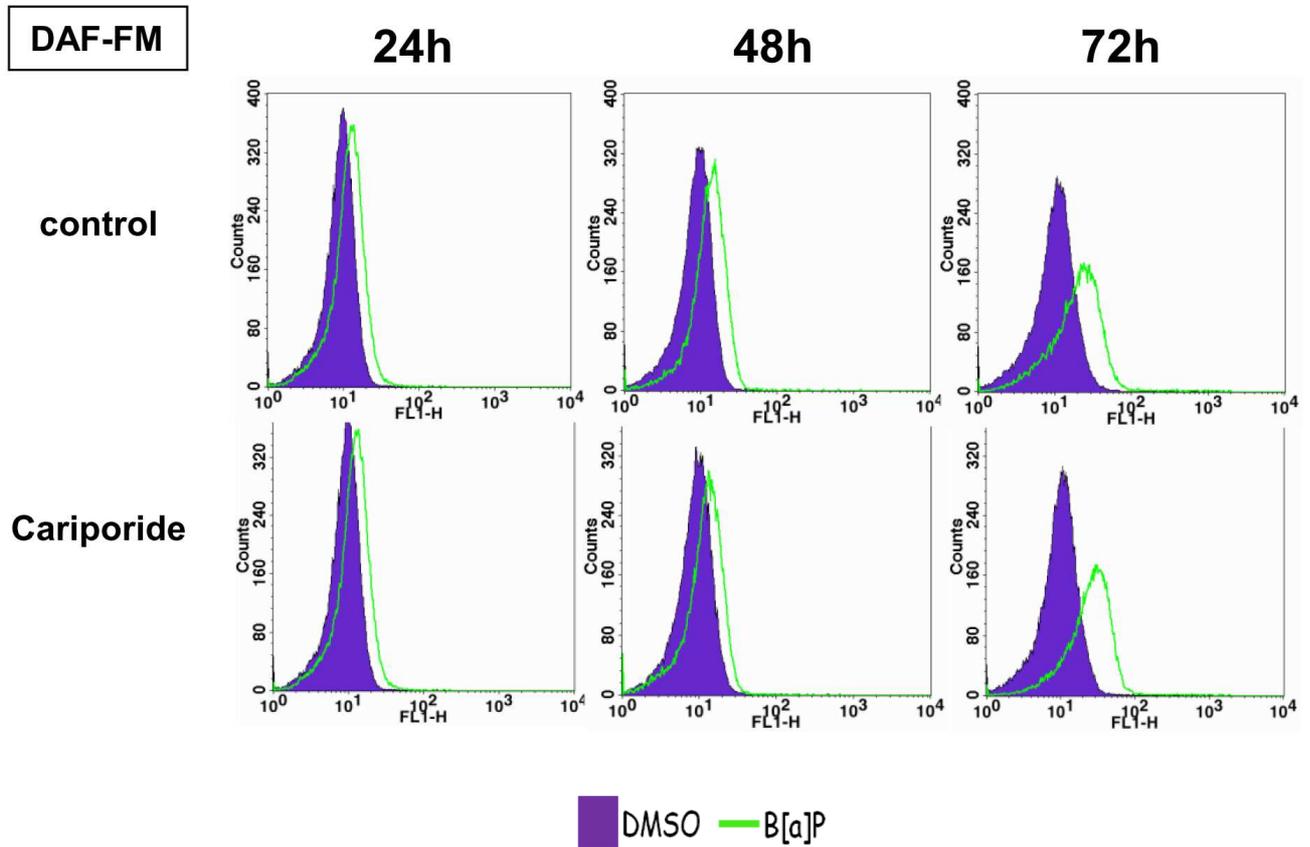
**Supplementary Figure 2. (A) Effects of B[a]P exposure on endogenous NO production.** F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 48 h. DAF2-DA, an NO-sensitive fluoroprobe, was used to detect NO by fluorescence microscopy. Mitochondria were visualized using the fluoroprobe Mitotracker. NONOate (10  $\mu$ M; open blue peak) was used as a positive control for NO production. Representative of 2 independent experiments. (B) **No clear change in the B[a]P-induced shift of the DAF-FM fluorescent peak occurred upon co-treatment with two known antioxidants (SOD-PEG: superoxide dismutase-PEG [500U/mL] and catalase-PEG [200U/mL]).** Detection of fluorescence was performed by flow cytometry following cell staining with DAF-FM. F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 24 h. Histograms are representative of 2 independent experiments.

**A****B****C**

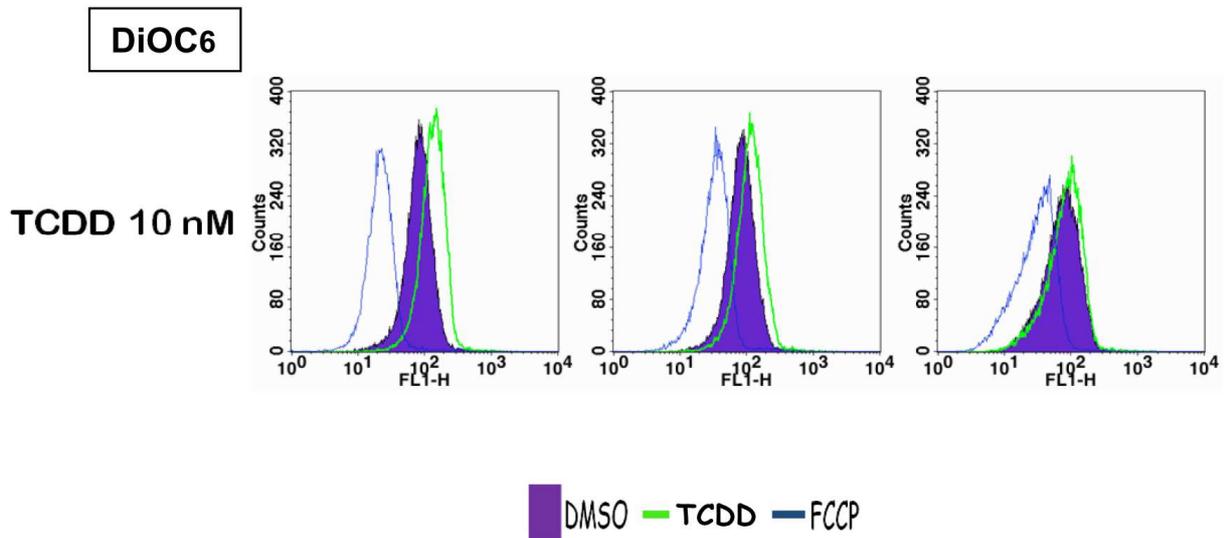
**Supplementary Figure 3. Absence of AhR silencing effects on the protein level of CYP1B1 (A) or of p21 (B) in B[a]P-exposed F258 cells.** F258 cells, transfected either by a control SiRNA (Si Neg) or an SiRNA targeting AhR (Si AhR) (for details, see Tekpli et al., 2010a), were treated or not with B[a]P 50 nM during 48h. After treatments, western-blotting analysis of CYP1B1 (A) or of p21 protein (B) level was performed (as described in Experimental procedures). In (C), the efficacy of SiAhR towards AhR protein level was tested. Number of experiments = 2.



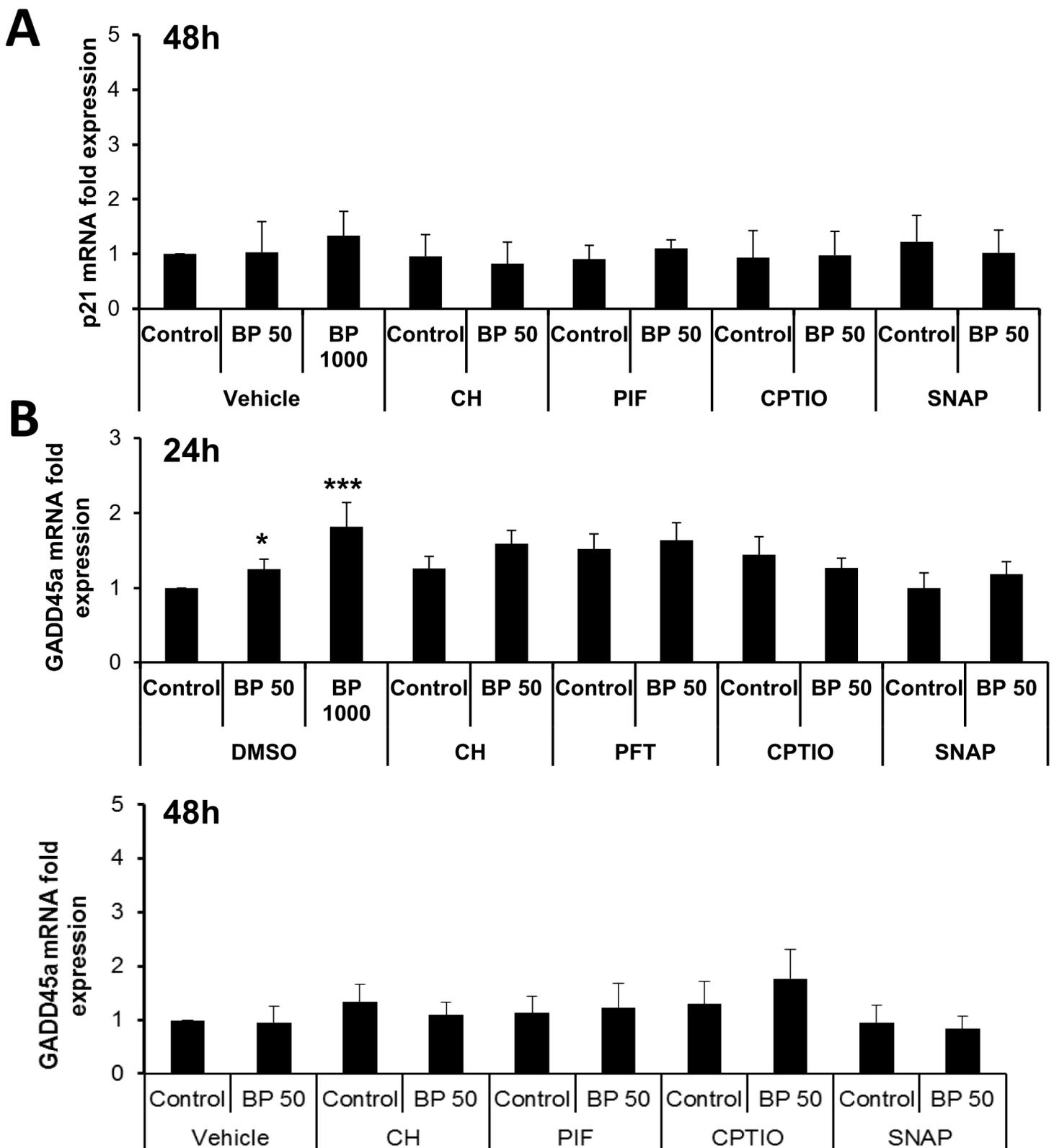
**Supplementary Figure 4. (A) Involvement of AhR in the B[a]P-induced NO production.** F258 cells were treated with B[a]P 50 nM for 24h in the presence or not of CH223191, an inhibitor of AhR. Flow cytometry analysis was then performed following cell staining with the fluoroprobe DAF-FM. NONOate (10  $\mu$ M; open blue peak) was used as a positive control for NO production. Histograms are representative of 3 independent experiments. **(B) Effects of TCDD on both NO production and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m).** Cells were treated or not with TCDD 10 nM for 24, 48 or 72h, prior staining with either DAF-FM (to detect NO production), or DiOC6(3) (to measure  $\Delta\Psi$ m). Histograms are representative of 3 independent experiments.



**Supplementary Figure 5. Effects of B[a]P exposure on endogenous nitric oxide (NO) production does not involve NHE1 activation.** In the absence cariporide (a specific inhibitor of NHE1), F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM during 24, 48 or 72 h (control). When testing the inhibitor, F258 cells were pre-treated for 1 h with cariporide (10  $\mu$ M) prior to co-exposure to B[a]P (24, 48 and 72h). Flow cytometry analysis was then performed following cell staining with the fluoroprobe DAF-FM. Histograms of NO production are representative of at least 3 independent experiments.



**Supplementary Figure 6. Effect of TCDD on mitochondrial membrane hyperpolarization.** F258 cells were treated with TCDD 10 nM for 24, 48 and 72h. Flow cytometry analysis was then performed following cell staining with the fluoroprobe DiOC6(3). FCCP (50  $\mu$ M; open blue peak) was used as a positive control for mitochondrial membrane depolarization. Histograms of  $\Delta\Psi_m$  are representative of 3 independent experiments.



**Supplementary Figure 7. Absence of NO effects on the mRNA expression and protein level of p21 and GADD45 in B[a]P-exposed F258 cells.** In the absence of inhibitors/modulators, F258 cells were treated or not with B[a]P 50 nM (BP50) or 1  $\mu$ M (BP1000) during 24h (B) or 48h (A, B). When testing inhibitors/NO modulators, cells were pre-treated for 1 h with CH223191 (CH, 10  $\mu$ M), a specific inhibitor of AhR, or pifithrin  $\alpha$  (PIF, 10  $\mu$ M), an inhibitor of p53, or the NO scavenger carboxy-PTIO (CPTIO, 25  $\mu$ M), or the NO-donor SNAP (50  $\mu$ M), prior to co-exposure to B[a]P 50 nM (BP50) for 24h (B) or 48h (A, B). After treatments, RT-qPCR analysis of p21 (A) or GADD45 (B) mRNA expression was performed (as described in Experimental procedures). mRNA expression was given relative to control cells with vehicle. Number of experiments  $\geq$  4 for all conditions. \*:  $p < 0.05$  and \*\*\*:  $p < 0.001$ : test treatment *versus* untreated control cells.



## Article 2

### **AhR- and NHE1-related metabolic reprogramming determines the cell survival induced by the environmental carcinogen benzo[a]pyrene**

(Article en préparation)

#### **Contexte scientifique de l'étude**

Nous avons pu confirmer dans l'article 1 que le B[a]P est à l'origine d'une hyperpolarisation de la membranemitochondriale dans les cellules épithéliales hépatiques F258 (Hardonnière *et al.*, 2015). Par ailleurs, nous avons pu montrer dans ce travail que cette hyperpolarisation se manifestait précocément, dès 24 heures, mais surtout que celle-ci perdurait tout au long de la cinétique d'exposition, après 72 heures d'exposition. Or, une telle augmentation de potentiel a été mise en évidence au cours des processus de cancérisation (Houston *et al.*, 2011), et serait associée à la reprogrammation métabolique identifiée dans les tumeurs (Hockenbery, 2010). D'où l'intérêt de mieux préciser l'impact du B[a]P sur la fonction énergétique mitochondriale.

#### **Objectifs**

Evaluer l'impact du B[a]P sur le métabolisme énergétique, et déterminer l'incidence d'un tel remaniement sur le phénotype et la survie des cellules F258.

#### **Résumé des principaux résultats**

Nous avons démontré que le B[a]P, via un processus d'EMT, modifie non seulement le phénotype cellulaire, mais accroît de surcroît le potentiel migratoire des cellules épithéliales hépatiques F258. Parallèlement à ces modifications, nous avons également mis en évidence que le B[a]P, *via* l'activation de NHE1 et du RAh, reprogramme le métabolisme énergétique, avec un ralentissement de la phosphorylation oxydative et une augmentation de la glyolyse. Une stimulation du cycle de Krebs, caractérisée une augmentation des niveaux de succinate, a également été mis en évidence ; celle-ci reposerait en particulier sur la dissociation du complexe II, et résulterait d'une acidification du compartiment matriciel. Enfin, nous avons pu montrer que cette reprogrammation métabolique constitue un signal de survie, susceptible de favoriser le changement de phénotype sous l'effet du B[a]P.



## **AhR- and NHE1-related metabolic reprogramming determines the cell survival induced by the environmental carcinogen benzo[a]pyrene**

Kévin Hardonnière<sup>1,2</sup>, Elise Saunier<sup>3</sup>, Anthony Lemarié<sup>4</sup>, Morgane Fernier<sup>1,2</sup>, Isabelle Gallais<sup>1,2</sup>, Cécile Héliès<sup>5</sup>, Baharia Mograbi<sup>6</sup>, Samantha Antonio<sup>3</sup>, Paule Bénit<sup>7,8</sup>, Pierre Rustin<sup>7,8</sup>, Maxime Janin<sup>3,9</sup>, Florence Hobarou<sup>3,9</sup>, Chris Ottolenghi<sup>3,9</sup>, Chantal Benelli<sup>3</sup>, Odile Sergent<sup>1,2</sup>, Laurence Huc<sup>5\*</sup>, Sylvie Bortoli<sup>3\*</sup>, Dominique Lagadic-Gossmann<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset – Inserm UMR 1085), F-35043 Rennes, France*

<sup>2</sup>*Université de Rennes 1, <sup>3</sup>Structure fédérative de recherche Biosit, UMS CNRS 3480/US Inserm 018, F 35043 Rennes, France*

<sup>3</sup>*Inserm UMR-S 1124, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saint-Pères, Paris, France*

<sup>4</sup>*Inserm-U1037, University of Toulouse, Toulouse Cancer Research Center CRCT, Department of Experimental Therapeutics 2 av. Hubert Curien, 31100 Toulouse, France*

<sup>5</sup>*INRA UMR 1331 ToxAlim (Research Center in Food Toxicology), University of Toulouse ENVT, INP, UPS, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027, France*

<sup>6</sup>*Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, 2. Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Centre Antoine Lacassagne, Nice, F-06107, France.*

<sup>7</sup>*Hôpital Robert Debré, INSERM UMR1141, Bâtiment Ecran, 48 Boulevard Sérurier, Paris 75019, France.*

<sup>8</sup>*U.F.R. de Médecine Université Paris Diderot, Paris 75019, France*

<sup>9</sup>*Biochimie Métabolique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades, Paris, France*

\*: equally supervised the work

**Running title:** PAH effects on cell metabolism and phenotype

### **To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Dominique Lagadic-Gossmann,  
Inserm U1085 / IRSET,  
Université Rennes 1,  
Faculté de Pharmacie,  
2 avenue du Professeur Léon Bernard,  
35043 Rennes cedex, France;  
Tel: +33(0)223234837;  
Fax: +33(0)2 23 23 50 55  
E-mail: dominique.lagadic@univ-rennes1.fr

## **ABSTRACT**

Cancer cells display alterations in many cellular processes when compared to healthy cells. Among them, metabolic reprogramming towards glycolysis, known as the Warburg effect, has emerged as a core hallmark of cancer, allowing most cancer cells to survive and proliferate. Although contributions of environmental contaminants to cancer development are widely accepted, the involved mechanisms have still to be clarified. Benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype molecule of polycyclic aromatic hydrocarbons, exhibits genotoxic as well as carcinogenic effects; this has led the International Agency for Research on Cancer to recognize it as a human carcinogen. Besides the well-known apoptotic signals triggered by B[a]P, survival signals have also been suggested to occur, both signals likely involved in cancer promotion. Our previous work suggested that the B[a]P-induced mitochondrial dysfunctions, especially characterized by a mitochondrial membrane hyperpolarization, might trigger cell survival signaling in rat hepatic epithelial F258 cells. The present study therefore aimed at further characterizing these mitochondrial dysfunctions induced by B[a]P, by focusing on the energetic metabolism in B[a]P-treated hepatic cells. Our data clearly established that this carcinogen promotes both an epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration in F258 cells; in parallel, a metabolic reprogramming was detected, with a decreased oxidative phosphorylation and an increased glycolysis. A stimulation of the tricarboxylic acid cycle leading to an increase in succinate level was also detected, likely involving a dissociation of mitochondrial complex II. The glycolytic shift relied on both NHE1 and AhR activation, and appeared to be a key feature in B[a]P-induced cell survival and invasion.

## INTRODUCTION

Metabolic reprogramming upon malignant transformation has been extensively studied, and the reversible metabolic shift from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to aerobic glycolysis (the so-called Warburg effect) is now a core hallmark of cancer cells (Hanahan and Weinberg, 2011). This reprogramming allows cancer cells to survive from the carcinogenesis onset, notably because it most effectively supports the neoplastic proliferation (Kroemer and Pouyssegur, 2008).

More recently, close interconnections between energy metabolism and cell fate have been reported in which mitochondria play a crucial role, notably through a number of death effectors and the control of organic acid balances (Green et al., 2014; Bénit et al., 2014). In line with this, a high mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) appears to be a relevant marker for mitochondrial dysfunction in cancer. Such a high  $\Delta\psi_m$  depends on the proton pumping (matrix to intermembrane space) associated with the electron flow through mitochondrial inner membrane, and the proton back transportation to the matrix via the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase with concomitant ATP synthesis. It thus represents a snapshot of mitochondrial functional status. Indeed, many carcinomas display high  $\Delta\psi_m$  (Fantin et al., 2002), and cells with high  $\Delta\psi_m$  appear to be more prone to form tumors (Heerdt et al., 2006; Schieke et al., 2008). Interestingly, a high  $\Delta\psi_m$  has been measured concomitantly to cell metabolic reprogramming towards glycolysis in hepatocarcinoma HepG2 cells (Sánchez-Cenizo et al., 2010).

Environmental carcinogens are among the various factors which might favor a high  $\Delta\psi_m$  and hence metabolic reprogramming. Thus,  $\Delta\psi_m$  increased upon the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells (Tappenden et al., 2011). However, a glycolytic reprogramming

upon AhR activation remains to be determined. AhR is activated by several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which are major environmental contaminants, notably found in exhaust fume, cigarette smoke and diet. The PAH prototype benzo[a]pyrene (B[a]P) exhibits a strong carcinogenic potential, and is classified as carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC). However the carcinogenicity of B[a]P implies various mechanisms that remain to be clarified. B[a]P, following its bioactivation *via* cytochromes P450, is genotoxic, and hence could lead to gene mutations, eg. in *p53* (Hernandez-Boussard and Hainaut, 1998). It could also favor cancer promotion step by conferring a selective advantage to the initiated cells, notably through the expression of growth factors and/or anti-apoptotic mechanisms. Death of normal cells upon B[a]P exposure might in addition contribute to favor the pre-neoplastic cells (Bock and Köhle, 2005). B[a]P can also favor metastasis *via* the promotion of cell migration (Ba et al., 2015) or by acting on the expression of extracellular matrix components (Hillegass et al., 2006). Regarding the impact of B[a]P on cell metabolism, we have previously shown in rat epithelial hepatic F258 cells, that B[a]P can affect lipid metabolism (Tekpli et al., 2010), and the expression of hexokinase II, c-myc and GSK3 proteins (Huc et al., 2007; Dendelé et al., 2012), all known as controlling energy metabolism (Kotliarova et al., 2008; Soga, 2013). However, the effect of B[a]P, and more generally PAHs, on cell energy metabolism is so far very poorly described. As B[a]P exposure led to mitochondria hyperpolarization in F258 cells (Huc et al., 2003), possibly in relation with activation of a survival pathway (Hardonnière et al., 2015), we hypothesized that a glycolytic shift might occur upon B[a]P exposure.

Due to hyperpolarization of these cells in the presence of B[a]P, the present study aims at testing the effects of B[a]P on the energy metabolism of F258 cells. Moreover, this cell line is sensitive to low concentrations of B[a]P, and thus more relevant to environmental exposure (Holme et al., 2007). Our study revealed a B[a]P-induced metabolic reprogramming, that

involved AhR and the previously identified activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1) (Huc et al., 2004, 2007), this reprogramming being related to an EMT-like phenotype.

## **Material and Methods**

### ***Chemicals***

Benzo[a]pyrene (B[a]P),  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF), 1-Methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH223191), cytochalasin B, insulin, 2-deoxyglucose and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). N-(Diaminomethylene)-4-isopropyl-3-(methylsulfonyl)benzamide (Cariporide) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Hoechst 33342 was purchased from Life Technologies. All these products were used as a stock solution in DMSO; final concentration of this vehicle in culture medium was  $<0.00005\%$  (v/v), and control cultures received the same concentration of vehicle as treated cultures. [ $^3\text{H}$ ]-2-deoxyglucose was from PerkinElmer (Boston and Waltham, USA). Monoclonal mouse anti-HSC70 antibody (sc-7298) and monoclonal mouse anti-actin antibody (sc-8432) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, USA). Monoclonal mouse anti-E-Cadherin antibody (610404) was purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Polyclonal Rabbit anti-AhR antibody (BML-SA550) was purchased from Enzo Life Sciences (Lyon, France). Monoclonal mouse anti-vimentin antibody (M0725) was purchased from DAKO (Les Ulis, France). Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were purchased from DAKO (Les Ulis, France).

### ***Cell culture***

The F258 rat liver epithelial cell line (cf. Hardonnière et al., 2015, for further details) was cultured in Williams' E medium supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. When necessary, F258 cells were also grown in galactose media made from Williams'E medium deprived of glucose, and supplemented with 11 mM galactose, 10% fetal

calf serum and 2 mM glutamine. For this condition, F258 cells were grown in galactose medium for at least three passages before the experiments were conducted. The mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells were grown in alpha MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. The human hepatocarcinoma HepG2 cells were cultured in EMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. Each cell line was grown at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and treated 24 h following seeding with B[a]P for 24, 48 and 72 h, as previously described (Huc et al., 2004).

### ***Transfection and RNA interference (siRNA) protocol***

ON-TARGETplus Rat AhR siRNA SMARTpool (si AhR) and ON-TARGETplus Non-Targeting Pool siRNA negative control (si NT) were purchased from GE Dharmacon. Basic Small interfering RNA (siRNA) resuspension was realized according to manufacturer's recommendations. Transfections of siRNA were performed in 60 mm dishes on 60% confluent F258 cells, in the presence of TransFectin Lipid Reagent (BioRad). Per dish, siRNA (100 nM) and 12.5 µl TransFectin lipid reagent were applied in a final volume of 2.5 ml Opti-MEM. Six hours later, the medium was renewed with the current medium as described above. Cells were then passaged in order to be treated during exponential phase.

### ***Real time cell impedance measurement***

The XCelligence system was used according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science). Briefly, 2 500 cells/well were seeded in the 96-well E-plates in Williams' E medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine. Twenty-four hours later, cells were treated with 50 nM B[a]P in the same medium. Cell impedance was measured in each well every 5 minutes for 80 hours. Impedance signals were analyzed by an integrated software (RTCA Analyzer), and expressed as a Cell Index value that reflects cell number, cell

adhesion and/or cell morphology. The changes of cell impedance between control and treated cells were determined by calculating the slope of the line between two given time points.

### ***Flow cytometry analysis of cell cycle***

After a 48h-B[a]P treatment, cells were harvested and washed with phosphate-buffer saline (PBS). Cell nuclei were stained with propidium iodide using the Cycle Test™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA). DNA content of 20 000 cells/analysis was then monitored with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Analysis of the cell cycle parameters was performed using the Modfit software (Becton Dickinson).

### ***Analysis of cell migration***

Cell migration was monitored using the XCelligence system. Cells were serum starved 5 hours before seeding in a CIM-plate. Cells were trypsinized and treated with 500 nM B[a]P in Williams' E medium without FCS, before seeding at  $3.2 \times 10^3$  cells/well in the upper chamber of a CIM-plate. Williams' E medium supplemented with 10% fetal calf serum was added in the lower chamber of the CIM-plate. The impedance value of each well was measured every 5 minutes for 40 hours and expressed as a CI value.

### ***Western blotting***

After treatment, cells were harvested and lysed for 20 min on ice in RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. Thirty µg of whole-cell lysates were heated for 5 min at 100 °C, loaded in a 4% stacking gel, and then separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polymerase gel electrophoresis (SDS–PAGE). Gels were electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Millipore). After membrane blocking with a Tris-buffered saline (TBS) solution

supplemented with 5% bovine serum albumin, membranes were hybridized with primary antibodies against E-cadherin or vimentin overnight at 4 °C, and next incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h. For protein loading evaluation, primary antibodies against HSC70 or  $\beta$ -actin were used. Immunolabeled proteins were then visualized by chemiluminescence using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm). Image processing was performed using Multi Gauge software (Fujifilm).

### *Analysis of oxygen consumption and extracellular acidification rates*

F258 cells were seeded in Seahorse XF 24-well microplates (Proteigene, St Marcel, France) at 6 000 cells/well. Twenty four hours later, cells were treated with B[a]P 50 nM or DMSO for 48h. On the day prior to the experiment, XF extracellular flux cartridge was hydrated with XF calibrant overnight. After a 48h-treatment, the medium was changed to assay medium (unbuffered DMEM with Glucose 10mM, Glutamine 2mM and pyruvate 2mM) and kept one hour in a non-CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The mitochondrial function test was performed with consecutive injections of inhibitors of the electron transport chain (ETC): oligomycin 1 $\mu$ M (inhibition ATP synthase), FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) 0.5  $\mu$ M (uncoupler of the mitochondrial inner membrane, to get the maximum electron flux through ETC) and a mix with rotenone 1 $\mu$ M and antimycin A 1 $\mu$ M (inhibition of complex I and III of ETC). OCR (oxygen consumption rate) and ECAR (extracellular acidification rate) were measured and normalized after experiment according to protein content. Five independent experiments were performed.

### ***Extracellular Lactate Measurement***

Cell Supernatants were collected and directly frozen after culture experiments. Quantification of L-lactate levels was based on two enzymatic reactions. Lactate dehydrogenase (LDH; Roche, Meylan, France) catalyzed the NAD<sup>+</sup>-mediated oxidation of lactate in pyruvate. A second reaction, using glutamate-pyruvate transaminase (GPT; Roche, Meylan, France) was used to shift first reaction equilibrium by transforming the entire pyruvate into alanine and  $\alpha$ -ketoglutarate. The amount of NADH formed was related to the quantity of lactate processed by these two coupled reactions. Briefly, 20  $\mu$ L of each sample were added to 200  $\mu$ L of reaction buffer (620 mM sodium carbonate, 78.7 mM L-glutamate, 0.92 mM NAD, 2  $\mu$ g GPT and 2  $\mu$ g LDH). The standard range was performed using lithium lactate (Sigma Aldrich). 96 multiwell plates were then incubated at 37°C for 30 minutes before quantifying extracellular lactate production by monitoring the increase in absorbance of NADH at 355 nm on a spectrophotometer (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, France). At least three independent experiments, performed in triplicate and normalized to their related protein contents, were carried out for each experimental condition.

### ***Substrate oxidation assays***

After a 48 hour treatment with B[a]P 50 nM,  $10^6$  isolated F258 cells were incubated for 90 min at 37°C in 1 mL of Krebs-Ringer phosphate buffer containing 5 mM U-<sup>14</sup>C-glucose (11 GBq/mmol, isotopic dilution 1/1000, Perkin Elmer), or 5 mM [U-<sup>14</sup>C] pyruvate (0.351 GBq/mmol, isotopic dilution 1/250, Perkin Elmer). CO<sub>2</sub> was recovered for 1h in benzethonium hydroxide after stopping the reaction with sulphuric acid 6N. The radioactive CO<sub>2</sub> was counted by liquid scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer).

### ***Mitochondria isolation and Complex II activity measurement***

Mitochondria were isolated from F258 cells treated with or without B[a]P 50 nM for 48h as previously described (Lemarie et al, 2011), resuspended in lysis buffer and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The activities of complex II were measured by spectrophotometric tests (Lemarie et al, 2011). Succinate dehydrogenase activity (SDH; subunits A,B) was analyzed by the reduction of DCPIP (dichlorophenolindophenol) in the presence of PMS (phenazine methosulfate) while succinate ubiquinone-reductase (SQR; subunits A-D) activity was assayed by the CoenzymeQ-dependent reduction of DCPIP. Briefly, for both activities, 10  $\mu\text{g}$  of mitochondria were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (35 mM, pH 7.3) supplemented with 2 mM KCN and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Antimycin A (Sigma). For SDH activity, 10 mM succinate, 1.6 mM PMS and 40  $\mu\text{M}$  DCPIP were added. For SQR activity, the mitochondrial suspension was combined with 40 mM succinate, 100  $\mu\text{M}$  CoQ2 (Sigma C8081) and 88  $\mu\text{M}$  DCPIP. Following a 5 min incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the absorbance at 610 nm was recorded every 30 s during 10 min (FLUOstar Optima, BMG Labtech), monitoring the extinction of DCPIP at  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Results were expressed as relative activities compared to control cells. All the reagents and chemicals are from Acros Organics (Fisher), unless stated.

### ***Visualization of chromatin condensation and fragmentation by nuclear staining***

Chromatin condensation and morphological changes in the nucleus were observed after staining with the chromatin dye Hoechst 33342. Following treatments, cells were stained with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 in the dark for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and then examined under fluorescence microscopy (Olympus BX60, France). Total population was always  $>400$  cells.

### ***ATP quantification***

ATP content was evaluated using a luminescence assay kit based upon the reaction of luciferin with ATP in the presence of luciferase (CellTiter-Glo luminescence cell viability assay, Promega), according to the manufacturer's instructions. The amount of ATP was proportional to the luminescent signal measured with a spectrophotometer (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, France).

### ***Statistical analysis***

All data were obtained from a minimum of three independent experiments. They were quoted as mean  $\pm$  SD. Analysis of variance followed by Newman–Keuls test was used to test the effects of B[a]P. Differences were considered significant at the level of  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software, San Diego, USA).

## RESULTS

### **B[a]P affects F258 cell phenotype *via* an EMT-like process**

We first tested the effects of 50 nM B[a]P (48h-exposure) on F258 cells in the presence of 25  $\mu$ M antimycin A (AA) and 8  $\mu$ M oligomycin A (OA), inhibitors of respiratory chain complexes III and V, respectively. In the absence of B[a]P, OXPHOS inhibition by antimycin/oligomycin led to a massive cell death (Fig. 1A). Interestingly, co-exposure of inhibitors with B[a]P favored cell survival, possibly due to a metabolic reprogramming rendering the cells less dependent on oxidative metabolism. Such a reprogramming being generally associated with changes in cell phenotype, we then performed measurements using XCELLigence technology (see Material and Methods). A faster increase in the impedance shown by the cell index time course, was elicited by B[a]P (50 nM) after 40h, with a significant increase in the slope (by about 75 %; Fig. 1B). This could be due to either an increased cell proliferation or changes in cell adhesion properties (i.e. spreading). The different cell cycle phases at 48h were therefore studied using IP staining and flow cytometry. The number of cells in the G0G1 phase significantly increased with a concomitant decrease of these in S phase (Fig. 1C), pointing to a decrease in the proliferating cell number. Altogether, the cell index increase and the concomitant decreased proliferation upon B[a]P exposure pointed to cell spreading.

As the above results might indicate the occurrence of an epithelia-mesenchymal transition (EMT)-like process upon B[a]P exposure, the protein level of known epithelial and mesenchymal markers was then studied (Fig. 2A). As shown by the downregulation of the epithelial marker E-cadherin (48h) and an upregulation of the mesenchymal marker vimentin (as early as 24h of treatment), B[a]P induced a shift from an epithelial to a mesenchymal phenotype. To further support this shift, the impact of B[a]P on the F258 cell migration

potential was tested with the XCELLigence technology using CIM plates (see Material and Methods). As shown in Fig. 2B, a marked rise of the impedance curve upon B[a]P exposure was detected, with a significant increase of the cell index (Fig. 2B, inset), thus indicating that B[a]P augmented cell migration capacities.

Altogether, these results indicated the appearance of a mesenchymal-like phenotype associated with cell migration, upon B[a]P exposure.

### **Glycolytic shift induced by B[a]P in F258 cells**

The effects of B[a]P on energy metabolism were next sought since a glycolytic shift favors both cancer cell survival (Boroughs and DeBerardinis, 2015) and EMT (Li et al., 2015). A bioinformatics analysis was first carried out, based upon the impact of a 72h exposure to B[a]P 2  $\mu$ M on the transcriptome of the human hepatocarcinoma HepG2 cell line (GSE40117, Doktorova et al., 2013). More precisely, in order to identify pathways that are differentially correlated with B[a]P response, we used single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) projection as a hypothesis-generating gene set identification tool. As shown in Supplementary Fig. 1, the ssGSEA analysis revealed that the expression of OXPHOS-related gene set was globally down-regulated, in contrast to glycolysis and xenobiotic metabolism-related genes which were up-regulated. This therefore pointed to a B[a]P-induced metabolic reprogramming of hepatic cells.

Thorough characterization of energy metabolism in F258 cells was therefore conducted in order to determine the impact of a low B[a]P concentration. Analysis of oxygen consumption rate (OCR) was thus performed using Seahorse XF24 technology. OCR experiments (Fig. 3A) showed a strong inhibition of basal respiration after 48h of B[a]P (50 nM) exposure. Furthermore, the ATP-linked OCR following F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase inhibition by

oligomycin A (oligo) was lower in B[a]P-treated cells compared to untreated cells. However, injection of the uncoupler molecule FCCP to evaluate the maximal respiration capacity did not show any modification between control and B[a]P-treated cells, suggesting no effect on complex IV activity. However, the reserve capacity appeared higher in B[a]P-treated cells. In this context, B[a]P-treated cells would exhibit a better capacity to consume O<sub>2</sub> when increased ATP demand or during a stress. These data therefore suggested that B[a]P-treated cells might be more adapted to deal with other stress; this was in line with the results of Fig. 1A showing better survival of B[a]P-treated cells when OXPHOS was inhibited. Altogether, these data indicated that B[a]P led to a cell phenotype associated with a change in energy metabolism and cell survival.

We next measured extracellular acidification rate (ECAR). This parameter was increased by B[a]P (Fig. 3B), indicating an extracellular acidification and hence a glycolytic reprogramming upon carcinogen exposure. As such a change in extracellular pH could involve an accumulation of glycolytic by-products, we finally evaluated the lactate release, a well-known indicator of glycolysis. As shown in Fig. 3C, this parameter was enhanced following a 48h-exposure to B[a]P 50 nM, with a more pronounced increase with 1 μM. Such a dose-dependent effect was already significant after 24 hours, and was enhanced after 72 hours (Supplementary Fig. 2A). Note that 50 nM dimethyl-benzanthracene (DMBA), another known carcinogenic PAH, had similar effects as B[a]P in F258 cells (Supplementary Fig. 2B). It is also noteworthy that B[a]P increased extracellular lactate in two other hepatic cell lines, HepG2 (Supplementary Fig. 2C) and Hepa1c1c7 (Fig. 5D), with a more pronounced effect in the latter one.

In total, we clearly evidenced a glycolytic reprogramming in B[a]P-treated F258 cells, related to a major deregulation of mitochondrial function.

### **Stimulation by B[a]P of the tricarboxylic acid cycle in F258 cells**

In order to get further insight into the effects of B[a]P on the glycolytic metabolism, glucose oxidation was next analyzed by measuring the  $^{14}\text{CO}_2$  production using  $^{14}\text{C}$ -glucose. Glucose oxidation significantly increased after a 48h-exposure to B[a]P 50 nM (Figure 4A). To test if the stimulation of both glucose oxidation and lactate production were linked to an increased glucose consumption, this uptake was evaluated using 2-deoxy-[1- $^3\text{H}$ ]-glucose. As expected, cytochalasin B, to inhibit actin filament formation, blocked glucose uptake in F258 cells (Supplementary Fig. 3A). However, B[a]P 50 nM (48h) remained ineffective. We then evaluated whether a stimulated pentose phosphate pathway might participate to the glucose-related  $\text{CO}_2$  production presently detected. A simple way to test this hypothesis was to inhibit OXPHOS and to evaluate glucose oxidation. As illustrated in Fig. 4B, OXPHOS blockade by rotenone (ROT, 1  $\mu\text{M}$ ) or antimycin (AA, 1  $\mu\text{M}$ ) markedly prevented the B[a]P-increased glucose oxidation, suggesting a link with OXPHOS. However, a slight, but significant, increase in glucose oxidation was still detected in B[a]P-treated cells under these conditions. Altogether, these results suggested that B[a]P increased glucose oxidation through the activation of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, which produces  $\text{CO}_2$  from glucose. To support this hypothesis, pyruvate oxidation was analyzed (Fig. 4C), and found to be enhanced already at 24h with a marked rise at 48 hours, thus pointing to a TCA cycle stimulation by B[a]P.

### **Identification of the mitochondrial complex II as responsible for the TCA cycle stimulation in B[a]P-treated F258 cells**

Based upon the above results indicating a B[a]P-induced decrease in oxygen consumption along with an increase in both glucose and pyruvate oxidation, we then hypothesized that

B[a]P exposure might result in an uncoupling effect between TCA cycle and OXPHOS. The respiratory chain complex II has been previously shown to be responsible for such an uncoupling, thereby leading to superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) production (Hwang et al., 2014). As  $O_2^{\cdot-}$  production was detected upon B[a]P exposure in F258 cells (Huc et al., 2006), we thus decided to evaluate the two complex II-related activities: the SQR (succinate:ubiquinone oxidoreductase) and SDH (succinate dehydrogenase) activities. Fig. 4D shows that a 48h-treatment to B[a]P 50 nM significantly decreased the SQR activity (by ~25% compared to control), without any effect on SDH activity. Under our experimental conditions, no change in complex I activity was detected (Supplementary Fig. 3B). As a mitochondrial matrix acidification can be responsible for such effects on complex II (Lemarié et al., 2011), matrix pH was analyzed and found to decrease upon B[a]P (50 nM, 48h) exposure (by about 1.5 pH unit); as expected, the uncoupling agent FCCP induced an even more pronounced matrix acidification (Supplementary Fig. 3C). An increase in succinate concentration can result from complex II inhibition (Albayrak et al., 2003; Hwang et al., 2014; Wojtovich et al., 2013). Fig. 4E clearly shows that B[a]P (50 nM, 48h) significantly enhanced this concentration while decreasing the fumarate one, further confirming the B[a]P effects on complex II.

### **Role for AhR and NHE1 in B[a]P-induced metabolic reprogramming in F258 cells**

We next tested if CYP-related B[a]P metabolism was involved. As illustrated in Fig. 5A,  $\alpha$ -naphthoflavone (NF), a known CYP metabolism inhibitor, fully prevented the B[a]P (50 nM, 48h)-induced lactate release. Based upon the fact that  $\alpha$ -naphthoflavone is known also to inhibit AhR which is activated by several PAHs, including B[a]P, and as AhR is not involved in the regulation of B[a]P metabolism in F258 cells (due to a constitutively high CYP1B1 expression; Tekpli et al., 2010; Hardonnière et al., 2015), a possible role for AhR in

the glycolytic shift was tested. First, using TCDD (10 nM, 48h), a strong AhR ligand and activator, we evidenced an increase in lactate release in F258 cells, even though this increase was less, compared to B[a]P (Fig. 5B). By silencing AhR through a siRNA approach, we found that this receptor was involved in the B[a]P-elicited effects on lactate release in F258 cells. Indeed, besides markedly inhibiting AhR expression (Hardonnière et al., 2015), siAhR treatment significantly prevented the B[a]P (50 nM, 48h)-induced increase in lactate release (Fig. 5C). Taken together, these observations suggest a role for AhR in the metabolic deregulation induced by B[a]P.

We previously found that B[a]P metabolism activated an NHE1 pathway in F258 cells (Huc et al., 2004, 2007). As NHE1 is known to regulate both cell energy metabolism (Fidelman et al., 1982; Peak et al., 1992) and complex II activities (Lemarie et al., 2011), we therefore tested its possible involvement in the B[a]P-induced glycolytic shift. By using cariporide (10  $\mu$ M) to inhibit NHE1 activity, we demonstrated that NHE1 was involved in this metabolic shift since no significant change in lactate release was observed upon B[a]P/cariporide co-exposure, as compared to control (Fig. 5A). Similar results were obtained in Hepa1c1c7 cells (Fig. 5D), in which B[a]P also activated NHE1 (Holme et al., 2007). In order to test whether NHE1 might also be involved in the TCA cycle stimulation, glucose oxidation was measured in presence of cariporide, and the increase upon B[a]P (50 nM, 48h) was fully prevented by this inhibitor (Fig. 5E). Altogether these results point to a role for the B[a]P-activated NHE1 pathway in metabolic reprogramming.

### **Role for the B[a]P-induced glycolytic shift as a survival signal in F258 cells**

The role for the glycolytic shift in the phenotypic responses to B[a]P was finally tested. We thus evaluated the impact of B[a]P on cell death when glycolysis was prevented. To do so, cells were forced to rely on OXPHOS by substituting glucose by galactose in culture medium (Marroquin et al., 2007; Weber et al., 2002). In order for the cells to adapt to this change of metabolic substrate, they were cultured in presence of galactose for at least 3 passages before B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 72h) exposure. Under these conditions, no significant change was recorded in the intracellular ATP level compared to glucose conditions, in the absence of any treatment; furthermore, the effects of B[a]P on ATP level appeared not to rely on the medium substrate (Fig. 6A). As expected, we found that the replacement of glucose with galactose fully blocked the B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 48h)-induced lactate release (Fig. 6B). Inhibiting glycolysis significantly increased the B[a]P-induced cell death, especially for B[a]P 50 nM (Fig. 6C).

Altogether, these results therefore point to glycolytic reprogramming as responsible for a survival signal in B[a]P-treated cells.

## DISCUSSION

High intrinsic  $\Delta\psi_m$  appears to be a shared feature of many cancer types, and is linked to their degrees of aggressiveness (Heerdt et al 2006; Fantin et al., 2002). But little is known about its pathophysiological origin. We thus hypothesized that such a mitochondrial alteration might result from exposure to environmental carcinogens. In support to such a hypothesis, suffice it to say that an ever increasing number of environmental toxicants has been reported to target mitochondria (Meyer et al., 2013). Regarding more specifically AhR activators, it is noteworthy that TCDD, a well-recognized strong AhR activator, was shown to regulate eight nuclear encoded mitochondrial genes involved in electron transport chain and oxidative phosphorylation (Forgacs et al., 2010), and to trigger mitochondrial hyperpolarization (Tappenden et al., 2011). In this context, chronic exposure to toxicants targeting AhR could thus participate to cell transformation by sustainably increasing  $\Delta\psi_m$ . In line with this, we previously demonstrated that B[a]P increased  $\Delta\psi_m$  in F258 cells (Huc et al., 2003, Hardonnière et al., 2015). Similarly, a mitochondrial hyperpolarization was observed in low dose bisphenol A-treated HepG2 hepatocarcinoma cells (Huc et al., 2012). As a link between high  $\Delta\psi_m$  and metabolic reprogramming was previously proposed (Sánchez-Cenizo et al., 2010), the present study was thus dedicated to analyzing the energy metabolism upon a low dose B[a]P exposure of F258 cells. Despite some literature indicating a possible effect of B[a]P on glycolysis (Rády et al., 1980; Hooven and Baird, 2008) or OXPHOS (Salazar et al., 2004), the metabolic reprogramming and its role in the cell response induced by environmental carcinogens remain to be explored for B[a]P as for many other environmental contaminants (Robey et al., 2015). Here we show for the first time that exposure to a low concentration of B[a]P can lead to a Warburg effect in hepatic cells (three different cell lines). It is worth emphasizing that DMBA, another PAH carcinogen, and TCDD were also presently shown to enhance lactate release. Therefore, such a metabolic reprogramming might provide

new insights into the carcinogenic process elicited by aromatic hydrocarbons, since the Warburg effect is a core hallmark of cancer cells (Hanahan and Weinberg, 2011).

Besides the glycolytic shift, a stimulation of the TCA cycle also occurred, with an increase in both glucose and pyruvate oxidation. The fact that oxygen consumption was markedly decreased under our experimental conditions suggested an uncoupling between TCA cycle and respiratory chain at the level of mitochondrial complex II. Such an uncoupling was supported by our data showing a decrease in the complex II SQR activity with no change in the SDH activity. Also note that a high  $\Delta\psi_m$  has previously been related to OXPHOS uncoupling, leading to a reduced oxygen consumption (Kadenbach, 2003). Recent proteomics analysis in Hepa1c1c7 cells reported effects of B[a]P on both glycolysis and TCA cycle, especially at early time points (Kalkhof et al., 2015). However, these findings were obtained with a higher concentration of B[a]P (5  $\mu$ M), and were only based on protein expression, unlike our study which dealt with metabolite levels and enzyme activities. Moreover, in contrast to our data, these authors described a decrease in glycolysis and an increase in OXPHOS level following a 24h-treatment. These differences might stem either from different cell phenotypes since Hepa1c1c7 cell are hepatoma cells whereas F258 cells are spontaneously transformed cells, from differences in B[a]P metabolism (Holme et al., 2007), or from the tested concentrations. With respect to this latter hypothesis, it is worth noting that an enhanced lactate production in Hepa1c1c7 cells was presently found upon a 48h-exposure to 50 nM or 1  $\mu$ M B[a]P; besides, our ssGSEA analysis using data obtained from B[a]P (2  $\mu$ M)-treated HepG2 cells for 72h were in line with our present data (i.e. decreased OXPHOS and increased glycolysis). Regarding the origin of the complex II dysfunction, the mitochondrial matrix acidification evidenced in our present work might be involved, as previously shown following anticancer drug exposure (Lemarié et al., 2011).

We previously demonstrated that NHE1 was activated following B[a]P metabolism in F258 cells, thus leading to an intracellular alkalinization (Huc et al., 2004, 2007). As NHE1 activation has been involved in cell malignant transformation, notably by regulating the glycolytic shift through an intracellular alkalinization (Reshkin et al., 2000), NHE1 inhibition by cariporide was tested toward the B[a]P-increased lactate release. NHE1 activation was thus found to be required for the glycolytic shift in F258 and Hepa1c1c7 cells, in which B[a]P induced an alkalinization (Holme et al., 2007; Huc et al., 2004, 2007). This is in line with the fact that cytosolic alkalinization has been already shown to stimulate glucose utilization in cultured hepatocytes (Peak M et al., 1992). This role of NHE1 in B[a]P-induced glycolytic shift might stem from the known pH-dependent regulation of glycolytic enzyme activities like phosphofructokinase (Alfarouk et al., 2014; Reshkin et al., 2014). It is worth emphasizing here that an increased activity of hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase was found in lung of B[a]P-treated mice (Rády et al., 1980). In the present study, NHE1 was also found to control the B[a]P-increased glucose oxidation. A role for active NHE1 in upregulating glucose oxidation and the TCA cycle rate has been previously reported in heart from NHE1 transgenic mice, thereby participating in the prevention of the ischemia-reperfusion injury (Mraiche et al., 2011). Under our conditions, one might then propose an effect of pH on enzyme activities involved in TCA cycle. Besides NHE1, our results also pointed out a role for AhR in the glycolytic shift. As this receptor was previously found to be responsible for membrane remodeling and hence NHE1 activation (Tekpli et al., 2010, 2012), one might then propose an AhR action on the glycolytic shift *via* an effect on NHE1 activity. Other possibilities might be through the previously described role of AhR on  $\Delta\Psi_m$  (Tappenden et al., 2011), or on glucose metabolism enzyme expression (Sato et al., 2008).

A strong toxicity of OXPHOS inhibitors was observed in the absence of B[a]P, suggesting that under normal conditions, F258 cell mitochondria were fully functional. Treatment with B[a]P (50 nM) interestingly allowed cell to survive under these conditions of OXPHOS inhibition; this thus suggested that this carcinogen was favoring a cell adaptation and a metabolic plasticity that confer a better energetic phenotype in order to survive under deleterious conditions. As demonstrated in our study, B[a]P did induce both an increased glycolysis and a stimulation of the TCA cycle. The B[a]P-induced Warburg effect was found to favor cell survival since F258 cells forced to rely on OXPHOS (replacement of glucose by galactose) became more sensitive to the B[a]P toxic action, despite similar intracellular ATP concentrations. Protection afforded by glycolysis has been interestingly seen only with the low dose of B[a]P; this thus suggested that for higher concentrations, pro-survival signals might be overwhelmed by death signals, despite higher lactate levels. It is noteworthy that a faster induction of cell death was observed in F258 cells with higher B[a]P concentration (Huc et al., 2004). How glycolysis initiates a survival pathway under our conditions remains to be investigated. One clue might come from the pentose phosphate pathway. Indeed, even though this pathway seems rather weakly induced under our conditions, it might be sufficient to increase intracellular levels of glutathione or of reducing equivalents such as NADPH (Bolaños et al., 2010), thereby limiting the oxidative stress reported upon B[a]P exposure (Gorria et al., 2006). Another possibility might rely on the stimulation of the TCA cycle due to mitochondrial complex II dysfunction. Indeed, inhibition of the complex II SQR activity has been previously shown to increase the succinate level; this can then favor cell survival notably by activating the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) transcription factor (Selak et al., 2005). Based upon the fact that succinate level increased upon B[a]P, one might then suppose an activation of HIF-1 $\alpha$  with resulting glycolysis stimulation (Parks et al., 2013). Complex II dysfunction has also been related to mitochondrial ROS production, with either

“deleterious ROS” or “signaling ROS”, supporting either cell death or survival, respectively (Dröse, 2013). As mitochondrial  $O_2^-$  production was previously found in exposed F258 cells (Huc et al., 2006), one might have then supposed a role for  $O_2^-$  in triggering survival pathways; however, it is noteworthy that the use of anti-oxidant molecules prevented B[a]P-induced cell death, thus pointing to “deleterious” rather than “signaling” ROS (Huc et al., 2004, 2006, 2007). In this context, complex II dysfunction might play an ambivalent role, in both survival and cell death, upon B[a]P exposure. Regarding cell phenotype, it is noteworthy that a recent work has shown that chronic exposure to low concentrations of B[a]P did not alter hepatocarcinoma cell growth but promoted cell migration and invasion both *in vitro* and *in vivo* (Ba et al., 2015). The fact that we observed both a glycolytic shift-supported survival and an EMT under our experimental conditions might thus indicate a link between these two phenomena, as already reported (Jiang et al., 2015). This link will have to be further explored. Nevertheless, NHE1 inhibition was presently found to prevent both the B[a]P-induced glycolytic shift and cell migration (Supplementary Figure 4A), even though no effect on cell spreading-related cell index, nor on EMT markers was observed (Supplementary Figure 4B, C).

In conclusion, we have evidenced here that B[a]P exposure can trigger the cancer related metabolic hallmark, to support hepatic cell survival, ultimately leading to modifications of cell phenotype and migration. We therefore assume that such effects might also participate to the already well described carcinogenic potential of B[a]P.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Dr JE Ricci (University Nice-Sophia Antipolis) for his scientific advice on lactate measurements. KH was a recipient of a fellowship from French Ministry for Education

and Research. We are also very grateful to the Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Rennes (University of Rennes 1) for further financial support to KH, and to the Université Paris Descartes for the PhD fellowship of ES. We wish to thank the Ligue contre le cancer (committees 22,35,49,85 ; DLG, OS), the French National Academy of Medicine (DLG), ANR (STEATOX project; “ANR-13-CESA-0009” ; DLG, BM, OS), the ITM0-cancer Plan Cancer 2009-2013 (SB), “Region Provence Alpes Côte d'Azur”, “Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur”, “Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement Provence Alpes Côte d'Azur” (BM, plan régional santé environnement PRSE PACA n°6.3.3.3 and 6.3.3.4), for financial support to our work.

## REFERENCES

- Albayrak T., Scherhammer V., Schoenfeld N., Braziulis E., Mund T., Bauer M.K., Scheffler I.E., Grimm S. 2003. The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction. *Mol Biol Cell*. 14, 3082-3096.
- Alfarouk K.O., Verduzco D., Rauch C., Muddathir A.K., Adil H.H., Elhassan G.O., Ibrahim M.E., David Polo Orozco J., Cardone R.A., Reshkin S.J., Harguindey S. 2014. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1, 777-802. Erratum in: *Oncoscience*. 2015, 2, 317.
- Ba Q., Li J., Huang C., Qiu H., Li J., Chu R., Zhang W., Xie D., Wu Y., Wang H. 2015. Effects of benzo[a]pyrene exposure on human hepatocellular carcinoma cell angiogenesis, metastasis, and NF- $\kappa$ B signaling. *Environ. Health Perspect*. 123, 246-254.
- Bénit P., Letouzé E., Rak M., Aubry L., Burnichon N., Favier J., Gimenez-Roqueplo A.P., Rustin P. 2014. Unsuspected task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1837, 1330-1337.
- Bock K.W., Köhle C. 2005. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem Pharmacol.*, 69, 1403-1408.
- Bolaños J.P., Almeida A., Moncada S. 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem. Sci*. 2010 35, 145-149.
- Boroughs L.K., DeBerardinis R.J. 2015. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol*. 17, 351-359.
- Dendelé B., Tekpli X., Sergent O., Dimanche-Boitrel M.T., Holme J.A., Huc L., Lagadic-Gossmann D. 2012. Identification of the couple GSK3 $\alpha$ /c-Myc as a new regulator of hexokinase II in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. In Vitro*. 26, 94-101.
- Doktorova T.Y., Yildirimman R., Vinken M., Vilardell M., Vanhaecke T., Gmuender H., Bort R., Brolen G., Holmgren G., Li R., Chesne C., van Delft J., Kleinjans J., Castell J., Bjoquist P., Herwig R., Rogiers V. 2013. Transcriptomic responses generated by hepatocarcinogens in a battery of liver-based in vitro models. *Carcinogenesis*., 34, 1393-1402.
- Dröse S. 2013. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1827, 578-587.
- Fantin V.R., Berardi M.J., Scorrano L., Korsmeyer S.J., Leder P. 2002. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell*, 2, 29-42.
- Fidelman M.L., Seeholzer S.H., Walsh K.B., Moore R.D. 1982. Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle. *Am. J. Physiol*. 242, C87-C93.
- Forgacs A.L., Burgoon L.D., Lynn S.G., LaPres J.J., Zacharewski T. 2010. Effects of TCDD on the expression of nuclear encoded mitochondrial genes. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 246, 58-65.
- Gorria M., Huc L., Sergent O., Rebillard A., Gaboriau F., Dimanche-Boitrel M.T., Lagadic-Gossmann D. 2006. Protective effect of monosialoganglioside GM1 against

chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1343-1353.

Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. 2014. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science*, 345, 1250256.

Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.

Hardonnière K., Huc L., Podechard N., Fernier M., Tekpli X., Gallais I., Sergent O., Lagadic-Gossmann D. 2015. Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential. *Toxicol. In Vitro.*, 29, 1597-1608.

Heerdt B.G., Houston M.A., Augenlicht L.H. 2006. Growth properties of colonic tumor cells are a function of the intrinsic mitochondrial membrane potential. *Cancer Res.*, 66, 1591-1596.

Hernandez-Boussard T.M., Hainaut P. 1998. A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database. *Environ. Health Perspect.* 106, 385-391.

Hillegass J.M., Murphy K.A., Villano C.M., White L.A. 2006. The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease. *Biol. Chem.*, 387, 1159-1173.

Holme J.A., Gorria M., Arlt V.M., Ovrebø S., Solhaug A., Tekpli X., Landvik N.E., Huc L., Fardel O., Lagadic-Gossmann D. 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepalclc7 cells. *Chem. Biol. Interact.*, 167, 41-55.

Hooven L.A., Baird WM. 2008. Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. *Toxicology*, 249, 1-10.

Huc L., Gilot D., Gardyn C., Rissel M., Dimanche-Boitrel M.T., Guillouzo A., Fardel O., Lagadic-Gossmann D. 2003. Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells: role of p53 and pHi changes. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1010, 167-170.

Huc L., Lemarié A., Guéraud F., Héliers-Toussaint C. 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.*, 26, 709-717.

Huc L., Rissel M., Solhaug A., Tekpli X., Gorria M., Torriglia A., Holme J.A., Dimanche-Boitrel M.T., Lagadic-Gossmann D. 2006. Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J. Cell. Physiol.*, 208, 527-537.

Huc L., Sparfel L., Rissel M., Dimanche-Boitrel M.T., Guillouzo A., Fardel O., Lagadic-Gossmann D. 2004. Identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J.* 18, 344-346.

Huc L., Tekpli X., Holme J.A., Rissel M., Solhaug A., Gardyn C., Le Moigne G., Gorria M., Dimanche-Boitrel M.T., Lagadic-Gossmann D. 2007. c-Jun NH2-terminal kinase-related Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 67, 1696-1705.

Hwang M.S., Schwall C.T., Pazarentzos E., Datler C., Alder N.N., Grimm S. 2014. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx targets cardiolipin to disintegrate respiratory chain complex II for cell death induction. *Cell Death Differ.* 21, 1733-1745.

Jiang L., Xiao L., Sugiura H., Huang X., Ali A., Kuro-O M., Deberardinis R.J., Boothman D.A. 2015. Metabolic reprogramming during TGFβ1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 34, 3908-3916.

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

Kalkhof S., Dautel F., Loguercio S., Baumann S., Trump S., Jungnickel H., Otto W., Rudzok S., Potratz S., Luch A., Lehmann I., Beyer A., von Bergen M. 2015. Pathway and time-resolved benzo[a]pyrene toxicity on Hepa1c1c7 cells at toxic and subtoxic exposure. *J. Proteome Res.*, 14, 164-182.

Kotliarova S., Pastorino S., Kovell L.C., Kotliarov Y., Song H., Zhang W., Bailey R., Maric D., Zenklusen J.C., Lee J., Fine H.A. 2008. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res.*, 68, 6643-6651.

Kroemer G., Pouyssegur J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 13, 472-482.

Lemarie A., Huc L., Pazarentzos E., Mahul-Mellier A.L., Grimm S. 2011. Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell. Death Differ.*, 18, 338-349.

Li L., Li W. 2015. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol. Ther.*, 150, 33-46.

Marroquin L.D., Hynes J., Dykens J.A., Jamieson J.D., Will Y. 2007. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.* 97, 539-547.

Meyer J.N., Leung M.C., Rooney J.P., Sandoel A., Hengartner M.O., Kisby G.E., Bess A.S. 2013. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol. Sci.*, 134, 1-17.

Mraiche F., Wagg C.S., Lopaschuk G.D., Fliegel L. 2011. Elevated levels of activated NHE1 protect the myocardium and improve metabolism following ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 50, 157-164.

Parks S.K., Chiche J., Pouyssegur J. 2013. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 13, 611-623.

Peak M., al-Habori M., Agius L. 1992. Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalization in mediating the effects of insulin. *Biochem. J.*, 282, 797-805.

Rády P., Arany I., Boján F., Kertai P. 1980. Effect of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals on the activities of four glycolytic enzymes in mouse lung. *Chem. Biol. Interact.*, 31, 209-213.

Reshkin S.J., Bellizzi A., Caldeira S., Albarani V., Malanchi I., Poignee M., Alunni-Fabbroni M., Casavola V., Tommasino M. 2000. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.*, 14, 2185-2197.

Reshkin S.J., Greco M.R., Cardone R.A. 2014. Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 369(1638), 20130100.

Robey R.B., Weisz J., Kuemmerle N.B., Salzberg A.C., Berg A., Brown D.G., Kubik L., Palorini R., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Colacci A., Mondello C., Raju J., Woodrick J., Scovassi A.I., Singh N., Vaccari M., Roy R., Forte S., Memeo L., Salem H.K., Amedei A., Hamid R.A., Williams G.P., Lowe L., Meyer J., Martin F.L., Bisson W.H., Chiaradonna F., Ryan E.P. 2015. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis*, 36 Suppl 1:S203-S231.

Salazar I., Pavani M., Aranda W., Maya J.D., Morello A., Ferreira J. 2004. Alterations of rat liver mitochondrial oxidative phosphorylation and calcium uptake by benzo[a]pyrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198:1-10.

Sánchez-Cenizo L., Formentini L., Aldea M., Ortega A.D., García-Huerta P., Sánchez-Aragó M., Cuezva J.M. 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem.*, 285, 25308-25313.

Sato S., Shirakawa H., Tomita S., Ohsaki Y., Haketa K., Tooi O., Santo N., Tohkin M., Furukawa Y., Gonzalez F.J., Komai M. 2008. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 229, 10-19.

Schieke S.M., Ma M., Cao L., McCoy J.P. Jr., Liu C., Hensel N.F., Barrett A.J., Boehm M., Finkel T. 2008. Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.*, 283, 28506-28512.

Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D., Boulahbel H., Watson D.G., Mansfield K.D., Pan Y., Simon M.C., Thompson C.B., Gottlieb E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7, 77-85.

Soga T. 2013. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.*, 104, 275-281.

Tappenden D.M., Lynn S.G., Crawford R.B., Lee K., Vengellur A., Kaminski N.E., Thomas R.S., LaPres J.J. 2011. The aryl hydrocarbon receptor interacts with ATP5a1, a subunit of the ATP synthase complex, and modulates mitochondrial function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254, 299-310.

Tekpli X., Huc L., Sergent O., Dendelé B., Dimanche-Boitrel M.T., Holme J.A., Lagadic-Gossmann D. 2012. NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo[a]pyrene-related apoptotic function. *Cell. Physiol. Biochem.*, 29, 657-666.

Tekpli X., Rissel M., Huc L., Catheline D., Sergent O., Rioux V., Legrand P., Holme J.A., Dimanche-Boitrel M.T., Lagadic-Gossmann D. 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243, 68-76.

Weber K., Ridderskamp D., Alfert M., Hoyer S., Wiesner R.J. 2002. Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells. *Biol Chem.*, 383, 283-290.

Wojtovich A.P., Smith C.O., Haynes C.M., Nehrke K.W., Brookes P.S. 2013. Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1827, 598-611.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1. Effects of B[a]P on cell phenotype and cell cycle in F258 cells.** Cells were treated or not with B[a]P 50 nM. (A) Overall cell integrity was evaluated by optical microscopy (x74 magnification) following 48 hours of co-treatment with antimycin A (AA, 25  $\mu$ M) /Oligomycin A (OA, 8  $\mu$ M) to inhibit OXPHOS, in presence or not of B[a]P (50 nM). (B) Cell attachment and spreading was analyzed by monitoring impedance of the cell monolayer with XCELLigence technology. The inset histogram plots the slope of cell index measured in presence or not of B[a]P. N = 5 independent experiments. (C) Impact of B[a]P on cell cycle progression was evaluated by flow cytometry following IP staining. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . DMSO vs B[a]P-treated cells.

**Fig.2. B[a]P triggers an EMT-like process and increases migratory potential in F258 cells.** (A) E-cadherin and vimentin protein levels were analyzed by western blotting after 24 and 48 of B[a]P treatment (50 nM or 1  $\mu$ M). (B) Cell invasion and migration assays were monitored using XCELLigence technology from B[a]P (500 nM)-treated cells. The inset histogram plots the slope of cell index measured in presence or not of B[a]P. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ : DMSO vs B[a]P-treated cells.

**Fig.3. B[a]P induces a metabolic reprogramming towards glycolysis in F258 cells.** Impact of B[a]P (50 nM, 48h) on oxygen consumption rate (OCR; A) and extracellular acidification rate (ECAR; B) was analyzed in F258 cells, using XF Cell Mito Stress Test Kit on Seahorse XF24 technology. (A) Oligo: oligomycin A; AA: antimycin A. (B) OCR values were plotted as a function of ECAR values in order to identify the metabolic profile of F258 cells exposed to B[a]P as compared to control (DMSO). (C) Extracellular lactate release was measured

following a 48h-exposure to B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M). Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, unless otherwise plotted.

**Fig.4. B[a]P is responsible for TCA cycle enhancement by targeting mitochondrial complex II in F258 cells.** (A-C) Effects of B[a]P (50 nM, 48h) on substrate oxidation (A,B: glucose; C: pyruvate) were evaluated by quantifying transfer of  $^{14}\text{C}$  from substrates to  $\text{CO}_2$ . (B) Impact of OXPHOS inhibitors (ROT: rotenone, 1  $\mu$ M; AA: Antimycin A, 1  $\mu$ M) on the B[a]P (50 nM, 48h)-induced increase of glucose oxidation level. (D) Effects of B[a]P on the enzymatic activities of complex II. F258 cells were treated with B[a]P (50 nM, 48h) and mitochondria were isolated. The SQR (succinate coenzyme Q oxidoreductase) and SDH (succinate dehydrogenase activity) activities of complex II were assessed by specific assays, as described in Material & Methods. Results, expressed as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments, represent Complex II relative activities compared to the related control cells. \* $p < 0.05$  compared with the related control. (E) Effects of B[a]P on fumarate and succinate levels were determined. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, except for (B) inhibitor vs B[a]P+inhibitor-treated cells

**Fig.5. Metabolic reprogramming upon B[a]P exposure involved both AhR and NHE1 pathways.** (A) To test the role of B[a]P metabolism and NHE1 in glycolytic shift, F258 cells were pre-treated for 1h with chemical inhibitors,  $\alpha$ -naphthoflavone (NF) (10 $\mu$ M) or cariporide (Cari) (10  $\mu$ M), respectively, prior to co-exposure to B[a]P (50 nM, 48h). Following treatments, extracellular lactate release was monitored. (B) Effects of AhR activation by TCDD (10 nM, 48h) on the extracellular lactate release in F258 cells; the effects of B[a]P were plotted for comparison. (C) Effects of AhR inhibition using siRNA strategy on the extracellular lactate release in B[a]P (50 nM, 48h)-treated F258 cells. SiNT: non targeting SiRNA; SiAhR: AhR targeting siRNA. (D) Effects of NHE1 inhibition by cariporide (10  $\mu$ M)

on the B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 48h)-induced extracellular lactate release in Hepa1c1c7 cells. (E) Effects of NHE1 inhibition by cariporide (10  $\mu$ M) on the B[a]P (50 nM, 48h)-elicited increase in glucose oxidation quantified by the release of radiolabelled CO<sub>2</sub> in F258 cells. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, unless otherwise quoted.

**Fig.6. The glycolytic reprogramming occurring upon B[a]P exposure acts a survival signal in F258 cells.** Cells were forced to rely on OXPHOS pathways by substituting glucose by galactose in culture medium. Cells were cultured under these conditions for at least 3 passages before starting the experiments. (A) ATP levels following B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M; 72h) treatments were compared between glucose and galactose conditions. (B) Extracellular lactate release was evaluated under galactose or glucose conditions in the presence or not of B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 48h). (C) B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 72h)-induced cell death was analyzed by counting cells with fragmented or condensed chromatin following Hoechst 33342 staining, in galactose or glucose media. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, unless otherwise quoted.

## SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

**Figure S1:** ssGSEA analysis of the metabolic shifts induced by B[a]P in the human hepatocarcinoma HepG2 cell line. Heatmap of ssGSEA score of the published microarray dataset GSE40117 (Doktorova et al., 2013) showing the metabolic shift signatures affected by B[a]P (2  $\mu$ M, 72h) exposure.

**Figure S2.** (A) Kinetic effect of B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M) on the extracellular lactate release analyzed in F258 cells. (B) Effect of another well-known carcinogenic PAH, dimethylbenzanthracene (DMBA; 50 nM, 48h), on the extracellular lactate release analyzed in F258 cells. (C) Extracellular lactate release in response to B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 48h) was measured in HepG2 cells. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, unless otherwise quoted.

**Figure S3.** (A) Impact of B[a]P (50 nM, 48h) on glucose uptake in F258 cells. Glucose uptake was measured as described in Supplementary Material and Methods. Cytochalasin B (CB) was used to inhibit glucose uptake. (B) Effects of B[a]P (50 nM, 48h) exposure on complex I activity in F258 cells. (C) Impact of B[a]P (50 nM, 48h) on mitochondrial matrix pH. This pH was ratiometrically monitored by flow cytometry using two mitochondrial plasmids coding for fluorescent subunit 8A of the cytochrome c oxidase. FCCP was used as a positive control of mitochondrial matrix acidification. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \*\*\* $p < 0.001$ : DMSO vs B[a]P-treated cells, unless otherwise quoted.

**Figure S4.** Effects of NHE1 inhibition on the B[a]P-induced changes in cell phenotype. (A) To test the role of NHE1, F258 cells were pre-treated for 1h with the specific NHE1 inhibitor cariporide (Cari) (10  $\mu$ M), and then co-treated with B[a]P 500nM. Cell migration was analyzed using XCelligence methodology, as described in Material and Methods. The cell index corresponding to the slope of the curve was plotted for B[a]P-treated cells in presence

or not of cariporide, as compared to respective controls prior to co-exposure to B[a]P (50 nM, 48h). Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. (B) Effects of NHE1 inhibition by cariporide (10  $\mu\text{M}$ ) on the B[a]P (50 nM or 1  $\mu\text{M}$ , 48h)-increased vimentin protein level, analyzed either by western blotting or by immunocytochemistry. (C) Effects of NHE1 inhibition by cariporide (10  $\mu\text{M}$ ) on the B[a]P (50 nM, 48h)-elicited increase in cell spreading analyzed by XCelligence methodology. \* $p < 0.05$ : DMSO vs B[a]P-treated cells.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

### *In silico Tests for B[a]P-affected metabolic signatures*

The single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) method was applied on the published microarray dataset of B[a]P-exposed HepG2 GSE40117 (Doktorova et al., 2013), to determine the B[a]P-affected metabolic signatures. Data were downloaded from the InSilico DB Genomic Datasets Hub (<https://insilicodb.com/>; Coletta et al., 2012), and analyzed by applying the ssGSEA method available in the GenePattern software. (<http://genepattern.broadinstitute.org/>). The ssGSEA method provides a representation of the gene expression data by assigning to each individual sample an Enrichment Score (ES) with respect to each gene set. ssGSEA. Heatmap visualization of the ssGSEA was then performed using GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/>).

### *Glucose uptake assay*

Glucose uptake was measured according to Kim et al (Kim et al., 2010) with some modifications. Briefly, after 48 hours of B[a]P treatment, cells were washed twice with serum-free, glucose-free William's medium supplemented with 0.1% BSA and pre-incubated with this medium for 3 hours at 37°C. After a starvation period, cells were washed twice with Krebs-Ringer-Bicarbonate buffer (KRB), and incubated further for 30 minutes at 37°C with 100 nM insulin (or not, for the negative control). To initiate glucose uptake, 2-deoxy-[1-<sup>3</sup>H]-glucose (1μCi/mL), diluted in 0.1mM 2-deoxyglucose solution, was added to each well and further incubated for 10 minutes at 37°C. After incubation, cells were washed twice with ice-cold KRB and solubilized with 0.1N NaOH. Half of the content of each well was transferred into scintillation vials, and 10 mL of scintillation cocktail, Ultima Gold LLT, were added. The radioactivity incorporated into cells was measured using a liquid scintillation counter (Hewlett

Packard, USA). The protein content was assayed for each point on the remaining half with the Pierce, bicinchoninic acid enzymatic kit (Pierce, France) after cell lysis in 0.1N NaOH. The results were expressed as the radioactivity incorporated related to the protein content.

### ***Evaluation of mitochondrial pH***

The  $pH_m$  was monitored using two mitochondrial targeted plasmids (Aequotech, Ferrara, Italy), both coding for cytochrome c oxydase subunit 8A mRNA: the mt-HA-eGFP pH-sensitive Green fluorescent protein ( $\lambda_{ex.}=488$  nm,  $\lambda_{em.}=509$  nm), and the mt-dsRed pH-insensitive red fluorescent protein ( $\lambda_{ex.}=530$  nm,  $\lambda_{em.}=583$ ) used as a transfection rate control. Production of these two plasmids was performed using the PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Life Technologies). F258 cells were co-transfected for 24h with both plasmids using X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent (Roche, Meylan, France). After 24 h, cells were treated with B[a]P for 24 or 48h. Cells were then collected, re-suspended in Cell Suspension Buffer (see Huc et al., 2004, for CSB composition), and analysed by flow cytometry. Mean Fluorescence Intensity (MFI) was determined on 40 000 cells using a FACSCalibur (BD Bioscience). Fluorescence intensity was analyzed using the standard laser 488 nm laser filter configuration with FL1-H and FL3-H channels for monitoring mt-HA-eGFP and for DsRed respectively. A standard curve was generated *in situ* on control cells exposed to calibration buffers containing ionophores nigericin and monensin, allowing the conversion of the MFI ratio 530/640 into pH value. FCCP, a mitochondrial protonophore, was used as control for  $pH_m$  acidification.

### ***Evaluation of complex I activity***

Complex I activity was measured on frozen cells as described (Bénil et al., 2008). In brief, cells were mixed with 1 ml extraction buffer containing 0.25 M sucrose 20 mM Tris-HCl, 40

mM KCl, 2 mM EGTA, 1 mg/ml BSA, pH 7.2 (medium A). Digitonin (0.01% final) and Percoll (10%) were added for 5 min on ice. Cells were subsequently spun down at 2,500 g for 5 min and washed two times with 1 ml of medium A. Permeabilized cell pellet was subsequently used for enzyme measurement.

## ***References***

- Bénit P., Slama A., Rustin P. 2008. Decylubiquinol impedes mitochondrial respiratory chain complex I activity. *Mol. Cell. Biochem.*, 314, 45-50.
- Coletta A., Molter C., Duqué R., Steenhoff D., Taminau J., de Schaetzen V., Meganck S., Lazar C., Venet D., Detours V., Nowé A., Bersini H., Weiss Solís D.Y. 2012. InSilico DB genomic datasets hub: an efficient starting point for analyzing genome-wide studies in GenePattern, Integrative Genomics Viewer, and R/Bioconductor. *Genome Biol.*, 13, R104.
- Doktorova T.Y., Yildirimman R., Vinken M., Vilardell M., Vanhaecke T., Gmuender H., Bort R., Brolen G., Holmgren G., Li R., Chesne C., van Delft J., Kleinjans J., Castell J., BJORQUIST P., Herwig R., Rogiers V. 2013. Transcriptomic responses generated by hepatocarcinogens in a battery of liver-based in vitro models. *Carcinogenesis.*, 34, 1393-1402.
- Kim J., Park J., Kim E.-K., Lee J., Lee S., Jung J., You G., Park S., Suh P.-G., Kim H. 2010. Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells. *J. Cell. Physiol.*, 223, 771-778.

Figure 1

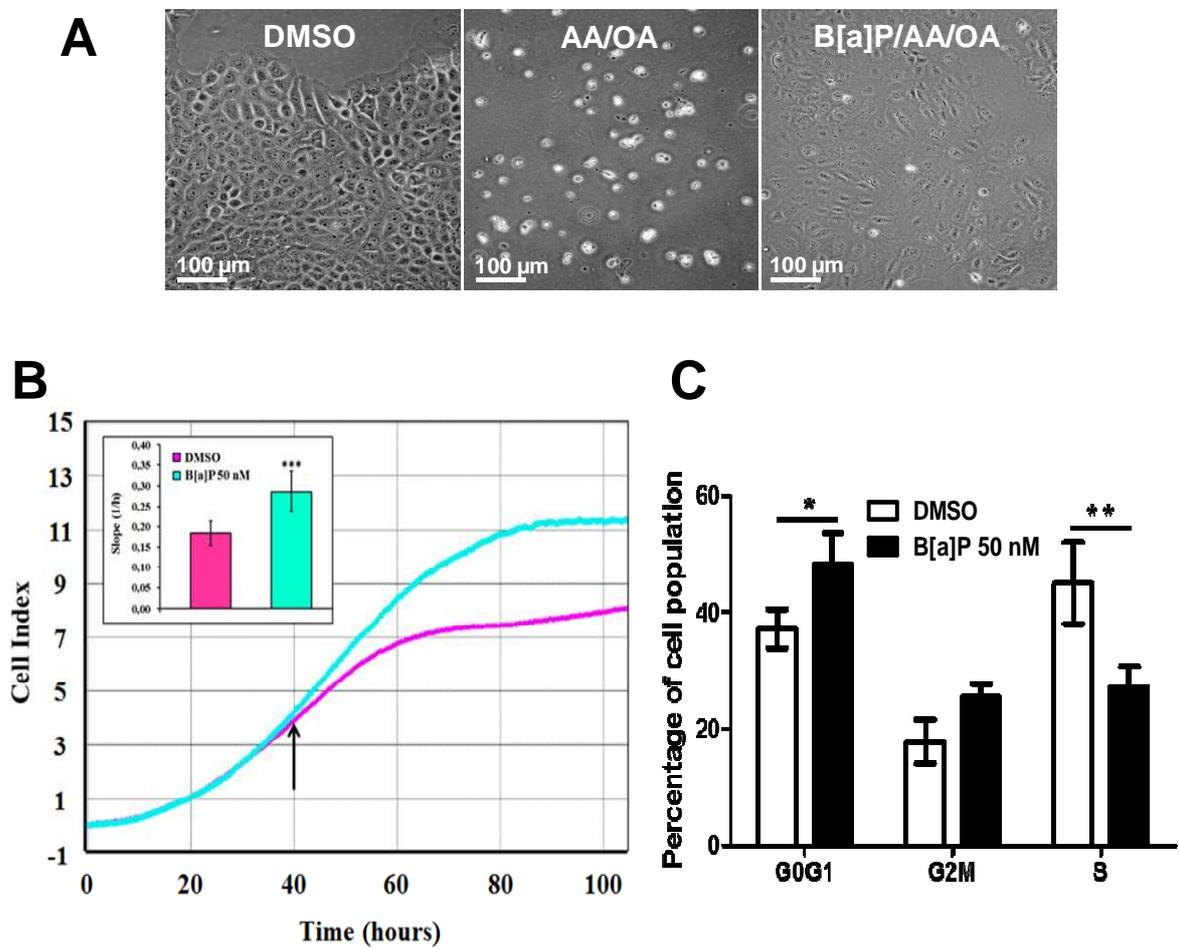


Figure 2

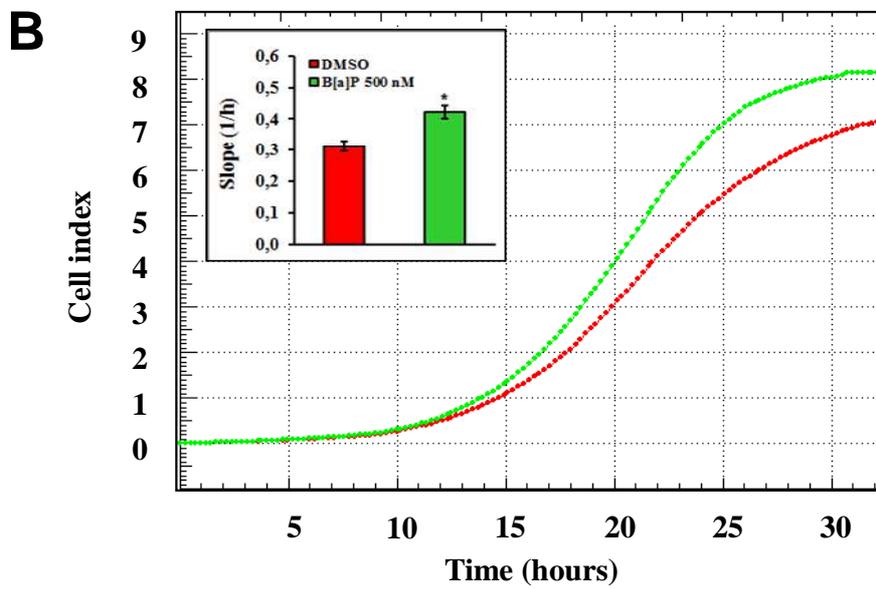
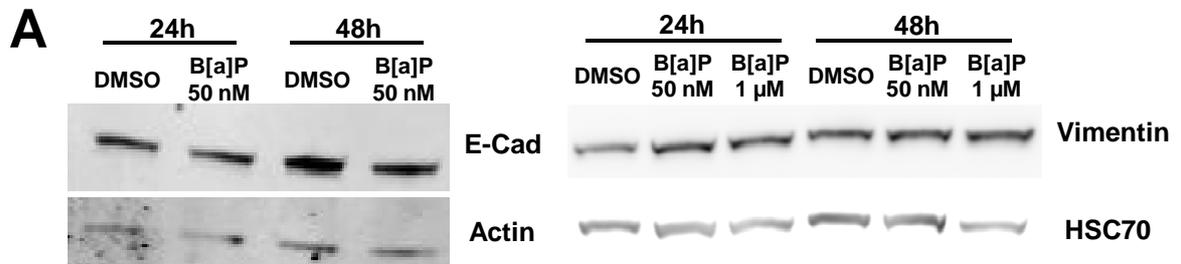
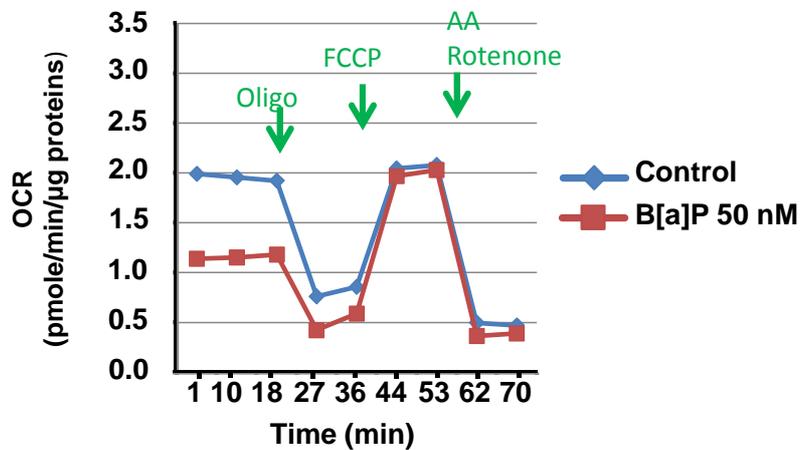
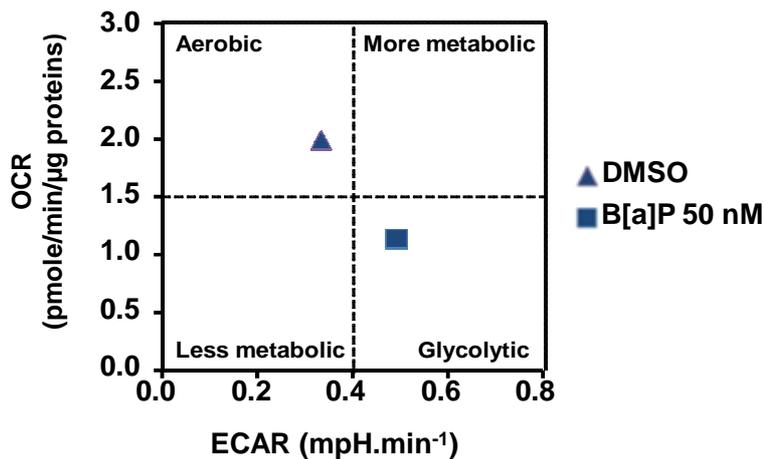


Figure 3

A



B



C

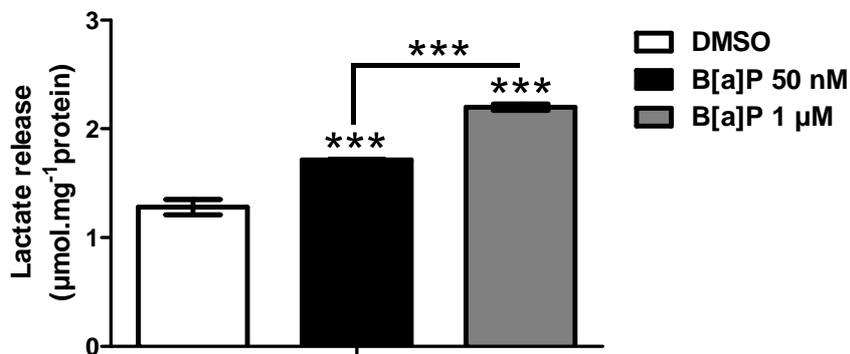


Figure 4

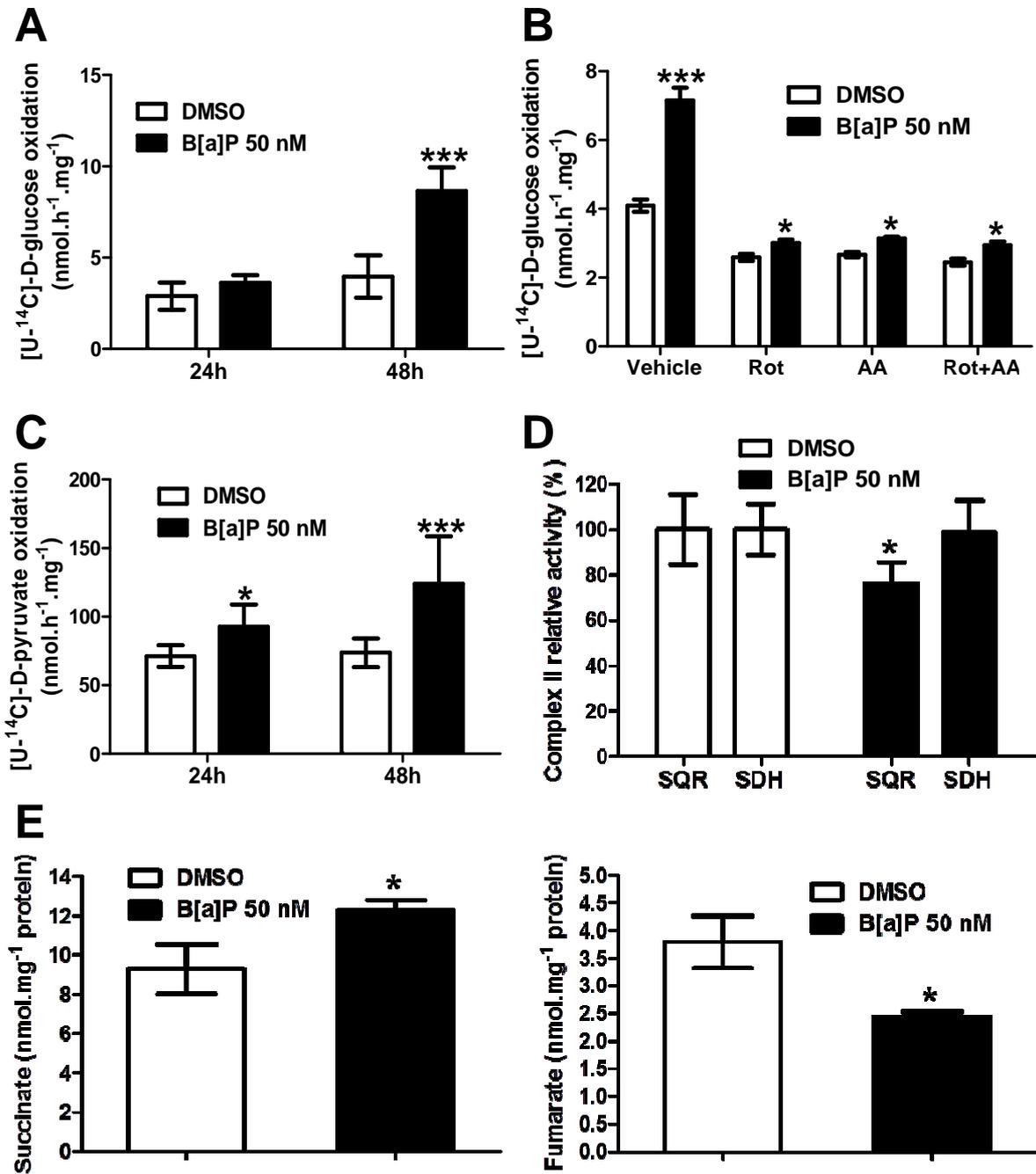


Figure 5

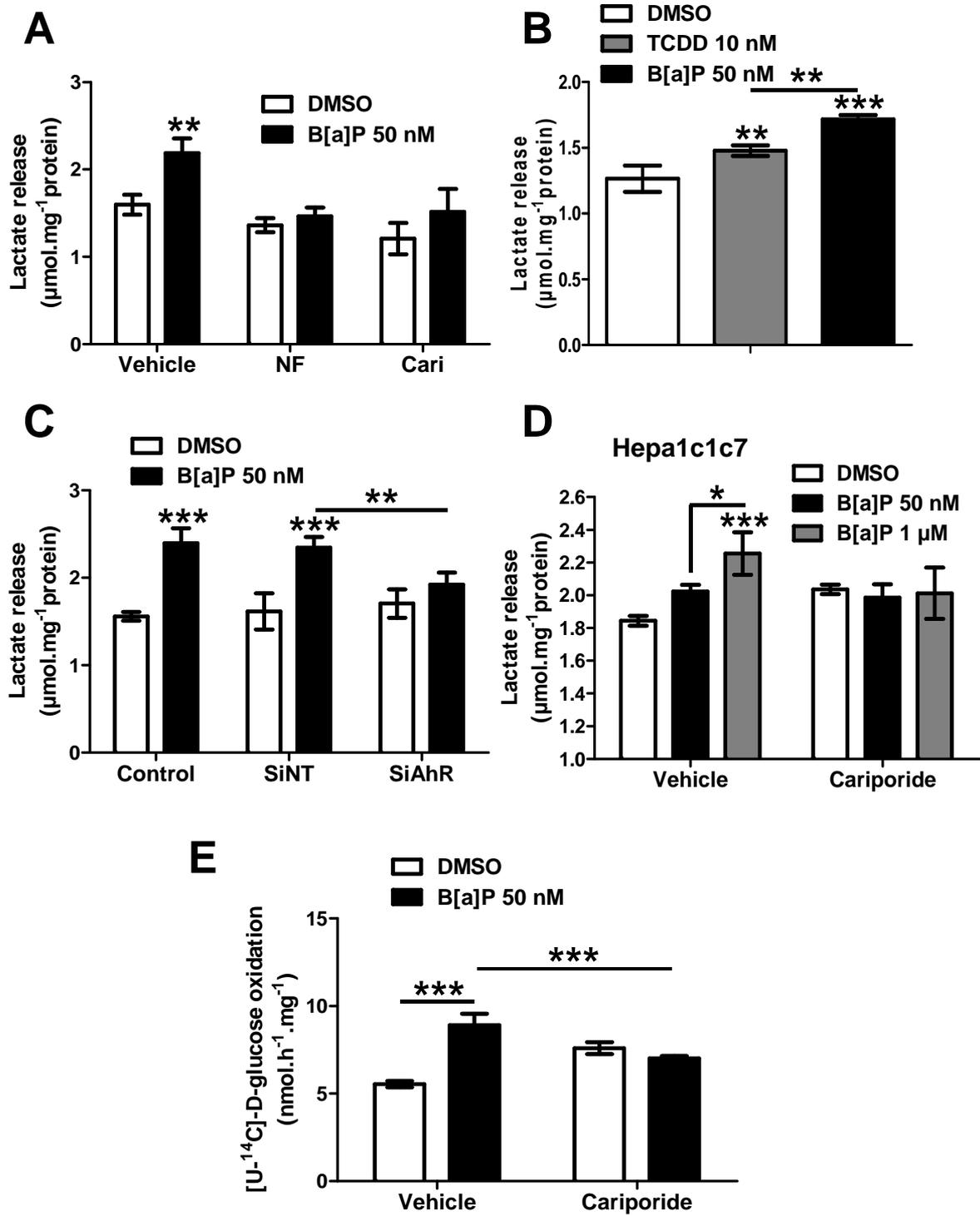
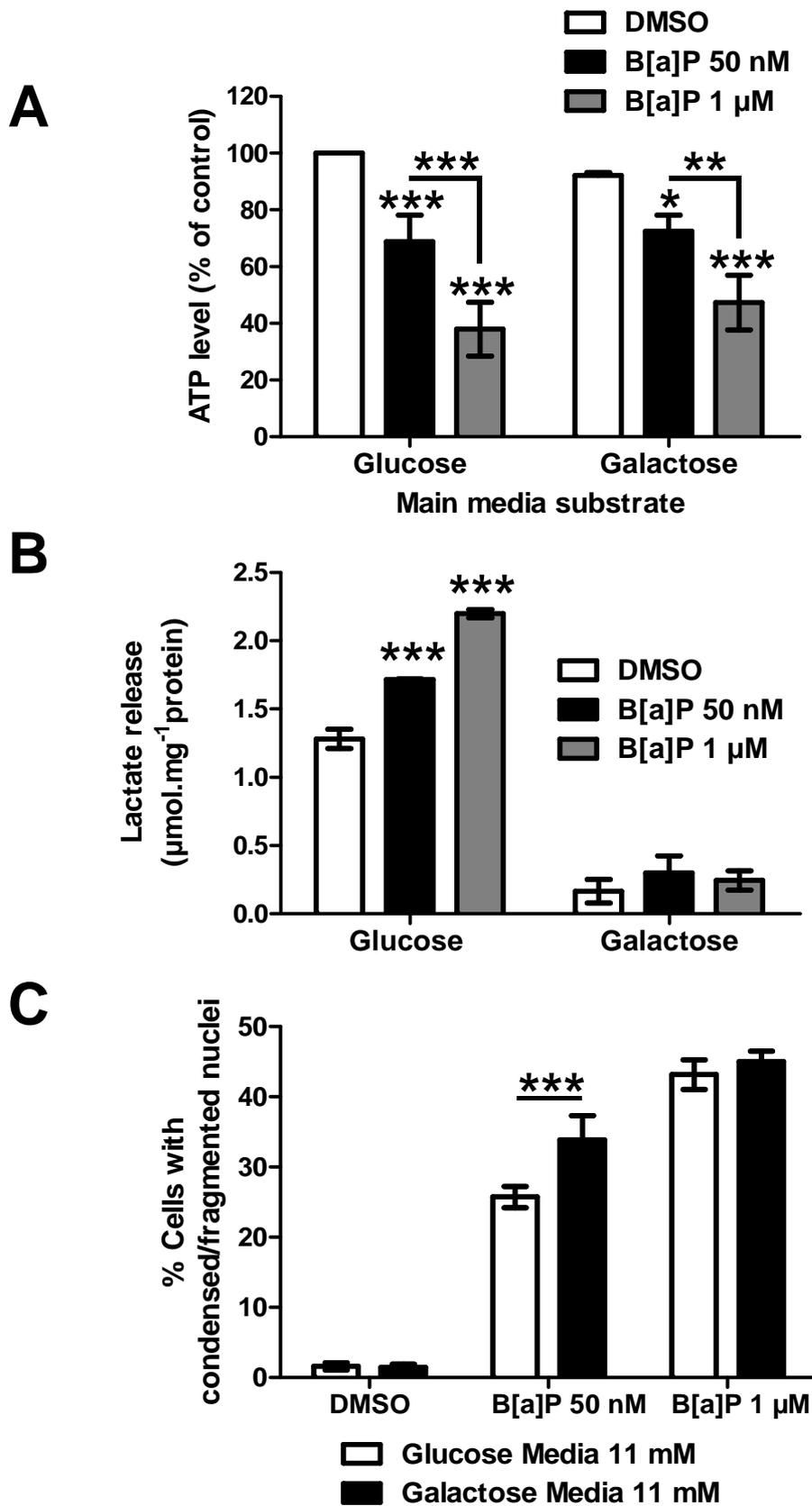
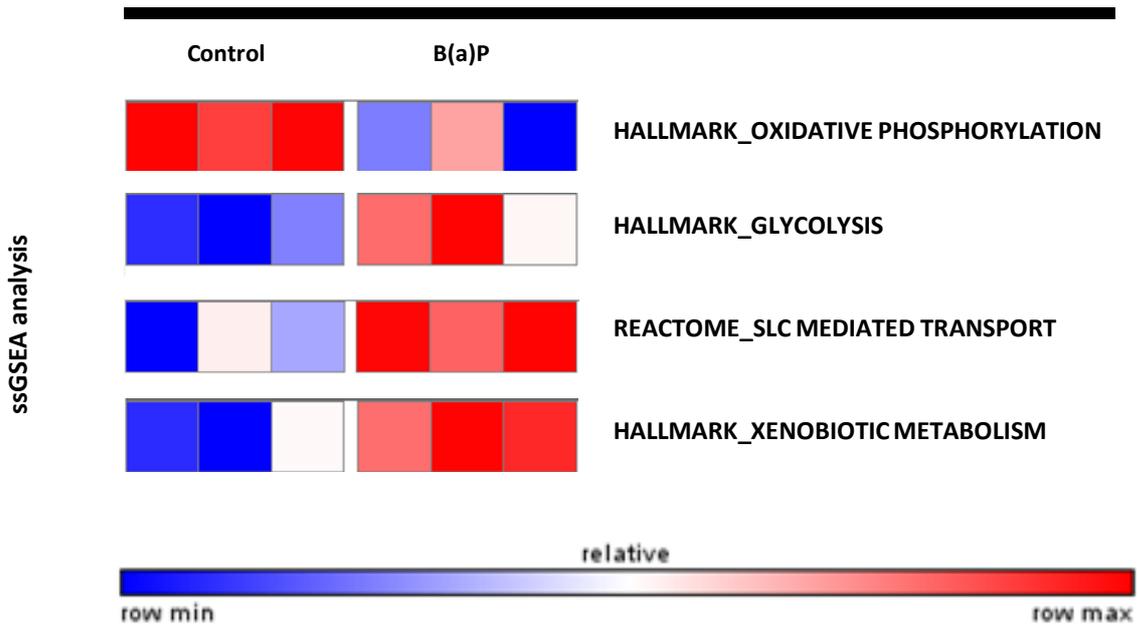


Figure 6

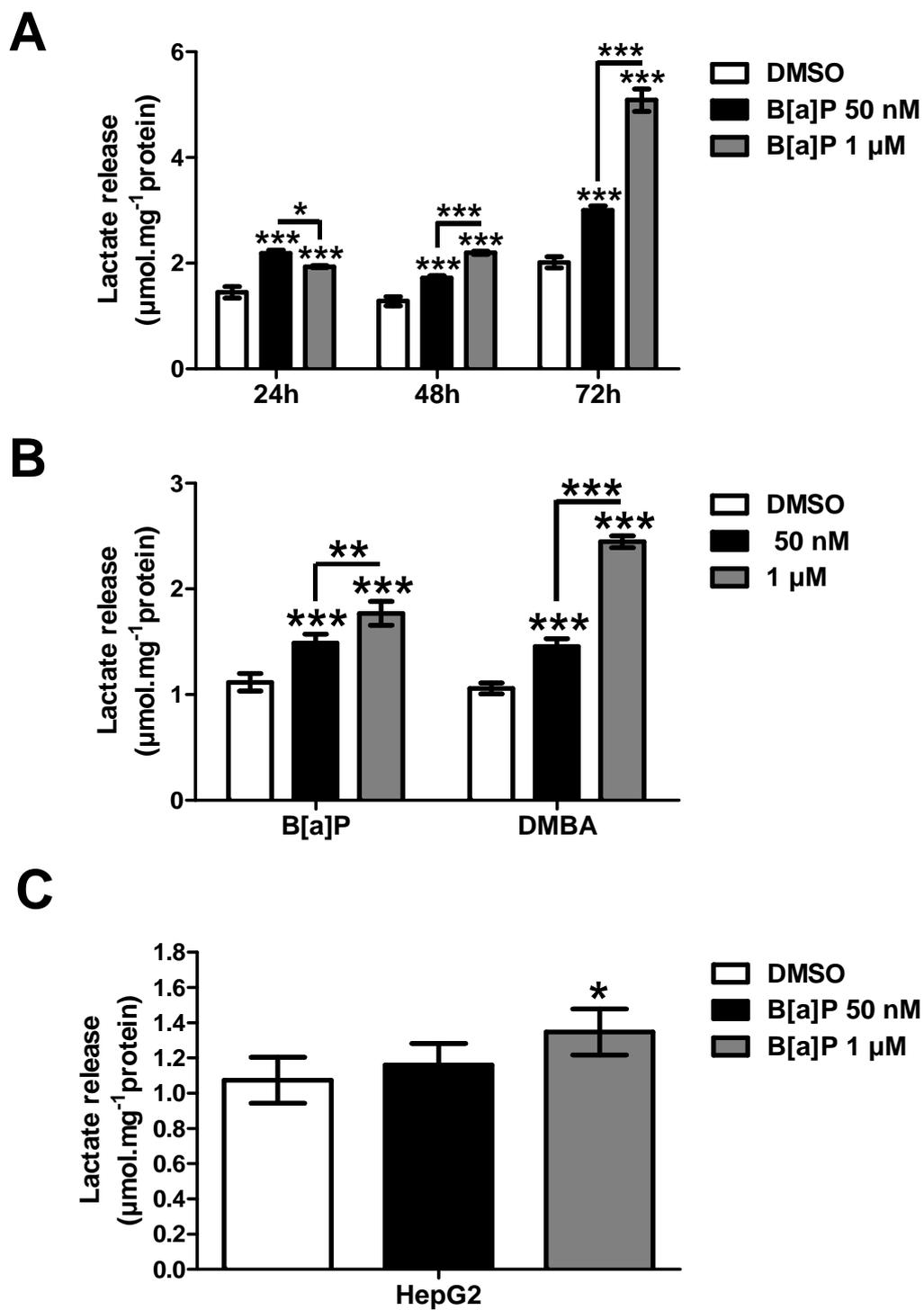


# **Supplementary figures**

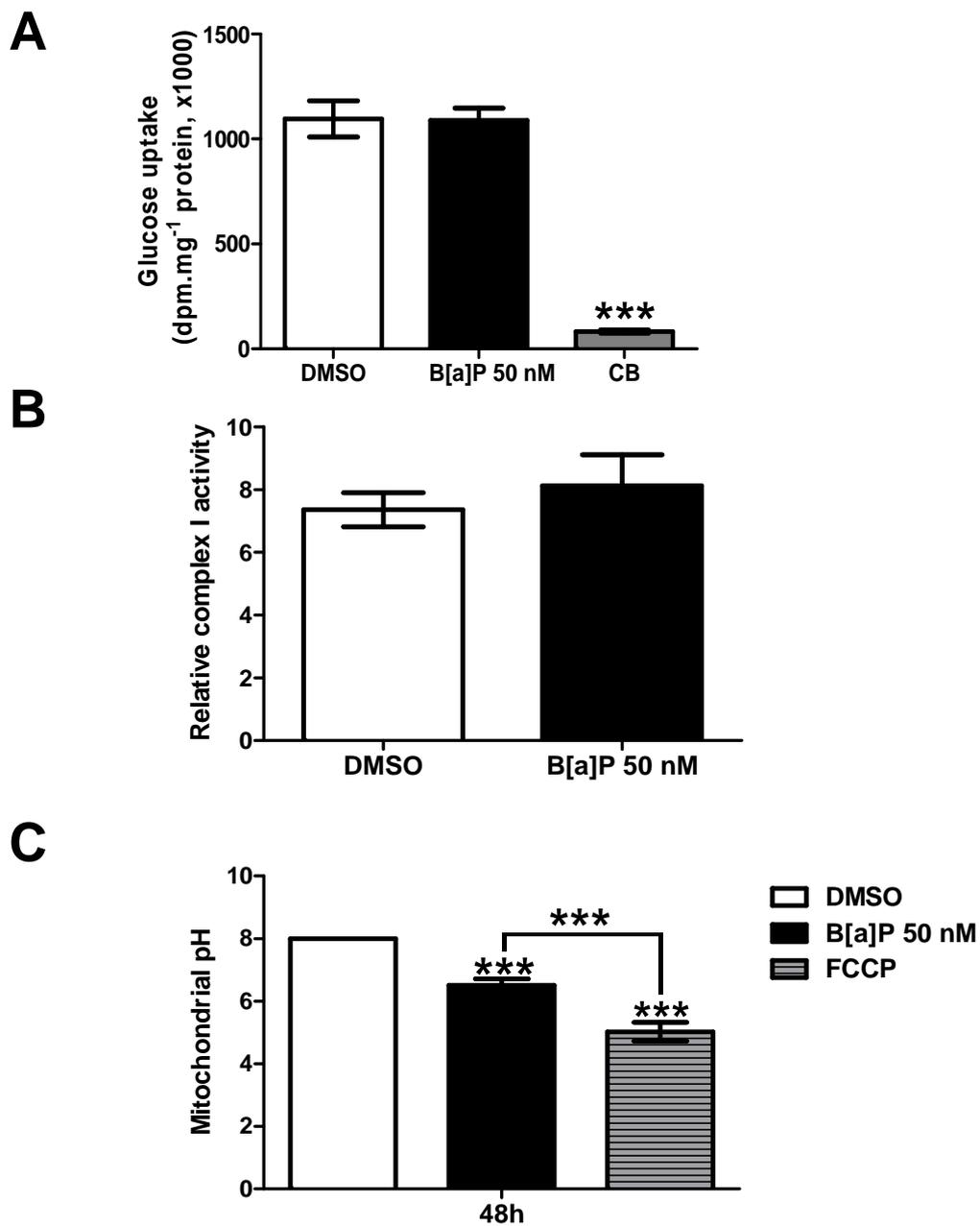
HEPG2 cells



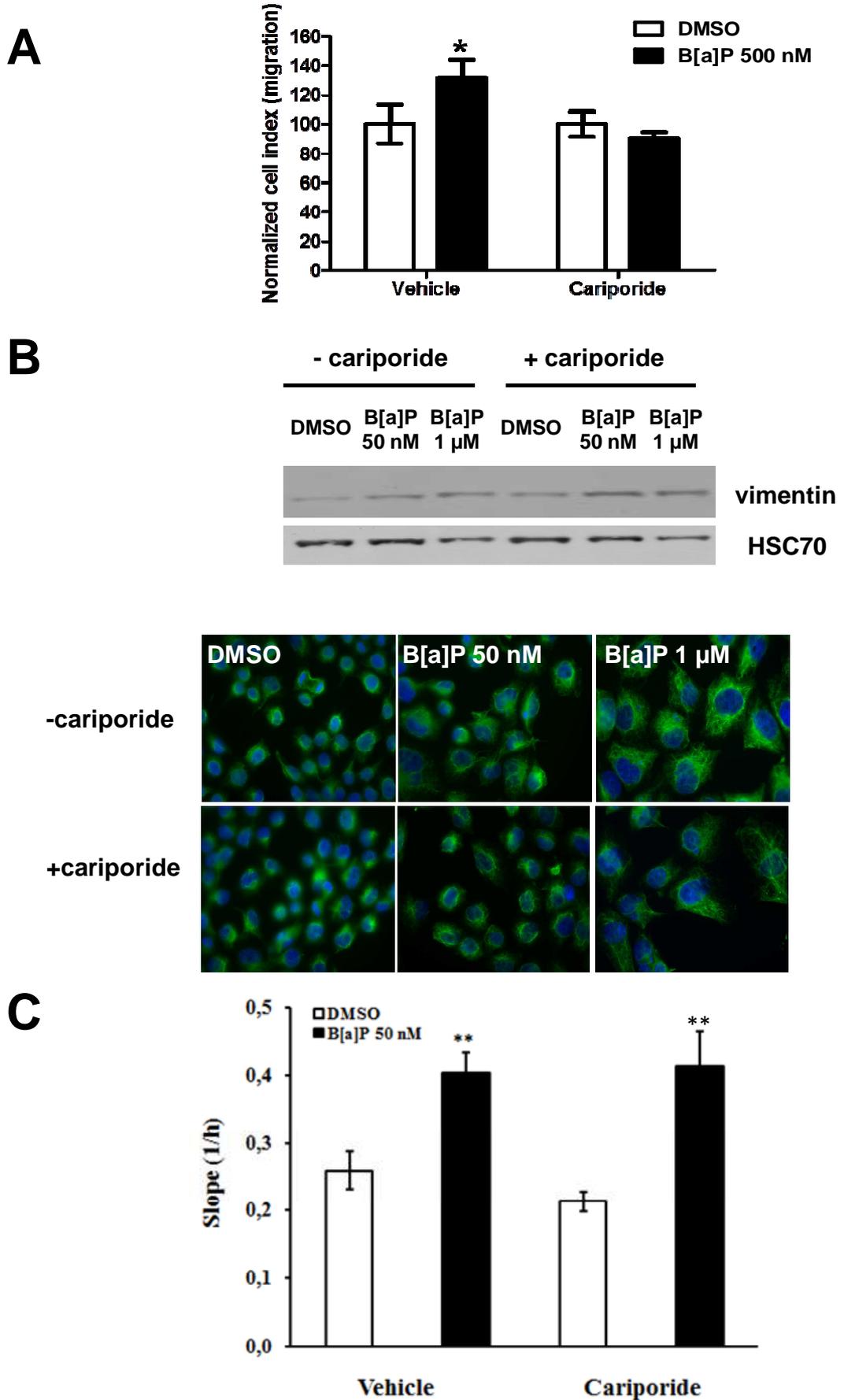
## Supplementary Figure 2



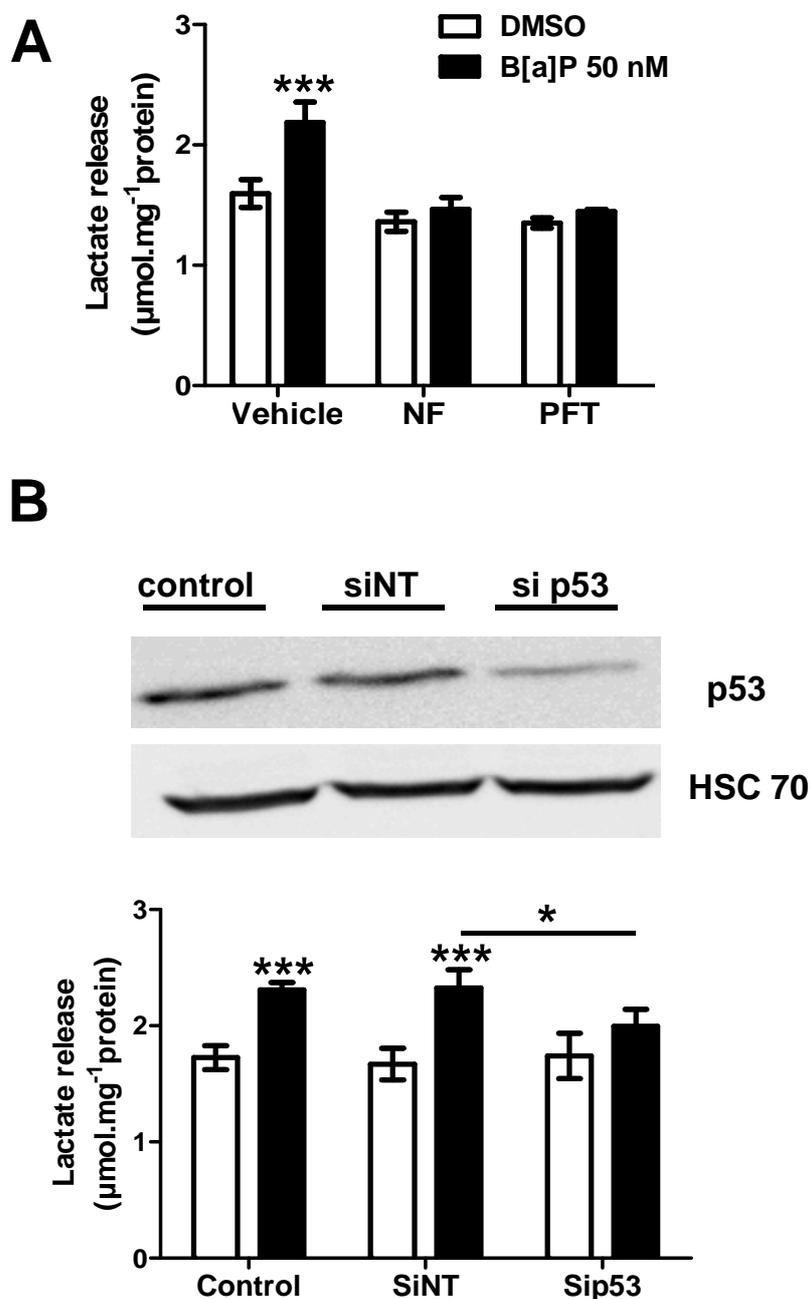
### Supplementary Figure 3



## Supplementary Figure 4



## Résultats complémentaires article 2



**Rôle de p53 dans la reprogrammation métabolique.** A] Effet de l'inhibition du métabolisme du B[a]P par l' $\alpha$ -naphthoflavone (10  $\mu$ M) et de p53 par la pifithrine- $\alpha$  sur l'accumulation de lactate dans le milieu extracellulaire dans les cellules F258 exposées au B[a]P.  $n \geq 3$ . B] Effet de l'extinction de p53 par siRNA (sip53) sur l'accumulation de lactate dans le milieu extracellulaire. siNT : siNonTargeting.  $n \geq 3$ . \* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* $< 0,001$ , cellules témoins versus cellules traitées, excepté indication sur le graphe.

## Article 3

### **Role for the ATPase inhibitory factor 1 in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype**

(Article en préparation)

#### **Contexte scientifique de l'étude**

En lien avec l'hyerpolarisation (Hardonnière *et al.*, 2015), la reprogrammation métabolique ainsi que les modifications phénotypiques préalablement caractérisées (Article 2), nous avons cherché à approfondir dans ce projet les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modifications. Dans ce contexte, IF1, l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, nous est apparu comme un candidat potentiel. En effet, l'expression d'IF1 est connue pour être augmentée dans le cancer. Une telle augmentation a déjà été décrite comme jouant un rôle dans l'hyerpolarisation, ainsi que dans l'effet warburg (Formentini *et al.*, 2012). Dès lors, un effet du B[a]P sur ce régulateur physiologique clé pourrait avoir des incidences majeures dans les effets cancérigènes de contaminant.

#### **Objectifs**

Identifier une cible mitochondriale du B[a]P, pouvant être à l'origine de ses effets sur le métabolisme énergétique.

#### **Résumé des principaux résultats**

Nous avons démontré que le B[a]P, mais aussi d'autres hydrocarbures sont à l'origine d'une forte augmentation de l'expression d'IF1 dans le foie. Cette augmentation reposerait notamment sur l'activation du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique par le B[a]P, et ce, indépendamment du RAh. Celle-ci participe à la reprogrammation métabolique, identifiée dans l'article 2, capable de promouvoir la survie sous l'effet du B[a]P.



## **Role for the ATPase inhibitory factor 1 in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype**

Kévin Hardonnière<sup>1,2</sup>, Morgane Fernier<sup>1,2</sup>, Isabelle Gallais<sup>1,2</sup>, Baharia Mograbi<sup>3</sup>, Elise Saunier<sup>4</sup>, Normand Podechard<sup>1,2</sup>, Eric Le Ferrec<sup>1,2</sup>, Paule Bénit<sup>5,6</sup>, Pierre Rustin<sup>5,6</sup>, Nathalie Grova<sup>7</sup>, Brice Appenzeller<sup>6</sup>, Agnès Burel<sup>2</sup>, Martine Chevanne<sup>1,2</sup>, Odile Sergent<sup>1,2</sup>, Laurence Huc<sup>7</sup>, Sylvie Bortoli<sup>4</sup>, Dominique Lagadic-Gossmann<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Inserm U1085, Institut de Recherche en Santé, Environnement, Travail, Rennes, France;*

<sup>2</sup>*Université de Rennes 1, Biosit UMS3080, 35043 Rennes Cédex, France;*

<sup>3</sup>*Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, 2. Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Centre Antoine Lacassagne, Nice, F-06107, France.*

<sup>4</sup>*INSERM UMR-S 1124, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saint-Pères, Paris, France*

<sup>5</sup>*Hôpital Robert Debré, INSERM UMR1141, Bâtiment Ecran, 48 Boulevard Sérurier, Paris 75019, France.*

<sup>6</sup>*U.F.R. de Médecine Université Paris Diderot, Paris 75019, France*

<sup>7</sup>*HBRU, Luxembourg Institute of Health, 29, rue Henri Koch, L-4354 Esch-sur-Alzette, Luxembourg*

<sup>8</sup>*INRA UMR 1331 ToxAlim, Toulouse, France*

**Running title:** IF1-mediated metabolic switch promotes cell survival upon B[a]P exposure

### **To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Dominique Lagadic-Gossmann,  
Inserm U1085 / IRSET,  
Université Rennes 1,  
Faculté de Pharmacie,  
2 avenue du Professeur Léon Bernard,  
35043 Rennes cedex, France;  
Tel: +33(0)223234837;  
Fax: +33(0)2 23 23 50 55  
E-mail: dominique.lagadic@univ-rennes1.fr

**Key words:** benzo[a]pyrene, IF1, glycolytic reprogramming, carcinogenesis, liver

## ABSTRACT

Most tumors undergo metabolic reprogramming towards glycolysis, known as the Warburg effect, to support anabolic growth and escape from cell death. This reprogramming has emerged as a core hallmark of cancer cells. Overexpression of IF1, the physiological inhibitor of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase, has been related to the acquisition of the Warburg phenotype, as well as to the epithelial to mesenchymal transition in cancer. In line with this, IF1 appears to be a relevant marker in cancer. Despite environmental contributions to cancer development are now widely accepted, little is known about the underlying intracellular mechanisms, especially in link with energy metabolism. Among these environmental pollutants, benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype molecule of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), is a well-known human carcinogen. Besides apoptotic signals, B[a]P is also suspected to induce survival signals in liver cells, both likely involved in cancer promotion. Our previous works showed that B[a]P altered mitochondrial functions, leading to a membrane hyperpolarization and a Warburg effect, whereby supporting cell survival. The present study therefore aimed at further elucidating the molecular mechanisms involved in the B[a]P-induced metabolic reprogramming, by testing the possible involvement of IF1. We presently demonstrate, both *in vitro* and *in vivo*, that several PAHs to which humans are commonly exposed, including B[a]P, strongly increase IF1 expression. Such an increase, which might rely on  $\beta$ 2-adrenergic receptor activation, notably participates to the B[a]P-induced Warburg phenotype and cell survival in liver cells. By identifying IF1 as a target of PAHs, this study provides new insights about how environmental factors may contribute to the establishment of the core hallmarks of cancer.

## INTRODUCTION

The mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase, also called F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase or complex V, is a master regulator of energy production and cell fate (Sanchez-Arago et al., 2013a; Long et al., 2015). Indeed, besides its well-recognized physiological role in oxidative phosphorylation (OXPHOS) as the major cell producer of ATP, this enzyme has been implicated in the morphogenesis of mitochondrial cristae (Paumard et al., 2002), in the formation of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) during cell death (Bernardi et al., 2015; Rasola and Bernardi, 2015), and the metabolic reprogramming of tumor cells (Martínez-Reyes and Cuezva, 2014). Regarding this latter point, a decreased OXPHOS capacity and subsequent drop in ATP synthesis due to complex V inhibition, appears to be responsible for metabolic shift toward aerobic glycolysis, better known as the Warburg effect (Sánchez-Aragó et al., 2013a). In this context, OXPHOS inhibition is often linked to an apoptotic-resistant phenotype, and complex V regulation thus appears to be essential for tumor progression (Martínez-Reyes and Cuezva, 2014; Sánchez-Aragó et al., 2013a).

Among the known regulators of the H<sup>+</sup>-ATP synthase, the physiological inhibitor ATP Inhibitory Factor 1 (IF1) has been implicated in the short-term regulation of energy metabolism by directly interacting with the  $\beta$ F1 subunit of the H<sup>+</sup>-ATP synthase, whereby inhibiting its ATP hydrolysis activity (Zanotti et al., 2004). IF1 protein, in its native form, is present as a tetramer in mitochondrial matrix at a physiological matrix pH of ~8.0. When matrix acidifies, a release of the active dimeric form of IF1 then occurs, triggering the IF1 binding to the  $\beta$ -F1 subunit, thus preventing complex V reverse activity (Cabezón, et al., 2000). Indeed, complex V activity is able to switch from ATP synthase activity to ATP hydrolase activity under certain circumstances in order to sustain mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and hence mitochondria integrity; however, this could inexorably sentence

cell to death due to ATP hydrolysis if no complex V inhibition occurs (Hassinen et al., 1998; Campanella et al., 2009a). Interestingly, an increased IF1 level has been involved in the establishment of a high  $\Delta\psi_m$  and the conservation of ATP (Formentini et al., 2012; Green and Grover, 2000). Besides, Sánchez-Aragó and coworkers have evidenced high IF1 levels in diverse human cancers, thus highlighting its relevance as a predictive marker for clinical outcome (Sánchez-Aragó et al., 2013b). In line with this, a recent paper described an increased expression of IF1 in human hepatocellular carcinoma (HCC), such a high increase being predictive of poor survival (Song et al., 2014). Regarding IF1 roles in tumorigenesis, its overexpression has been involved in the acquisition by cells of several cancer phenotype hallmarks, including metabolic reprogramming (Sánchez-Cenizo et al., 2010; Formentini et al., 2012; Song et al., 2014), increased proliferation and invasion (Song et al., 2014), and the cell evasion from death (Faccenda et al., 2013a & b). Angiogenesis would be also targeted by IF1 (Song et al., 2014). Altogether these observations emphasize the key role IF1 might play in tumor development. However, the precise mechanisms underlying the IF1 increase during tumorigenesis remain poorly described.

One clue might come from exposure to environmental carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These contaminants are notably found in cigarette smoke, exhaust fumes, grilled meat, among others, and have been related to tumor development, notably in lung and liver (Motorykin et al., 2013; Wester et al., 2012). We recently demonstrated that a low concentration of benzo[a]pyrene (B[a]P), the prototype molecule of PAHs which is classified as human carcinogen of group 1 by IARC (IARC 2010), not only hyperpolarized mitochondria (Hardonnière et al., 2015), but also induced both a mitochondrial matrix acidification, a glycolytic shift, and an EMT/migration phenotype of liver cells (Hardonnière et al., in preparation). Furthermore, a reverse activity of complex V upon B[a]P exposure, was also previously suggested (Huc et al., 2006). As all these cell

responses have been linked to IF1, the present study therefore aimed at testing the impact of B[a]P on IF1 level, and at evaluating its role in the survival process elicited by this contaminant in the F258 rat liver epithelial cell line. Here we show that PAHs can increase IF1 content in liver, both *in vitro* and *in vivo*. We further demonstrate that this IF1 up-regulation would rely on the activation by B[a]P of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor pathway, and that it would be determinant in both the glycolytic shift and cell survival elicited by this compound.

## Experimental procedures

### *Chemicals*

Benzo[a]pyrene (B[a]P),  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF), 1-Methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (CH223191), pifithrin  $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ), N-Acetyl-3-(nitrosothio)-DL-valine, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin solution (TCDD) were all purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). N-(Diaminomethylene)-4-isopropyl-3-(methylsulfonyl)benzamide (Cariporide) was purchased from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). Hoechst 33342 and MitoTracker Red CMXRos were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). All these products were used as a stock solution in DMSO; final concentration of this vehicle in culture medium was <0.00005% (v/v), and control cultures received the same concentration of vehicle as treated cultures.

Monoclonal mouse anti-ATP synthase subunit beta (A-21351) antibody was purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). Polyclonal rabbit anti-ATPIF1 antibody (#8528; Cell Signalling) and monoclonal rabbit anti-COX IV antibody (#4850; Cell Signalling) were purchased from Ozyme (Montigny-le-Bretonneux, France). Monoclonal mouse anti-HSC70 antibody (sc-7298) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Polyclonal rabbit anti-AhR antibody (BML-SA550) was purchased from Enzo Life Sciences (Lyon, France). Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were purchased from DAKO (Les Ulis, France).

The sixteen PAHs (nNaphthalene, fluorene, acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo [g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]perylene and

dibenzo[a,h]anthracene) used for the animal experiment model were purchased from Sigma Aldrich (Bornem, Belgium).

### ***Gene expression microarray and Gene Set Enrichment Analyses (GSEA)***

We used GSEA (Subramanian et al., 2005) to identify pathways and gene sets associated with variation in ATPIF1 mRNA expression levels across 91 hepatocellular carcinomas (GSE20238, Mínguez, et al., 2011). Genes were sorted by their concordance (Pearson correlation) with ATPIF1 mRNA expression levels across tumors, and GSEA was used to evaluate gene sets enriched for either negatively or positively correlated genes. Published GSE20238 was downloaded from the InSilico DB Genomic Datasets Hub (<https://insilicodb.com/>; Coletta et al., 2012), and analyzed by using the GSEA v2.07 software (<http://www.broad.mit.edu/gsea>, Subramanian et al., 2005). To account for gene-gene correlations in the enrichment analysis, GSEA p values were computed with respect to a null distribution obtained from 1,000 randomizations of the patient-phenotype labels. Enriched gene sets were selected on the basis of statistical significance (false discovery rate FDR q value < 0.25, and normalized p value < 0.05). Heatmap visualization was performed using GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/>).

### ***Animal Experimentation***

*Animal housing.* Fifteen Long Evans rats (female of 180-200g, Elevage Janvier, St Berthevin, France) were housed in plastic cages under controlled environment (12h light/dark cycle, light on at 7 am, temperature of  $22 \pm 2$  °C and relative humidity of  $40 \pm 5\%$ ). Food and water were available *ad libitum*. The water, food and oil were tested according to NF ISO 15302 to confirm that all these matrices were PAH-free down to a detection limit of 10 ng/L of water

and 1 ng/g of fat. Rats were acclimatized to the animal facility for 2 weeks prior to experiment start.

Animal treatment. The mix of PAHs was composed of the 16 compounds pointed out by the US-Environmental Protection Agency (US-EPA) for their toxicity, and prepared in vegetable oil weekly (ISIO4, Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France). Five rats were randomly allocated to each of the experimental groups receiving 0.04 and 0.8 mg/kg body weight of each compound included in the mix, by oral administration, 3 times per week over a 90-day period. The exposure levels were far below the LD50 for all the molecules tested and determined on the basis of a previous study (Grova et al., 2013). Control rats received the vehicle only. At the end of the 90 days-experiment, the rats were euthanized 3 hours after the last gavage by using carbon dioxide. A cardiac puncture was performed after the 3 minutes of unconsciousness and just before the heart stopped beating. All procedures were conducted in compliance with European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and authorized by the Ministry of Agriculture, Grand-Duchy of Luxembourg.

Tissue collections. Livers were dissected and weighed. The base of the left lateral liver lobe was divided into 5 equivalent pieces of 100 mg each which were placed in cryogenic tubes, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before analysis.

Liver sample preparation. These 100 mg of tissue were lysed on ice, using a potter, in 600  $\mu\text{l}$  of RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche), and were sonicated for 10 seconds. Lysates were then centrifuged at 14,000g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resulting supernatants were collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  or used immediately. Samples were finally diluted fiftieth before protein quantification for western blotting.

### ***Cell culture***

The F258 rat liver epithelial cell line was cultured in Williams' E medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and treated 24 h following seeding as previously described (Hardonnière et al., 2015; Huc et al., 2004). F258 cells were treated with B[a]P for 24, 48 and 72 h. The mouse hepatoma cell line Hepa1c1c7 (purchased from the European Collection of Cell Culture) was maintained in MEM $\alpha$  medium with l-glutamine without ribonucleosides and deoxyribonucleosides (Gibco, Cergy Pontoise, France), and supplemented with 10% fetal calf serum and 0.1 mg/ml gentamycin, as previously described (Holme et al., 2007; Podechard et al., 2011). Cells were seeded near confluence ( $90 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) a day before treatment and the medium changed before exposures. When using inhibitors, these were added for 1 h before B[a]P treatment, for the indicated time points.

### ***RNA isolation and reverse transcription – real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis***

Total RNAs were isolated from F258 cells using the TRIzol method (Invitrogen) and were then subjected to RT-qPCR analysis, as previously described (Podechard et al., 2008). Gene-specific primers for ATP1F1 and 18S were purchased from Sigma, and the sequences used for each gene were as follows: ATP1F1: forward, ACGCCGAAGATAATGGCAGG – reverse, ATCCATGCTCTCCGACGAGT; 18S: forward, CCGGTACAGTGAAACTGCCGA – reverse, GATAAATGCACGCGTTCCCC. The amplification curves of the PCR products were analyzed with the ABI Prism SDS software using the comparative cycle threshold method. To assess the successful amplification of each target gene, a standard curve was performed for each primer set. The expression levels of target genes were normalized relative to the

expression of an 18S RNA endogenous reference and were plotted as fold change compared to control with vehicle (DMSO).

### ***Mitochondrial purification***

Briefly, after treatments cells were washed twice with cold PBS. Then, cells of each P150 were directly scratched in 1.5 ml of cold hypotonic buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 250 mM Sucrose) supplemented with 100 μM PMSF and complete protease inhibitor cocktails (Roche). Lysates were transferred in 1.5 ml tubes before starting lysis with a 26G needle syringe. Samples were kept under stirring at 4°C for 1 hour to improve lysis efficiency. A first 10 min, 750g centrifugation was performed at 4°C. Supernatants were collected and a second 25 min, 10 000g centrifugation was performed at 4°C. Mitochondria pellets were then lysed in RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche). Mitochondrial fractions were finally centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were collected and frozen at –80 °C or used immediately.

### ***Western Blot immunoassays***

For whole-cell lysates, cells were harvested and lysed for 20 min on ice in RIPA buffer supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM orthovanadate, and a cocktail of protein inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were collected and frozen at –80 °C or used immediately. Ten to 30 μg of whole-cell lysates were heated for 5 min at 100 °C, loaded in a 4% stacking gel, and then separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polymerase gel

electrophoresis (SDS–PAGE). Gels were electroblotted overnight onto nitrocellulose membranes (Millipore).

For mitochondrial lysates, 30  $\mu$ g were heated at 100°C for 5 min and then loaded on Any kD mini format precast gels (Biorad). After migration process, gels were then electroblotted on PVDF membrane (Biorad) using the Trans-Blot Transfer System (Biorad). After membrane blocking with a Tris-buffered saline (TBS) solution supplemented with 5% bovine serum albumin, membranes were then hybridized with primary antibodies overnight at 4 °C and next incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour. Immunolabeled proteins were visualized by chemiluminescence using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm). Image processing was performed using Multi Gauge software (Fujifilm).

### *Complex V activity analysis*

After treatment, F258 cells were trypsinized and centrifuged 5 min at 950 rpm. The cell pellet was re-suspended in 1 mL of extraction medium consisting of 0.25 M sucrose, 20 mM Tris, 2 mM EGTA, 40 mM KCl and 1 mg/mL BSA, 0.004% digitonin, and 10% Percoll. After 7 min incubation on ice, cells were centrifuged (5 min  $\times$  2300 g). The pellet was washed with 1 mL of extraction medium without digitonin and Percoll. The final pellet was re-suspended in 30  $\mu$ L of this medium. After Complex I activity measurement as previously described (Bénit et al., 2006), complex V activity was spectrophotometrically measured using a Cary 50 UV–visible spectrophotometer (Varian Inc, France), by following NADH oxidation in the presence of 10  $\mu$ M oligomycin, 0.5 mM ATP, 2 mM PEP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ L PK/LDH mix (Sigma). Protein concentration was measured according to Bradford method.

### ***Intracellular Calcium Measurements***

F258 cells were cultured on glass coverslips and incubated with 2.5  $\mu\text{M}$  Fura-2-AM for 20 min at 37 °C in Hepes-buffered medium (10 mM Hepes, 134.8 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4, at 37 °C) supplemented with 0.006% pluronic acid. Fura-2-loaded cells were placed in a continuously perfused recording chamber mounted on the stage of an epifluorescence microscope (Nikon Diaphot). Cells were irradiated alternately with 340 and 380 nm light, and fluorescence from the trapped dye was measured at 510 nm. The F340/F380 ratio was used to estimate the intracellular calcium [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (F340 and F380 are the fluorescence intensities at 340 and 380 nm, respectively). The monochromator and photometers, which produces and detect the fluorescence from ~10 cells in the field of view, were part of a Photon Technology International (PTI) DeltaRAM system, and the software systems to control the monochromator and to both acquire and process the data were also supplied by PTI.

### ***Extracellular lactate measurement***

Cell supernatants were collected and directly frozen after culture experiments. Quantification of L-lactate levels was based on two enzymatic reactions. Lactate dehydrogenase (LDH; Roche, Meylan, France) catalyzed the NAD<sup>+</sup>-mediated oxidation of lactate in pyruvate. A second reaction, using glutamate-pyruvate transaminase (GPT; Roche, Meylan, France) was used to shift first reaction equilibrium by transforming the entire pyruvate into alanine and  $\alpha$ -ketoglutarate. The amount of NADH formed was related to the quantity of lactate processed by these two coupled reactions. Briefly, 20  $\mu\text{L}$  of each sample were added to 200  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (620 mM sodium carbonate, 78.7 mM L-glutamate, 0.92 mM NAD, 2  $\mu\text{g}$  GPT and 2  $\mu\text{g}$  LDH). The standard range was performed using lithium lactate (Sigma Aldrich). 96 multiwell plates were then incubated at 37°C for 30 minutes before quantifying extracellular

lactate production by monitoring the increase in absorbance of NADH at 355 nm on a spectrophotometer (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, France). At least three independent experiments, performed in triplicate and normalized to their related protein contents, were carried out for each experimental condition.

### ***Transfection and RNA interference (siRNA)***

ON-TARGETplus Rat IF1 siRNA SMARTpool (si IF1), and ON-TARGETplus Non-Targeting Pool siRNA negative control (si NT) were purchased from GE Dharmacon. Basic Small interfering RNA (siRNA) resuspension was performed according to manufacturer's recommendations. Transfections of siRNA were performed in 60 mm dishes on 60% confluent F258 cells, in the presence of TransFectin Lipid Reagent (BioRad). Per dish, siRNA (100 nM) and 12.5 µl TransFectin lipid reagent were applied in a final volume of 2.5 ml Opti-MEM. Six hours later, the medium was renewed with the normal medium as described above. Cells were then passaged in order to be treated during exponential phase, as described above.

### ***Glucose oxidation***

After a 48 hour treatment with B[a]P 50 nM,  $10^6$  isolated F258 cells were incubated for 90 min at 37°C in 1 mL of Krebs-Ringer phosphate buffer containing 5 mM U-<sup>14</sup>C-glucose (11 GBq/mmol, isotopic dilution 1/1000, Perkin Elmer). CO<sub>2</sub> was recovered for 1h in benzethonium hydroxide after stopping the reaction with sulphuric acid 6N. The radioactive CO<sub>2</sub> was counted by liquid scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer).

### ***Apoptotic cell quantification by fluorescence microscopy***

Chromatin condensation and morphological changes in the nucleus were observed after staining with the chromatin dye Hoechst 33342. Following treatments, cells were stained with

50 µg/ml Hoechst 33342 in the dark for 30 min at 37 °C, and then examined under fluorescence microscopy (Olympus BX60, France). Total population was always >400 cells.

### ***ATP quantification***

ATP content was evaluated using a luminescence assay kit based upon the reaction of luciferin with ATP in the presence of luciferase (CellTiter-Glo luminescence cell viability assay, Promega), according to the manufacturer's instructions. The amount of ATP was proportional to the luminescent signal measured with a spectrophotometer (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, France).

### ***Statistical analysis***

All data were obtained from a minimum of three independent experiments. They were quoted as mean ± SD. Analysis of variance followed by Newman–Keuls test was used to test the effects of B[a]P. Differences were considered significant at the level of  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software, San Diego, USA).

## RESULTS

### **High IF1 expression is correlated with liver cancer progression and with glycolytic metabolism gene expression in human hepatocarcinoma**

We first explored by GSEA the potential contribution of *ATPIF1* expression in human liver cancer progression (91 human HCV related-hepatocarcinoma, GSE20238, Mínguez et al., 2011). As shown in Figure 1A, data mining revealed a positive correlation between high IF1 mRNA expression and the progression of non-tumor (L1) to well differentiated liver tumor (G1) (with a normalized enrichment score of 1.668, and a p value of 0.025). Consistent with the reported role of *ATPIF1* in HCC metabolism *in vitro* (Song et al., 2014), further GSEA analysis of GSE20238 pointed to a positive correlation between high IF1 expression and high glycolytic metabolism in human HCC (p: 0.02 and normalized enrichment score =1.61; Figure 1B and Supplementary Figure 1). The false-discovery rate (FDR) q-value of 0.175 is considered significant (Subramanian et al., 2005). Altogether, these studies indicate that a high expression of IF1 was associated with both liver cancer progression and high glycolysis in human.

### ***In vivo* effect of the 16 US-EPA PAH mixture and *in vitro* effect of B[a]P on hepatic IF1 expression**

Based upon the relevance of IF1 in liver tumor progression, we decided to test the *in vivo* effect of a mixture of the 16 PAHs listed as “priority” compounds by the US-EPA, due to their occurrence in the environment and their potential toxicity. Thus, the hepatic IF1 protein level was evaluated on liver tissue samples obtained from 5 rats exposed through diet for 90 days at two doses (0.04 mg/kg and 0.8 mg/kg), and compared to untreated animals. Interestingly, an increase in IF1 level was detected with a dose-dependent effect (Figure 2A).

As B[a]P is the prototype of these PAHs and as it is a well-known carcinogen for human (IARC, 2010), the effect of this molecule was tested on IF1 mRNA expression in rat liver epithelial F258 cells. Indeed, B[a]P was recently found to induce a metabolic reprogramming related to survival signal in these cells (Hardonnière et al., in preparation). After a treatment of 24 and 48h with two concentrations of B[a]P, a significant induction of IF1 mRNA expression was observed as soon as 24 h; an even stronger effect was detected at 48h with B[a]P 1  $\mu$ M (Figure 2B). Regarding protein, IF1 was detected only in the mitochondrial fraction and not in the cytosolic fraction in F258 cells (Supplementary Figure 3B). Cell exposure to both concentrations of B[a]P for 48h resulted in a dose-dependent increase in the mitochondrial IF1 protein level, as confirmed by the densitometric analysis of the ratio between IF1 and its target  $\beta$ -F1 subunit (Figure 2C). Interestingly, a band corresponding to IF1 dimers was also detected, with a stronger intensity at 1  $\mu$ M, suggesting an increased proportion of the active form of IF1 upon B[a]P exposure. A dose-dependent effect of B[a]P (48h) on the IF1 protein level was also detected in total lysates from Hepalclc7 cells (Supplementary Figure 2A), a mouse liver epithelial cell line in which B[a]P was also found to increase glycolysis (Hardonnière et al., in preparation). It is also noteworthy that two other PAHs, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and pyrene, also elicited an increase of IF1 level in F258 cells (Supplementary Figure 2B). Altogether, these results clearly point to IF1 as a new target of PAHs, in particular of B[a]P, in liver.

The fact that IF1 is the physiological inhibitor of mitochondrial complex V prompted us to evaluate the activity of this complex. We first measured the decrease in intracellular ATP levels in B[a]P (48h)-exposed cells following addition of 1  $\mu$ M oligomycin A (a specific inhibitor of complex V) during the last hour of treatment with the carcinogen. As shown in Figure 3A, the  $\Delta$ [ATP]<sub>i</sub> calculated between oligomycin A-untreated and -treated control cells was ~2 fold less compared to B[a]P-exposed cells, whatever the carcinogen concentration.

Furthermore, no significant difference was detected between oligomycin A-untreated and -treated cells in the presence of B[a]P. Based upon previous results on the role of IF1 in cancer cells (Formentini et al., 2012), this thus suggested an inhibition of complex V activity by B[a]P. Note the marked decrease in ATP level upon B[a]P treatment alone, especially at 1  $\mu$ M, a concentration known to be related to high toxicity (Hardonnière et al., in preparation). In order to validate such results, the complex V activity was then evaluated from lysates of B[a]P (50 nM, 48h)-treated cells. Data in Figure 3B showed that, although not significant, B[a]P exposure appeared to decrease complex V ATP synthase activity, by ~12% compared to control conditions. These results therefore seem to support a role for IF1 in regulating the F0F1 ATPase in B[a]P-treated cells.

### **B[a]P metabolism and its downstream targets, p53 and NHE1, are not responsible for IF1 up-regulation**

Having demonstrated that IF1 was a new molecular target for B[a]P, we next sought to identify the origin of IF1 up-regulation. We previously demonstrated that mitochondrial hyperpolarization as well as glycolytic shift induced by B[a]P in F258 cells were dependent upon B[a]P metabolism. Furthermore, AhR, NHE1 and p53 were found to be involved in these effects (Hardonnière et al., in preparation; Huc et al., 2004, 2006, 2007; Tekpli et al., 2010). We thus tested the effect of the AhR inhibitor  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF; 10  $\mu$ M) on the mitochondrial IF1 protein level.  $\alpha$ -NF did not prevent IF1 up-regulation but rather enhanced it (Figure 4A). Likewise, pifithrin- $\alpha$  (PFT; 10  $\mu$ M) used to inhibit p53, had similar effects as  $\alpha$ -NF (Figure 4A), and it was so upon treatment with cariporide (10  $\mu$ M), which inhibits NHE1 (Figure 4B). Neither carboxy-PTIO (25  $\mu$ M; to prevent nitric oxide increase), nor CH223191 (10  $\mu$ M; to inhibit AhR) prevented the B[a]P-increased mitochondrial IF1 protein level

(Supplementary Figure 3A & B). However, this latter inhibitor prevented the B[a]P-triggered induction of IF1 mRNA expression (Supplementary Figure 3C). Moreover, TCDD which is a strong activator of AhR, was ineffective towards IF1 protein level when used alone (Supplementary Figure 3A). In total, these results suggested that B[a]P enhanced the mitochondrial IF1 protein level by a pathway involving neither B[a]P metabolism, nor AhR activation.

### **The $\beta$ 2-adrenergic pathway would be involved in IF1 up-regulation upon B[a]P exposure**

The next set of experiments was performed in order to test the possible involvement of the  $\beta$ 2-adrenergic pathway in the regulation of the protein level of IF1 by B[a]P. Indeed, previous data from our group have demonstrated that B[a]P can directly bind the  $\beta$ 2-adrenoreceptor ( $\beta$ 2ADR), thus leading to an increase in intracellular calcium in HMEC cells (Mayati et al., 2012a). Interestingly, such an increase in calcium was shown to occur independently of AhR activation (Mayati et al., 2012b). In order to test the possible involvement of  $\beta$ 2ADR in the B[a]P effects on IF1, propranolol, a non-selective  $\beta$  blocker, was used to inhibit this pathway. We first showed that a pre-treatment (1h) with propranolol (10 $\mu$ M) followed by co-treatment with B[a]P (48h), prevented not only the release of lactate, especially at the lowest B[a]P concentration (Figure 5A), but also the increase in IF1 protein level (Figure 5B). The use of a selective  $\beta$ 2-blocker, ICI-118,551, gave similar results on IF1 level (n=2; data not shown). Finally, the effect of B[a]P was assayed in HEK293 cells overexpressing  $\beta$ 2ADR. Indeed, these cells are known to express a very low basal level of  $\beta$ 2ADR (von Zastrow et al., 1992); they were then transfected either with control plasmid (HEKwt) or with a  $\beta$ 2ADR plasmid (HEK $\beta$ 2), as previously described (Mayati et al., 2012a). As shown in Figure 5C, B[a]P was

responsible for an increased dose-dependent lactate release in HEK $\beta$ 2 cells, with no effect in HEKwt. When looking at the IF1 protein level in these two cell lines, the effect of B[a]P on IF1 was more marked in HEK $\beta$ 2 compared to HEKwt cells (Figure 5D). Altogether, these results strongly point to a role for  $\beta$ 2ADR in the regulation of IF1 protein level by B[a]P.

As an increase in intracellular calcium concentration has been previously observed upon B[a]P-induced  $\beta$ 2ADR activation (Mayati et al., 2012a), the effect of B[a]P (50 nM) on calcium concentration was assayed under our experimental conditions, by using Fura-2-AM as calcium sensitive fluoroprobe, and microspectrofluorimetry. As shown in Figure 6A, a transient increase in calcium was triggered by B[a]P in F258 cells, with a maximum reached after 10 min of exposure. This result then led us to evaluate the possible role of calcium in the regulation of IF1. Cells were pre-treated for 1h with BAPTA-AM (10  $\mu$ M) to chelate intracellular calcium, and then co-treated with B[a]P for 48h. As for the previously tested inhibitors (Figure 4 and Supplementary Figure 3), such a maneuver rather increased the mitochondrial IF1 protein level, especially at the highest B[a]P concentration (Figure 6B). As activation of  $\beta$ 2ADR is known to lead to an elevation of cAMP (De Blasi, 1990), the IF1 level was finally analyzed by western blotting following cell treatment with 100  $\mu$ M of 8-bromo cAMP, a membrane permeant analog of cAMP. Figure 6C showed that a 24h-treatment resulted in an increase in IF1 protein level, while no increase was detected at 6h (data not shown). Interestingly, a marked increase in lactate release was observed at 24h, with no significant change at 6h (Figure 6D). These observations might suggest that the  $\beta$ 2ADR-dependent IF1 regulation by B[a]P might go through cAMP signalling in F258 cells.

## **IF1 exhibits a pivotal role in B[a]P propensity to induce cell survival**

An increase in IF1 protein has been previously related to Warburg effect and cell survival (Sánchez-Cenizo et al., 2010). In order to test whether the B[a]P-increased mitochondrial IF1 protein level was involved in both the glycolytic shift and cell survival signaling we recently reported (Hardonnière et al., 2015, and in preparation), we decided to test the role of IF1 towards both glycolytic shift and cell death by using a siRNA approach. First, western blotting experiments were carried out in order to validate the siRNA targeting IF1 (siIF1) used. As shown in Figure 7A, transfecting cells with siIF1 markedly reduced the expression level of this protein, compared to conditions with control siRNA (siCTL). Glucose oxidation, previously shown to be enhanced by B[a]P (Hardonnière et al., in preparation), was first evaluated in siIF1-or siCTL-transfected cells. Data from Figure 7B indicated that the B[a]P (50 nM, 48h)-increased glucose oxidation did not rely on IF1. In contrast, silencing IF1 fully prevented the increase in lactate release induced by B[a]P (48h), whatever the concentration used. Finally, analysis of cell death by cell nucleus staining with Hoechst 33342 showed a significant increase in B[a]P-induced cell death when cells were transfected with siIF1 (Figure 7D). Altogether, these results pointed to a crucial role for IF1 in B[a]P-induced glycolytic shift and cell survival.

## DISCUSSION

High overexpression of IF1 has been reported in numerous human cancers, such as gastric cancer (Yin et al., 2015), colon, lung, breast and ovarian carcinomas (Sánchez-Aragó et al., 2013b), as well as hepatocarcinoma (Song et al., 2014), which makes it as an important cancer marker. Regarding its role in carcinogenesis, such a high expression has been clearly evidenced as notably inducing metabolic reprogramming towards glycolysis and cell survival (Formentini et al., 2012; Sánchez-Cenizo et al., 2010; Yadav and Chandra, 2014). However, as stressed by Sánchez-Aragó et al. (2013b), the question that still remains to be solved is how IF1 is upregulated in cancer. This is in this context that our study was performed in order to evaluate the possible impact of known environmental carcinogens, namely PAHs. The present data clearly evidenced that rat exposure (90 days) to a low dose of the 16 US-EPA PAH mixture, which is known to have deleterious effects, was capable of increasing *in vivo* the IF1 protein level in liver, as shown by the marked increase in the monomeric 12 kDa form. Furthermore, we found that the PAH prototype B[a]P, which is a well-recognized human carcinogen (IARC, 2010), up-regulated IF1 level *in vitro* in both F258 and Hepa1c1c7 cells, two liver epithelial cell lines. Note that DMBA, another known carcinogenic PAH, also upregulated IF1 in F258 cells. In this context, our study is the first one to identify environmental carcinogens as exogenous regulators of IF1 level.

Whereas some intracellular regulators of IF1 mRNA expression have been reported, such as the transcription factor NF $\kappa$ B notably in hepatocarcinoma (Song et al., 2014), or the nuclear receptor pregnane X receptor (PXR) in the liver from rats treated by the synthetic steroid pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile (Jiménez et al., 2000), little information is available regarding the involvement of other endogenous transcriptional regulators. HIF-1 $\alpha$  would control IF1 protein level in Clone 9 cells, a non-transformed rat hepatic epithelial cell line,

upon hypoxia; however, whereas a decrease in IF1 mRNA expression was paralleled by a decrease in HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in rat liver during sepsis, direct evidence for the transcriptional regulation of *ATPIF1* gene by this transcription factor was not sought (Huang et al., 2011). Our present study adds new information, since it points to AhR as possibly involved in the transcriptional regulation of *ATPIF1* gene. Indeed, by using the specific AhR inhibitor CH223191, induction of IF1 mRNA expression by B[a]P was found to be fully inhibited. Nonetheless, following B[a]P exposure, such a regulation would not play any role in the increase of mitochondrial IF1 protein level since inhibiting Ah receptor did not affect IF1 increase by B[a]P. In line with this result, AhR activation by TCDD was found to be ineffective under control conditions, whereas it appeared to potentiate the effects of B[a]P (especially at 1  $\mu$ M effects). Our previous work indicated that p53 and NHE1 activations as well as NO production could play a role either in B[a]P-triggered mitochondrial hyperpolarization or in metabolism reprogramming (Hardonnière et al., 2015 and in preparation). In order to test their possible involvement in IF1 up-regulation,  $\alpha$ -naphthoflavone, pifithrin- $\alpha$ , cariporide or CPTIO, that inhibited B[a]P metabolism, p53, NHE1 and NO production, respectively, were tested. However, none of these compounds prevented the increase in IF1 protein level by B[a]P, thus ruling out a role for B[a]P metabolism via cytochrome P450 1B1.

Direct activation of  $\beta$ 2ADR by PAHs has been previously described, thus leading to a rapid increase in intracellular calcium concentration (Mayati et al., 2012a); moreover, this increase in intracellular calcium was found to be AhR-independent (Mayati et al., 2012b). Besides,  $\beta$ 2ADR is known to control mitochondria biogenesis and function (Fajardo et al., 2011; Wills et al., 2012). Regarding this latter aspect, it is worth emphasizing that  $\beta$ 2ADR was reported to afford cardioprotection by interfering with mitochondrial dysfunction upon oxidative stress induced by doxorubicin (Fajardo et al., 2011). In this context, regulation by

$\beta$ 2ADR of the B[a]P-elicited increase in IF1 protein level was tested by using chemical inhibitors in F258 cells or by using  $\beta$ 2ADR-expressing HEK293 cells. From our results, it appeared that early activation of the  $\beta$ 2ADR pathway by B[a]P might be involved in the control of mitochondrial IF1 protein level. The fact that pyrene, which is a poor ligand of AhR but a strong activator of  $\beta$ 2ADR (Mayati et al., 2012a), also increased IF1 protein level (Supplementary Figure 2B), supported such an involvement. The  $\beta$ 2ADR activation by PAHs increased intracellular calcium concentration in HMEC cells (Mayati et al., 2012a). In line with this, an early increase in calcium was presently detected in B[a]P (50 nM)-treated F258 cells. As calcium is a known regulator of mitochondrial function, notably of complex V activity (Glancy and Balaban, 2012; Williams et al., 2015), and as an IF1-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin (CaM) complex has been proposed to regulate the ecto-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP synthase in hepatocarcinoma HepG2 cells (Contessi et al., 2007), a role for calcium was then tested. Rather than inhibiting the B[a]P-induced increase in IF1, the known calcium chelator, BAPTA-AM, potentiated this effect. Similarly to what has been proposed by Contessi et al. (2007) regarding the regulation of the ecto-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP synthase by an IF1-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex, one might then propose a competition for the mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase between IF1 and Ca<sup>2+</sup>/CaM, with an increase in IF1 binding when calcium decreases and *vice versa*. In support to such a hypothesis, note that a calmodulin was previously detected in the matrix of mitochondria isolated from rat liver (Hatase et al., 1985), and that a Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase had been suggested to be indirect via the release of an inhibitor (Harris and Das, 1991). This will clearly need future investigation. Based upon the fact that  $\beta$ 2ADR activation by PAHs also increased intracellular cAMP (Mayati et al., 2012a), and that links between this second messenger and F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase activity have been proposed (Valenti et al., 2010), a possible role for cAMP in IF1 up-regulation was finally looked for by using a permeant cAMP analog. We evidenced an increase in mitochondrial IF1 protein level under these conditions. In total, from the present

work, it therefore appears that calcium and cAMP might be important negative and positive regulators, respectively, of the mitochondrial IF1 protein level. Such antagonistic roles for calcium and cAMP in controlling cell respiration have been previously reported, notably through regulation of protein phosphatase or protein kinase, respectively (Lee et al., 2002). With respect to cAMP, an interesting result to stress relates to its effect as an inhibitor of the mitochondrial Lon protease *in vitro* activity (Osbourne et al., 2014). Indeed, IF1 protein has been suggested to be the target of a still unknown mitochondrial protease (Shen et al., 2009). In this context, the cAMP effect presently detected might arise from IF1 protein stabilization due to Lon protease inhibition, although this might be more complex than that (Sánchez-Aragó et al., 2013c). Regarding that point, it is noteworthy that a very recent study has revealed a role for the  $\beta$ -adrenergic receptor/cAMP/PKA pathway in controlling the phosphorylation state of IF1, thereby preventing its binding to the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase (García-Bermúdez et al., 2015).

IF1 protein, in its native form, is present as a tetramer in mitochondrial matrix when pH is above neutrality. Its activation has been previously related to a drop in mitochondrial matrix pH, thus allowing the appearance of a dimeric form; this then binds to the  $\beta$ F<sub>1</sub> subunit of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase thereby inhibiting its hydrolase activity (Cabezón, et al., 2000). As B[a]P was reported to trigger a mitochondrial matrix acidification, from approximately 8 to 6.5, in F258 cells (Hardonnière et al., in preparation), this could explain the appearance of a 24 kDa band presently detected after electrophoresis, thus revealing the presence of active IF1 dimers. Despite the IF1 up-regulation and dimer appearance, complex V activity was found to be only slightly inhibited (by about 12%). However, the measured activity only detected ATP synthase. In this context, one might then suppose that inhibition of the ATP hydrolase activity of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase would be more pronounced compared to synthase activity upon B[a]P exposure; this would thus afford some cell protection towards cell death by limiting ATP consumption, as previously described (Banerjee et al., 1998). Previous studies have also

revealed that IF1 overexpression leads to Warburg effect, a well-known hallmark of cancer (Sánchez-Cenizo et al., 2010; Formentini et al., 2012). Besides, our recent work shows that B[a]P triggers a Warburg effect involved in cell survival in F258 cells (Hardonnière et al. in preparation). Here we further show that silencing IF1 blocks the Ba]P-induced enhanced extracellular lactate release, and would thus been involved in the B[a]P-induced glycolytic shift. However, the boost in glucose oxidation elicited by Ba]P (Hardonniere et al., in preparation) does not seem to rely on IF1. As we have previously shown that NHE1 controls both lactate release and glucose oxidation, and that AhR might also be involved (Hardonnière et al., in preparation), it then appears that the overall metabolic remodeling induced by B[a]P might be more complex than first believed, and would thus deserve further investigation. Besides being involved in the B[a]P-induced metabolic reprogramming, IF1 might also exert its pro-survival effects through regulating the mitochondrial permeability transition pore PTP. Indeed, Antoniel et al. (2014) recently point out some striking similarities between inhibition of the permeability transition pore (PTP) opening and IF1 regulation, both known for example to rely on mitochondrial matrix pH. Indeed, matrix acidification has been shown to prevent the PTP opening (Mio et al., 2014). In support to such a possible effect of IF1 on PTP, it is worth stressing that the B[a]P-induced apoptosis was found to occur without any cytochrome c release in F258 cells (Huc et al., 2006). Nevertheless, IF1 effects are still controversial and seem to be highly dependent on the biological context. In particular, Fujikawa et al. (2012), and more recently Barbato et al. (2015) rather demonstrate a role for IF1 overexpression in mitochondrial membrane depolarization related to an enhancement of OXPHOS rate. Finally, overexpression of IF1 is also known to greatly impact on mitochondria network dynamics (Campanella et al., 2009a & b; Fujikawa et al., 2012; Faccenda et al., 2013a & b). Hyperfused mitochondria, whose formation depends on maintenance of  $\Delta\psi_m$ , can transiently buffer the effects of respiratory chain dysfunction; such

mitochondria would not be processed by mitophagy, thereby promoting a selective rescue mechanism (Twig and Shirihai, 2011) and (Gomes et al., 2011). Regarding that point, mitotracker red staining (Supplementary Figure 4A) and TEM (Supplementary Figure 4B), evidenced elongated mitochondria; this was paralleled by an increased expression of genes characteristic of mitochondria biogenesis upon B[a]P (50 nM, 48h) exposure (Supplementary Figure 5). In this context, one might then suggest a role for IF1 in this enhanced mitochondrial fusion process, modeled by a marked mitochondrial elongation, as previously reported (Faccenda et al., 2013b).

In conclusion, although B[a]P is known to be involved in the different phases of tumor development, contribution of B[a]P-induced mitochondrial dysfunction to cell transformation, and in the following onset of oncogenesis was still unknown. Here we show that the physiological inhibitor of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase is a new target for PAHs, even at low concentrations, and that PAH-regulated IF1 is linked to glycolytic shift and survival. Interestingly, our datamining analysis from transcriptomics data issued from human hepatocarcinoma clearly reveals positive correlations between high IF1 expression on one hand, and glycolysis and tumor progression on the other hand. In this context, IF1 upregulation might then be a new means for PAHs to drive carcinogenesis. We therefore propose that IF1 should become a very suitable marker for PAH-induced carcinogenesis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank the MRic facilities (SFR Biosit) for microscopy experiments, especially Marie-Thérèse Lavault and Stéphanie Dutertre for their technical assistance. We also wish to thank Dr Henri Schroeder for valuable discussion. KH was a recipient of a fellowship from French Ministry for Education and Research. We are very grateful to the Faculté des Sciences

Pharmaceutiques et Biologiques de Rennes (University of Rennes 1) for further financial support to KH, and to the Université Paris Descartes for the PhD fellowship of ES. We also wish to thank the Ligue contre le cancer (committees 22,35,49,85 ; DLG, OS), the French National Academy of Medicine (DLG), ANR (STEATOX project; “ANR-13-CESA-0009” ; DLG, OS, BM), the ITM0-cancer Plan Cancer 2009-2013 (SB), “Region Provence Alpes Côte d'Azur”, “Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur”, “Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement Provence Alpes Côte d'Azur” (BM, plan régional santé environnement PRSE PACA n°6.3.3.3 and 6.3.3.4), for financial support to our work.

## REFERENCES

- Antonieli M, Giorgio V, Fogolari F, Glick GD, Bernardi P, Lippe G. 2014. The oligomycin-sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: emerging new roles in mitochondrial pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 15:7513-36.
- Banerjee A, Linscheer WG, Chiji H, Murthy UK, Cho C, Nandi J, Chan SH. 1998. Induction of an ATPase inhibitor protein by propylthiouracil and protection against paracetamol (acetaminophen) hepatotoxicity in the rat. *Br J Pharmacol.* 124:1041-7.
- Barbato S, Sgarbi G, Gorini G, Baracca A, Solaini G. 2015. The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics. *J Biol Chem.* 290:6338-48.
- Bénit P, Goncalves S, Dassa E, Brière JJ, Martin G, Rustin P. 2006. A three-shot assay for the measurement of the five respiratory chain complexes in minute amount of biological samples. *Clin Chim Acta* 374:81-86.
- Bernardi P, Di Lisa F, Fogolari F, Lippe G. 2015. From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase. *Circ Res.* 116:1850-62.
- Cabezón E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. 2000. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem.* 275:25460-4.
- Campanella M, Parker N, Tan CH, Hall AM, Duchén MR. 2009a. IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends Biochem Sci.* 34:343-50.
- Campanella M, Seraphim A, Abeti R, Casswell E, Echave P, Duchén MR. 2009b. IF1, the endogenous regulator of the F(1)F(o)-ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1787:393-401.
- Coletta A, Molter C, Duqué R, Steenhoff D, Taminau J, de Schaetzen V, Meganck S, Lazar C, Venet D, Detours V, Nowé A, Bersini H, Weiss Solís DY. 2012. InSilico DB genomic datasets hub: an efficient starting point for analyzing genome-wide studies in GenePattern, Integrative Genomics Viewer, and R/Bioconductor. *Genome Biol.* 13:R104.
- Contessi S, Comelli M, Cmet S, Lippe G, Mavelli I. 2007. IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F (1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr.* 39:291-300.
- De Blasi A. 1990. Beta-adrenergic receptors: structure, function and regulation. *Drugs Exp Clin Res.* 16:107-12.
- Faccenda D, Tan CH, Duchén MR, Campanella M. 2013a. Mitochondrial IF<sub>1</sub> preserves cristae structure to limit apoptotic cell death signaling. *Cell Cycle.* 12:2530-2.
- Faccenda D, Tan CH, Seraphim A, Duchén MR, Campanella M. 2013b. IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ.* 20:686-97.
- Fajardo G, Zhao M, Berry G, Wong LJ, Mochly-Rosen D, Bernstein D. 2011.  $\beta$ 2-adrenergic receptors mediate cardioprotection through crosstalk with mitochondrial cell death pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 51:781-9.
- Formentini L, Sánchez-Aragó M, Sánchez-Cenizo L, Cuezva JM. 2012. The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol Cell.* 45:731-42.

- Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. 2012. Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. *J Biol Chem.* 287:18781-7.
- García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM. 2015. PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP Synthase. *Cell Rep.* 12, 1–13.
- Glancy B, Balaban RS. 2012. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry.* 51:2959-73.
- Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* 13:589-98.
- Green DW, Grover GJ. 2000. The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1458:343-55.
- Grova N, Salquebre G, Appenzeller BM. 2013 Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 52 monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in hairs of rats after controlled exposure. *Anal Bioanal Chem.* 405:8897-8911.
- Hardonnière K, Huc L, Podechard N, Fernier M, Tekpli X, Gallais I, Sergent O, Lagadic-Gossmann D. 2015. Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential. *Toxicol In Vitro.* 29: 1597-608.
- Hardonnière K, Saunier E, Lemarié A, Fernier M, Gallais I, Héliers C, Mograbi B, Antonio S, Bénit P, Rustin P, Janin M, Hobarou F, Ottolenghi C, Benelli C, Sergent O, Huc L, Bortoli S, Lagadic-Gossmann D. AhR- and NHE1-related metabolic reprogramming determines the cell survival induced by the environmental carcinogen benzo[a]pyrene. In preparation
- Harris DA, Das AM. 1991. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J.* 280 (Pt 3):561-73.
- Hassinen IE, Vuorinen KH, Ylitalo K, Ala-Rämi A. 1998. Role of cellular energetics in ischemia-reperfusion and ischemic preconditioning of myocardium. *Mol Cell Biochem.* 184:393-400.
- Hatase O, Doi A, Itano T, Matsui H, Ohmura Y. 1985. A direct evidence of the localization of mitochondrial calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 132:63-6.
- Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebø S, Solhaug A, Tekpli X, Landvik NE, Huc L, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem Biol Interact.* 167:41-55.
- Huang LJ, Chuang IC, Dong HP, Yang RC. 2011. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock.* 36:90-6.
- Huc L, Sparfel L, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. 2004. Identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *FASEB J.* 18:344-6.
- Huc L, Rissel M, Solhaug A, Tekpli X, Gorria M, Torriglia A, Holme JA, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. 2006. Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. *J Cell Physiol.* 208:527-37.

Huc L, Tekpli X, Holme JA, Rissel M, Solhaug A, Gardyn C, Le Moigne G, Gorria M, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. 2007. c-Jun NH2-terminal kinase-related Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67:1696-705.

IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 92: 111–144.

Jiménez BD, Quattrochi LC, Yockey CB, Guzelian PS. 2000. Identification by differential display of the IF1 inhibitor peptide of ATP synthase/ATPase as a gene inducible in rat liver by pregnenolone 16alpha-carbonitrile. *Life Sci.* 67:1825-32.

Lee I, Bender E, Kadenbach B. 2002. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol Cell Biochem.* 234-235:63-70.

Long Q, Yang K, Yang Q. 2015. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis.* 5:19-32.

Martínez-Reyes I, Cuezva JM. 2014. The H<sup>(+)</sup>-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim Biophys Acta.* 1837:1099-112.

Mayati A, Levoine N, Paris H, N'Diaye M, Courtois A, Uriac P, Lagadic-Gossmann D, Fardel O, Le Ferrec E. 2012a. Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a  $\beta$ 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J Biol Chem.* 287:4041-52.

Mayati A, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Fardel O. 2012b. Aryl hydrocarbon receptor-independent up-regulation of intracellular calcium concentration by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human endothelial HMEC-1 cells. *Environ Toxicol.* 27:556-62.

Mínguez B, Hoshida Y, Villanueva A, Toffanin S, Cabellos L, Thung S, Mandeli J, Sia D, April C, Fan JB, Lachenmayer A, Savic R, Roayaie S, Mazzaferro V, Bruix J, Schwartz M, Friedman SL, Llovet JM. 2011. Gene-expression signature of vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 55:1325-31.

Mio Y, Uezono S, Kitahata H. 2014. Anesthetic cardioprotection in relation to mitochondria: basic science. *Curr Pharm Des.* 20:5673-80.

Motorykin O, Matzke MM, Waters KM, Massey Simonich SL. 2013. Association of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon emissions and smoking with lung cancer mortality rates on a global scale. *Environ Sci Technol.* 47:3410-6.

Osbourne DO, Soo VW, Konieczny I, Wood TK. 2014. Polyphosphate, cyclic AMP, guanosine tetraphosphate, and c-di-GMP reduce in vitro Lon activity. *Bioengineered.* 5:264-8.

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21:221-30.

Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, Gilot D, Gordon JR, Lagente V, Fardel O. 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett.* 177:130-7.

- Podechard N, Tekpli X, Catheline D, Holme JA, Rioux V, Legrand P, Rialland M, Fardel O, Lagadic-Gossmann D, Lecureur V. 2011. Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells. *Toxicol Lett.* 206:289-99.
- Rasola A, Bernardi P. 2015. Reprint of "The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells". *Cell Calcium.* 58:18-26.
- Sánchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, García-Huerta P, Sánchez-Aragó M, Cuezva JM. 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem.* 285:25308-13.
- Sánchez-Aragó M, Formentini L, Cuezva JM. 2013a. Mitochondria-mediated energy adaption in cancer: the H<sup>(+)</sup>-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors. *Antioxid Redox Signal.* 19:285-98.
- Sánchez-Aragó M, Formentini L, Martínez-Reyes I, García-Bermúdez J, Santacatterina F, Sánchez-Cenizo L, Willers IM, Aldea M, Nájera L, Juarránz A, López EC, Clofent J, Navarro C, Espinosa E, Cuezva JM. 2013b. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis.* 22;2:e46.
- Sánchez-Aragó M, García-Bermúdez J, Martínez-Reyes I, Santacatterina F, Cuezva JM. 2013. Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep.* 14:638-44.
- Shen L, Zhi L, Hu W, Wu MX. 2009. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ.* 16:603-12.
- Song R, Song H, Liang Y, Yin D, Zhang H, Zheng T, Wang J, Lu Z, Song X, Pei T, Qin Y, Li Y, Xie C, Sun B, Shi H, Li S, Meng X, Yang G, Pan S, Zhu J, Qi S, Jiang H, Zhang Z, Liu L. 2014. Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF- $\kappa$ B drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. *Hepatology.* 60:1659-73.
- Subramanian A1, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15545-50.
- Twig G, Shirihai OS. 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal.* 14:1939-51.
- Valenti D, Tullo A, Caratozzolo MF, Merafina RS, Scartezzini P, Marra E, Vacca RA. 2010. Impairment of F1F0-ATPase, adenine nucleotide translocator and adenylate kinase causes mitochondrial energy deficit in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy. *Biochem J.* 431:299-310.
- von Zastrow M, Kobilka BK. 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem.* 267:3530-8.
- Wester PW, Muller JJ, Slob W, Mohn GR, Dortant PM, Kroese ED. 2012. Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 50:927-35.
- Williams GS, Boyman L, Lederer WJ. 2015. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 78:35-45.

Wills LP, Trager RE, Beeson GC, Lindsey CC, Peterson YK, Beeson CC, Schnellmann RG. 2012. The  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist formoterol stimulates mitochondrial biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 342:106-18.

Yadav N, Chandra D. 2014. Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer. *Mitochondrion.* 16:18-25.

Yin T, Lu L, Xiong Z, Wei S, Cui D. 2015. ATPase inhibitory factor 1 is a prognostic marker and contributes to proliferation and invasion of human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 70:90-6.

Zanotti F, Raho G, Gaballo A, Papa S. 2004. Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr.* 36:447-57.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1. GSEA profiles showing a significant enrichment of gene sets associated with liver cancer progression (A), and glycolysis (KEGG, B) in human HCC with high levels of *ATPIF1* mRNA (GSE20238).** See heat-map in supplementary Figure 1.

**Fig.2. PAHs were involved in IF1 overexpression both *in vitro* and *in vivo*.** (A) The levels of IF1 protein and of the  $\beta$ -F1 subunit of the F0F1ATPase were analyzed in liver tissues by western blotting from rats exposed to 0.04 or 0.8 mg.kg<sup>-1</sup> of a 16 PAH mixture. HSC70 was used as loading control. (B) IF1 mRNA expression was monitored in F258 cells treated with B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M) for 24 or 48 hours. (C) The IF1 protein content of mitochondrial fractions of B[a]P-exposed F258 cells was evaluated by western blotting. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , DMSO vs B[a]P-treated cells.

**Fig.3. B[a]P triggered partial inhibition of F0F1ATPase activity.** (A) F258 cells were treated with complex V inhibitor oligomycin A (1  $\mu$ M) for 1 hour following 48 hours of B[a]P exposure. ATP concentration was then evaluated. (B) Effects of B[a]P on complex V activity measured as described in Material and Methods. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \*\*\* $p < 0.001$ . DMSO vs B[a]P-treated cells. ns: not significant.

**Fig.4. B[a]P metabolism and its downstream targets, p53 and NHE1, were not involved in IF1 up-regulation in response to B[a]P.** F258 cells were pre-treated for 1 hour with  $\alpha$ -NF (10  $\mu$ M), PFT- $\alpha$  (10  $\mu$ M), or cariporide (10  $\mu$ M), prior to co-exposure to B[a]P for 48 hours. (A) The B[a]P metabolism and p53 involvements in IF1 up-regulation were assessed by analyzing IF1 protein level on mitochondrial fractions by western blotting. (B) A role for NHE1 activation in B[a]P-induced IF1 overexpression was evaluated by measuring IF1

protein level on mitochondrial fractions by western blotting. COXIV was used as loading control. Results were representative of 3 independent experiments.

**Fig.5. B[a]P-induced IF1 induction could occur through  $\beta$ 2-adrenergic pathway stimulation.** (A,B) F258 cells were pre-treated or not with the  $\beta$ -receptor inhibitor propranolol (10  $\mu$ M) for 1 hour prior to co-exposure to B[a]P for 48 hours. The B[a]P-induced glycolytic shift (A) was investigated by monitoring extracellular lactate, and the IF1 protein level (B) was analyzed on total lysates by western blotting. A role for  $\beta$ 2-adrenergic receptor in the B[a]P (50 nM or 1  $\mu$ M, 48h)-induced extracellular lactate (C) or total IF1 protein level (D), was evaluated in both HEK<sub>WT</sub> cells not expressing  $\beta$ 2-adrenergic receptor, and HEK <sub>$\beta$ 2</sub> in which the receptor is overexpressed. HSC70 was used as loading control. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , DMSO vs B[a]P-treated cells.

**Fig.6. The B[a]P-dependent IF1 regulation through  $\beta$ 2-adrenergic pathway might involve intracellular calcium and cAMP.** (A) Effects of B[a]P (50 nM) on calcium was assessed by microspectrofluorimetry after staining F258 cells with the Fura-2-AM probe. The ratio F340/F380 reflects intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. \* $p < 0.05$ , DMSO vs B[a]P-treated cells. (B) Effects of calcium chelation with BAPTA-AM (10  $\mu$ M) on B[a]P-induced IF1 induction and on  $\beta$ -F1 subunit, were monitored by western blotting analysis of mitochondrial and cytosolic fractions following 48 hours of B[a]P exposure in F258 cells. (C) Effects of exogenous application of 8-Br-cAMP (100  $\mu$ M, 24h) on the IF1 protein level of control cell lysates were evaluated by western blotting. Densitometric analysis was also performed. HSC70 was used as loading control. (D) Kinetic effects of exogenous application of 8-Br-cAMP on extracellular lactate. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ . DMSO vs 8-Br-cAMP-treated cells.

**Fig.7. IF1 upregulation following B[a]P exposure acts to promote F258 cell survival.** (A) Western blotting analysis was performed to control siIF1 inhibitory efficacy on IF1 protein level expression compared to the Non Targeting siRNA (siNT). AhR expression was analyzed to ensure the specificity of Si targeting. HSC70 was used as loading control. (B) Impact of IF1 silencing on glucose oxidation was quantified by measuring transfer of <sup>14</sup>C radioactivity from glucose to CO<sub>2</sub>. Cells were treated with B[a]P (50 nM) for 48h. (C) Role for IF1 in B[a]P-induced glycolytic shift was evaluated by measuring extracellular lactate upon IF1 silencing by siRNA. (D) B[a]P toxicity was evaluated in IF1 silenced cells by counting cells with fragmented or condensed chromatin following Hoechst 33342 staining. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , DMSO vs B[a]P-treated cells.

**Fig.S1. Heat-map highlights changes in the constituent genes of the glycolysis/gluconeogenesis pathway in human HCC with high and low levels of *ATPIF1* mRNA (GSE20238).**

**Fig.S2. PAHs might play a generalized role in liver IF1 regulation.** (A) IF1 expression in Hepa1c1c7 cell line following 48 hours of B[a]P exposure was analyzed by western blotting on total cell lysates. (B) Effects of other PAHs, DMBA and pyrene, on IF1 protein expression assessed by western blotting on total cell lysates. HSC70 was used as loading control. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions.

**Fig.S3. Other possible IF1 regulation modalities.** (A) F258 cells were pre-treated for 1 hour with CPTIO (25  $\mu\text{M}$ ; a NO scavenger), CH223191 (10  $\mu\text{M}$ ; an AhR inhibitor) or TCDD (10 nM; a strong AhR ligand), prior to co-exposure to B[a]P for 48 hours. (A) Role for B[a]P-elicited NO production and AhR activation on IF1 up-regulation was tested by measuring IF1 expression on mitochondrial fractions by western blotting analysis. (B) Role for AhR in B[a]P-induced IF1 overexpression was also investigated by testing the effects of AhR inhibition by CH223191. (C) Effects of CH223191 on the B[a]P-induced IF1 mRNA expression were assessed by RT-qPCR. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions, except for (B) (n = 2).

**Fig.S4. Effect of B[a]P on the mitochondrial network structure.** F258 cells were treated with B[a]P (50 nM or 1  $\mu\text{M}$ ) for 48 hours before microscopy experiments. (A) Overall structure of mitochondrial networks were digitized on the IX83 inverted microscope (63X magnification) after MitoTracker Red staining (10 nM). (B) Ultra-thin sections (90 nm) of each culture were observed under transmission electron microscopy (TEM). Arrows indicate mitochondria. Number of independent experiments  $\geq 2$  for all conditions.

**Fig.S5. B[a]P might favor mitochondria biogenesis.** F258 cells were treated with B[a]P (50 nM) for 8, 24 or 48 hours. Expression of the mitochondrial gene ND1 and of the nuclear gene COX4 was investigated by RT-qPCR. Expression levels of these two genes were expressed as ratio to evaluate the mitochondrial biogenesis. Number of independent experiments  $\geq 3$  for all conditions. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , DMSO vs B[a]P-treated cells.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

### *Analysis of the mitochondria network ultrastructure using Transmission electron microscopy*

After drug exposure, cells were rinsed with 0.15 M Na cacodylate buffer and fixed by drop-wise addition of glutaraldehyde (2.5%) for 1 h. After fixation, the specimens were rinsed several times with 0.15 M Na cacodylate buffer and postfixed with 1.5% osmium tetroxide for 1 h. After further rinsing with cacodylate buffer, the samples were dehydrated through a series of graded ethanol from 70 to 100%. The specimens were infiltrated in a mixture of acetone–Eponate (50/50) for 3 h and then in pure Eponate for 16 h. Finally, the specimens were embedded in DMP30–Eponate for 24 h at 60 °C. Sections (0.5 µm) were cut on a Leica UC7 microtome and stained with toluidine blue. Ultrathin sections (90 nm) were obtained, collected onto copper grids, and counterstained with 4% uranyl acetate and then with lead citrate. Examination was performed with a JEOL 1400 transmission electron microscope operated at 120 kV.

Figure 1

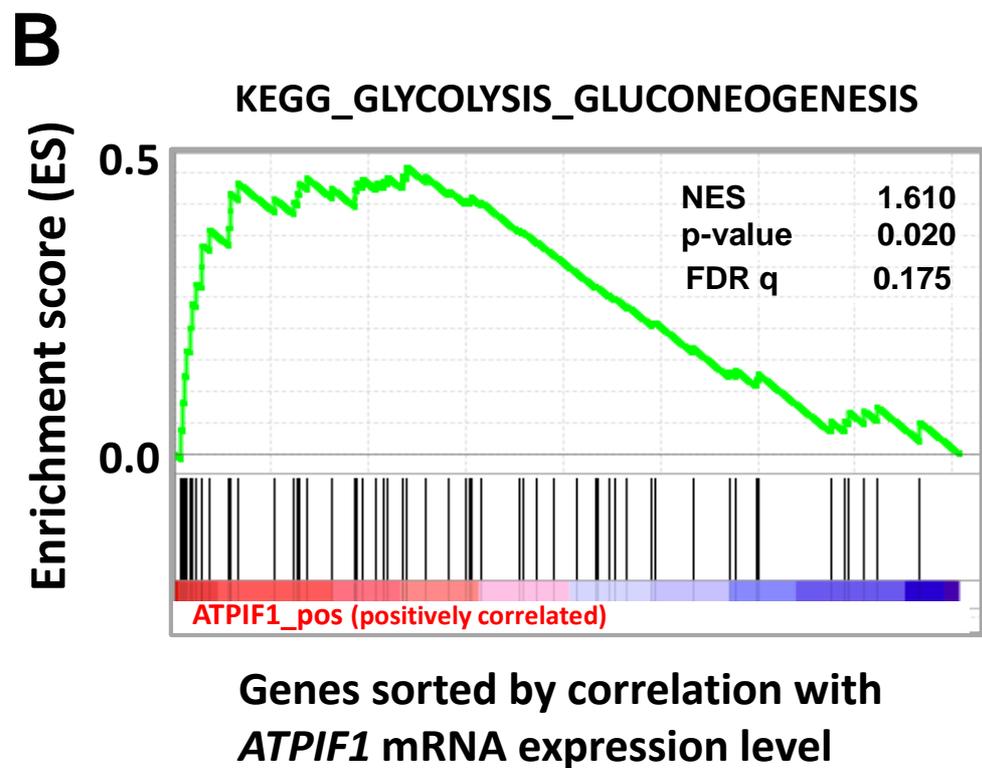
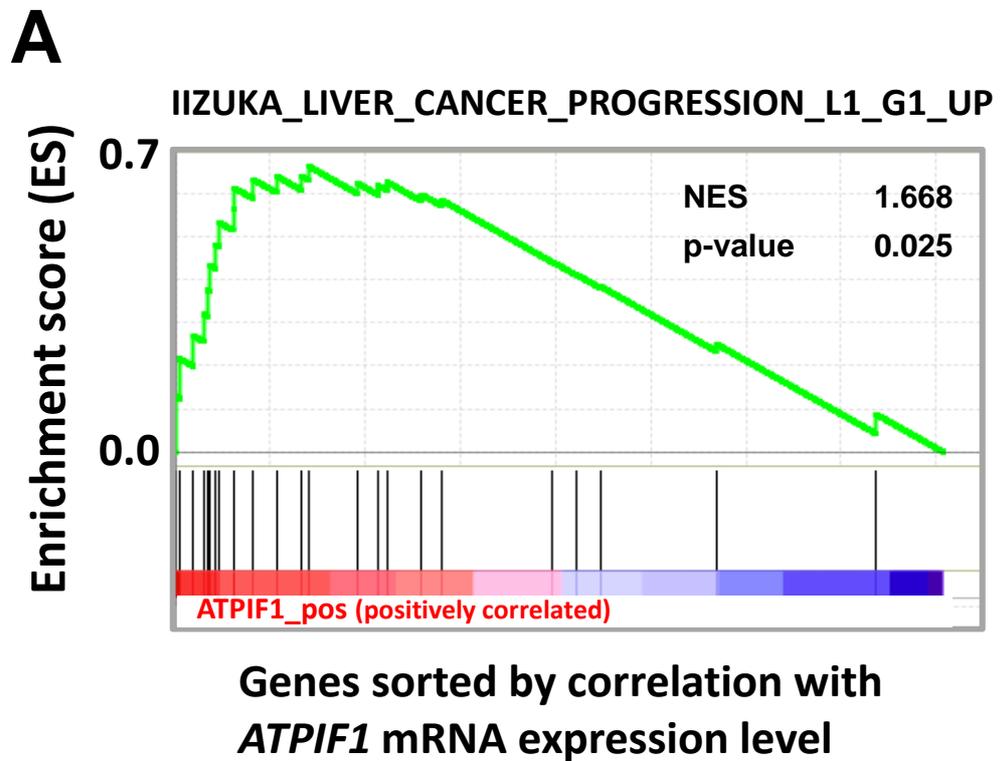


Figure 2

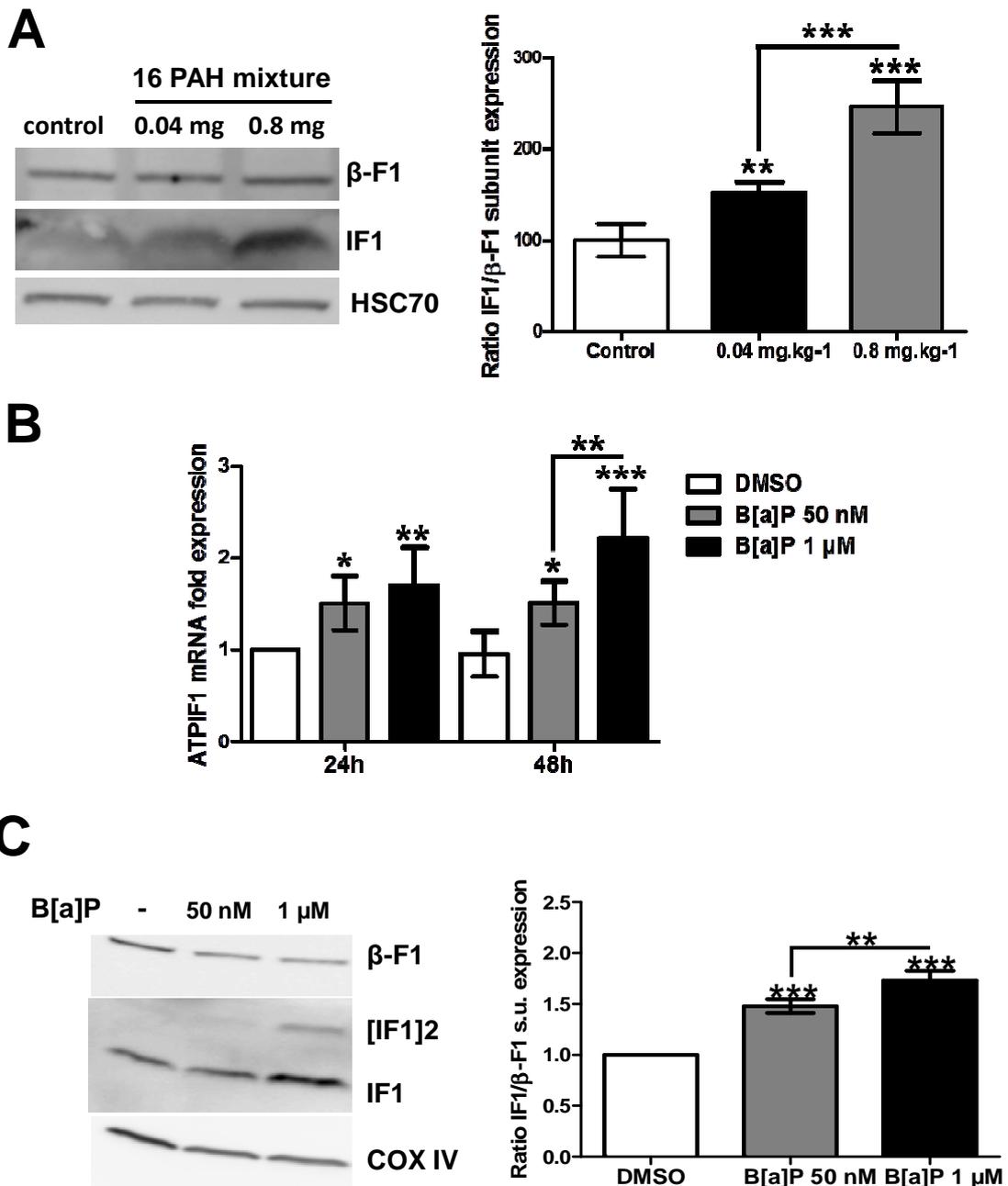
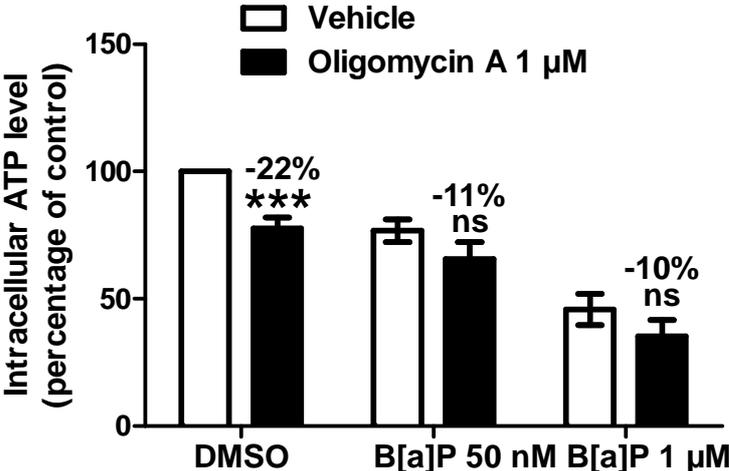


Figure 3

A



B

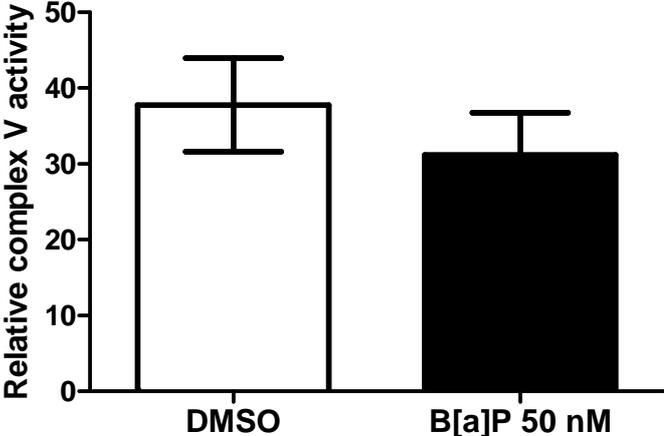


Figure 4

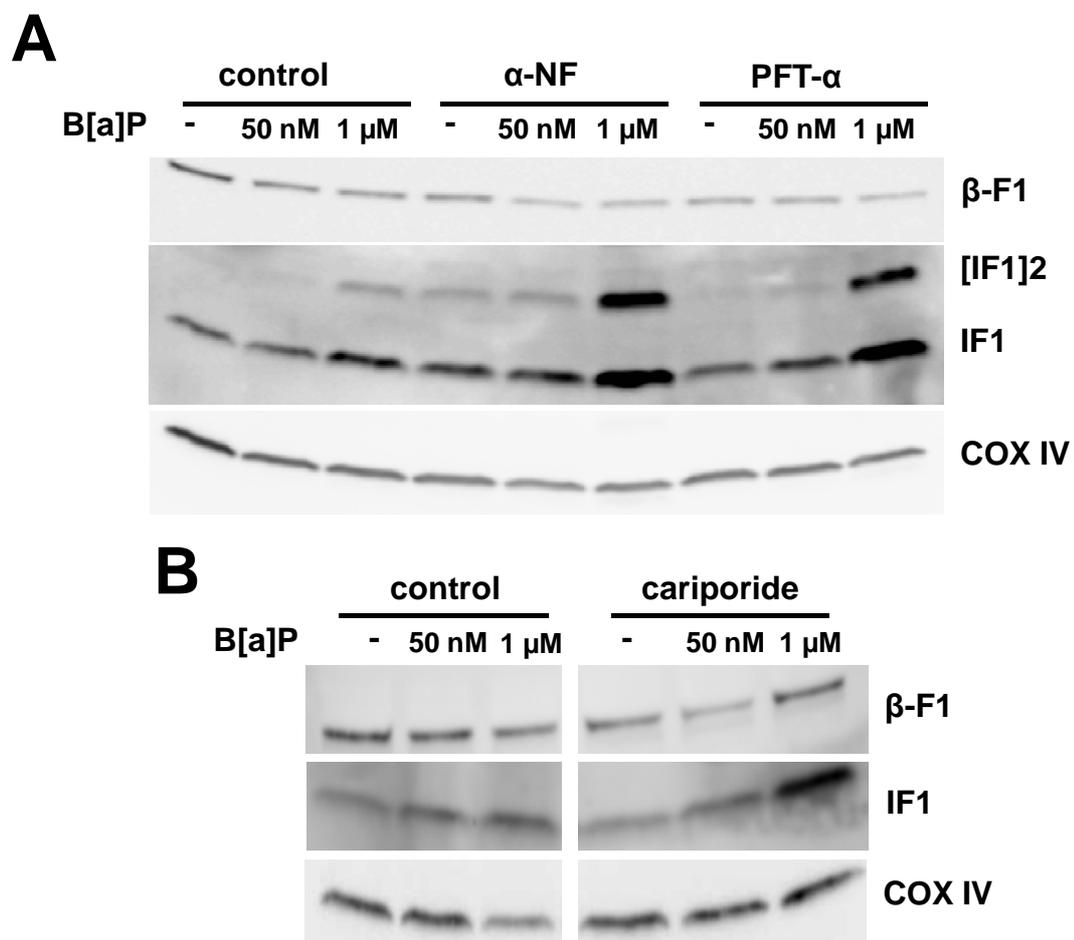
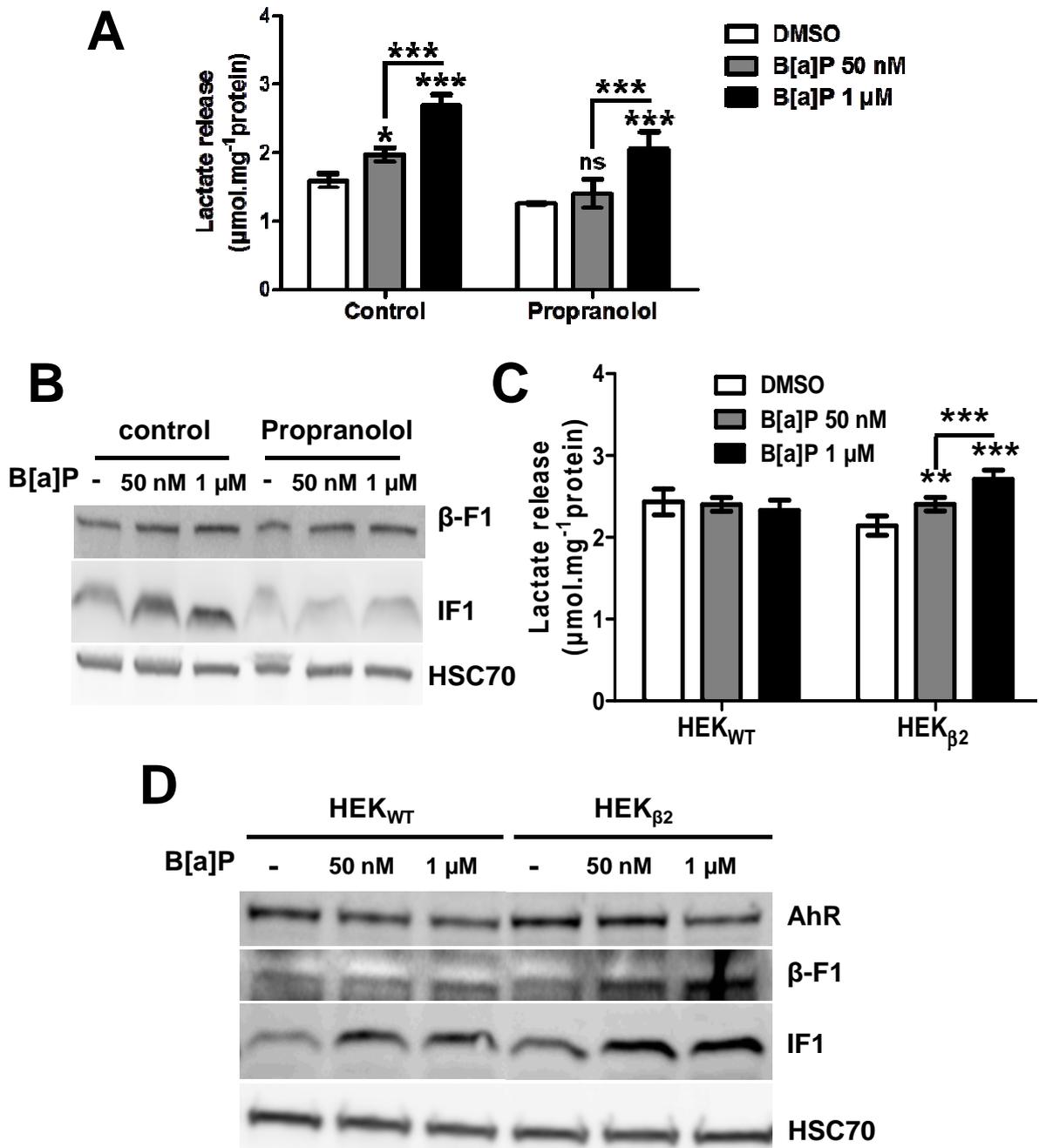


Figure 5



**Figure 6**

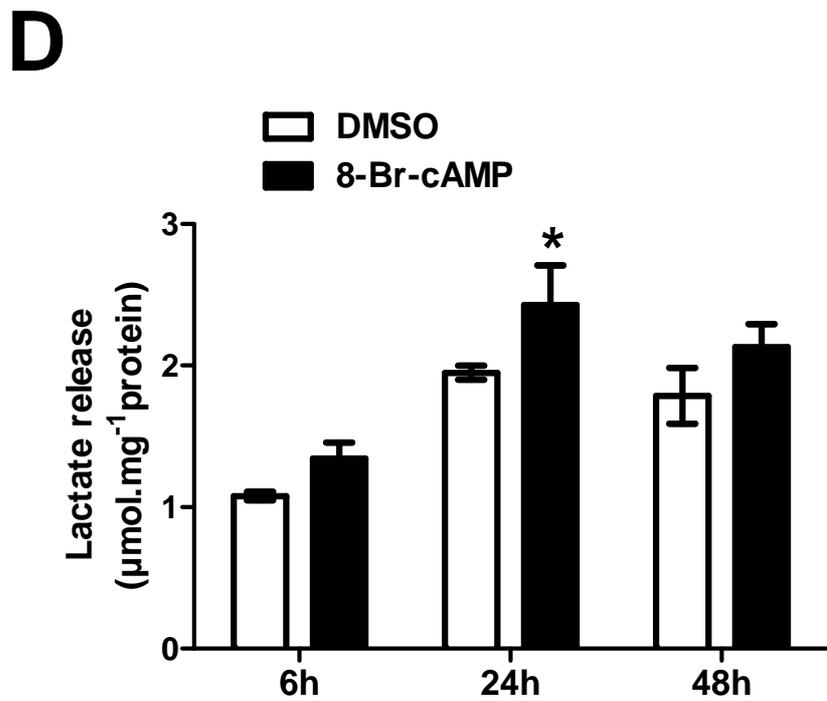
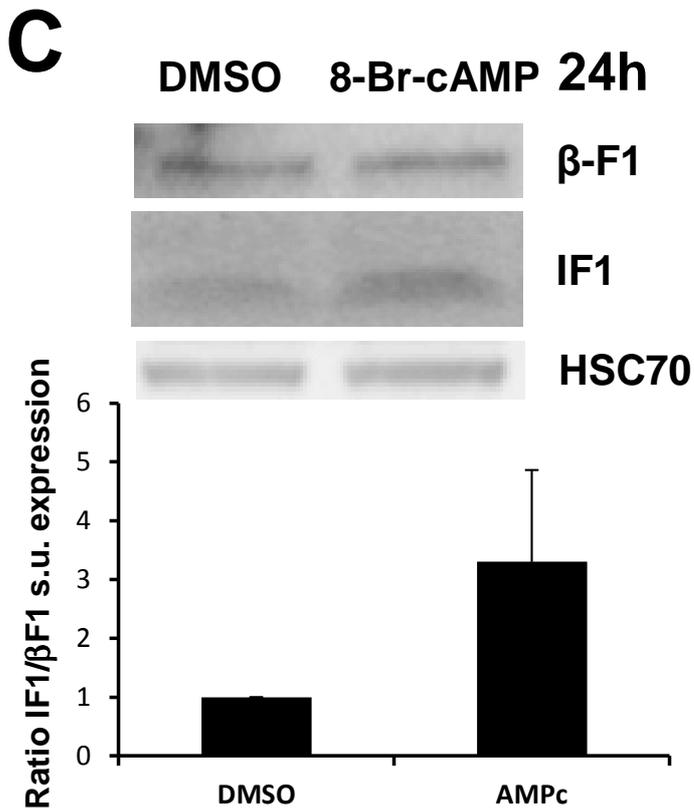
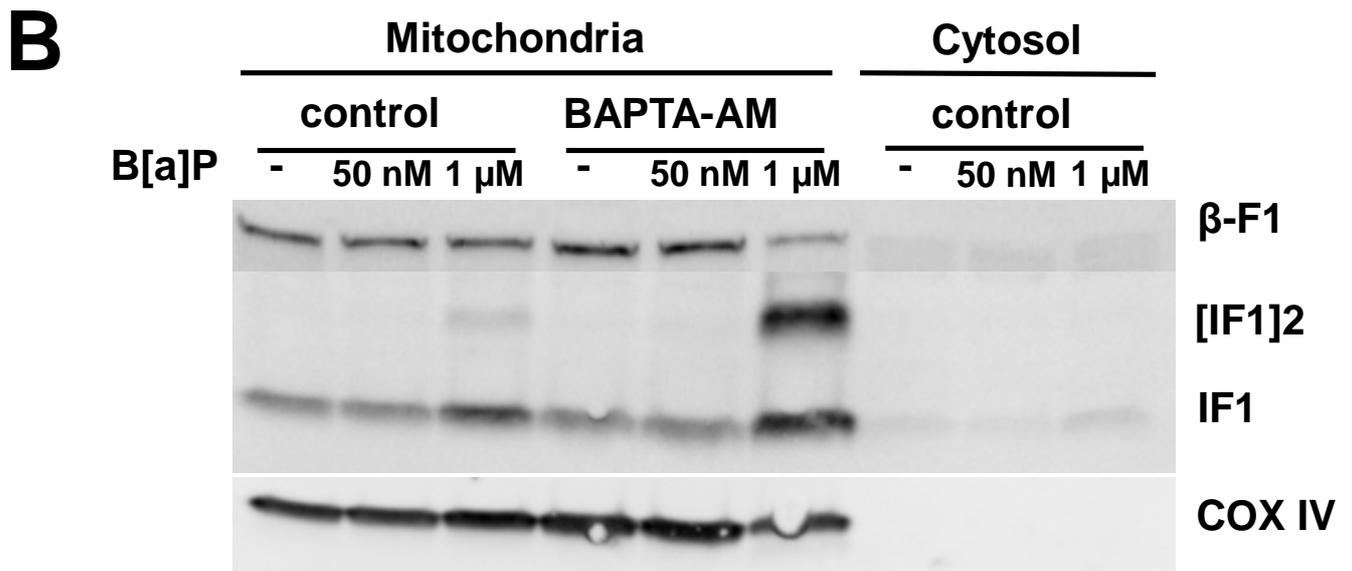
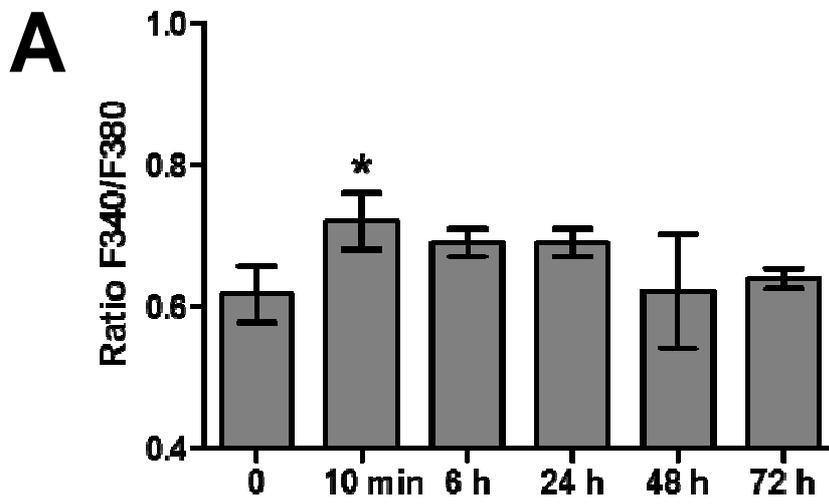
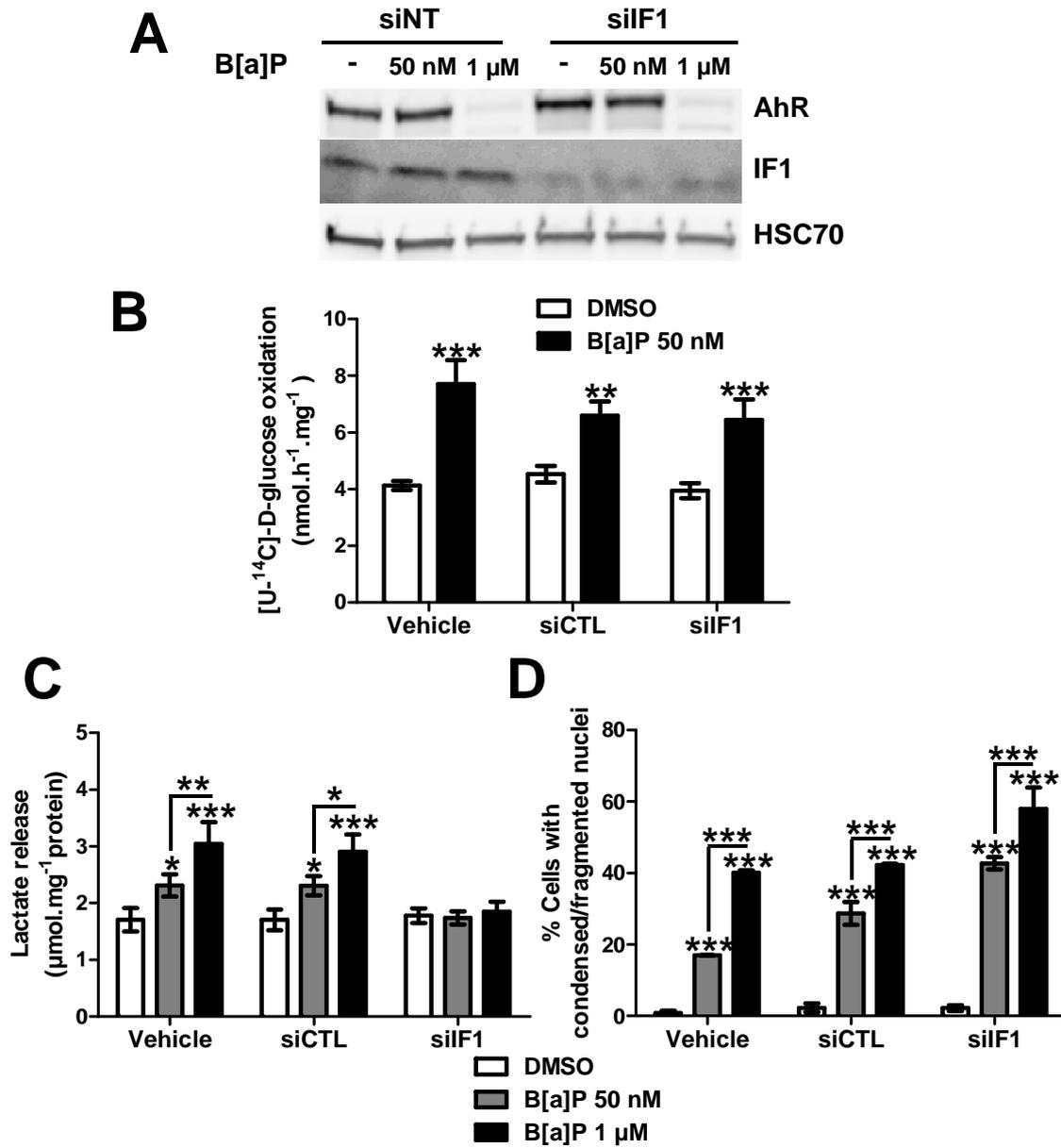


Figure 7



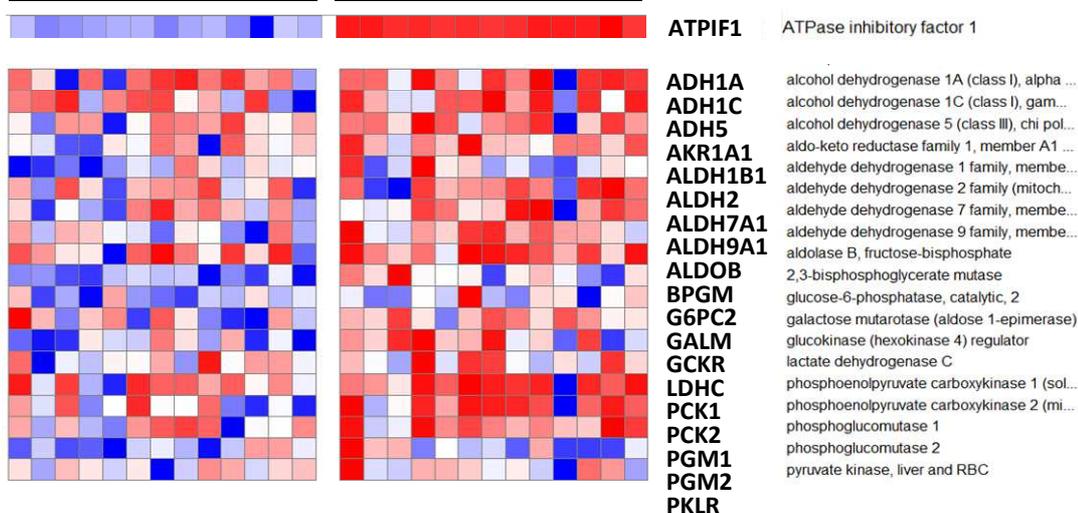
# Supplementary figures

# Supplementary Figure 1

## KEGG\_GLYCOLYSIS\_GLUONEOGENESIS

**Low ATPIF1**

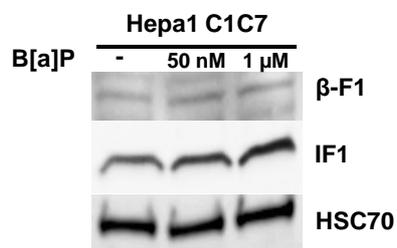
**High ATPIF1**



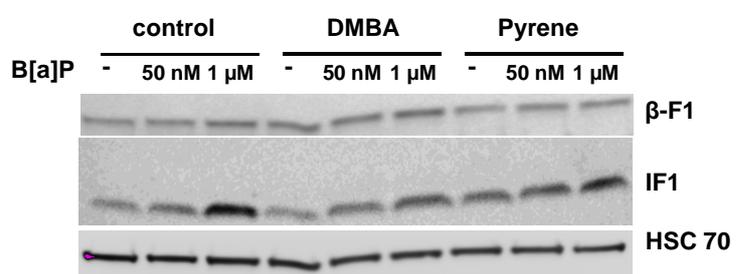
**HEPATOCELLULAR CARCINOMA (91 patients)**

Supplementary Figure 2

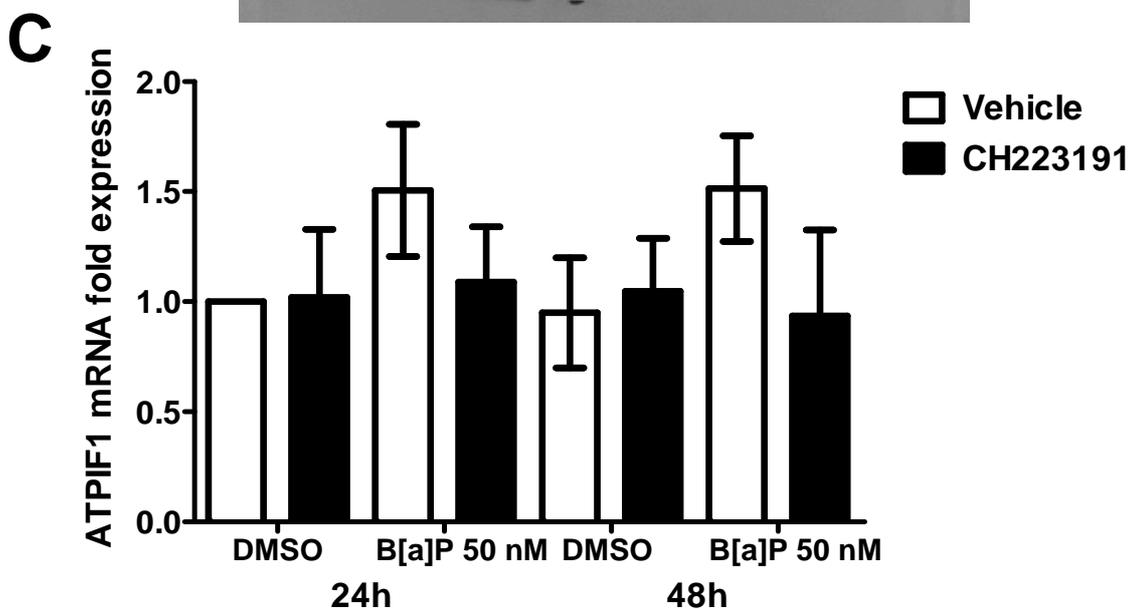
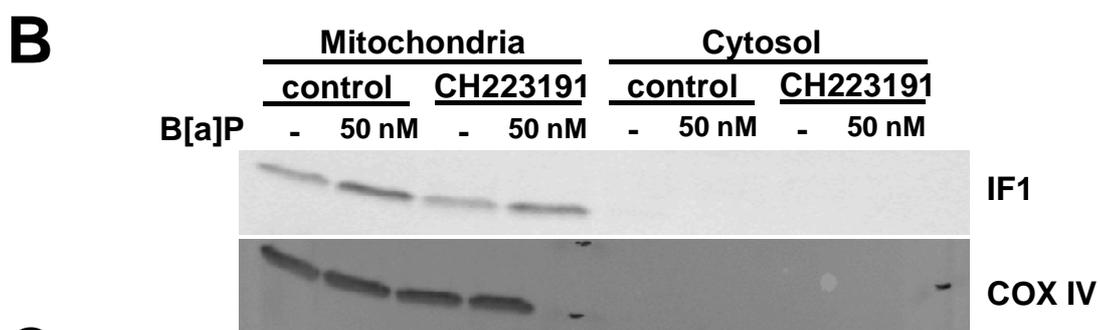
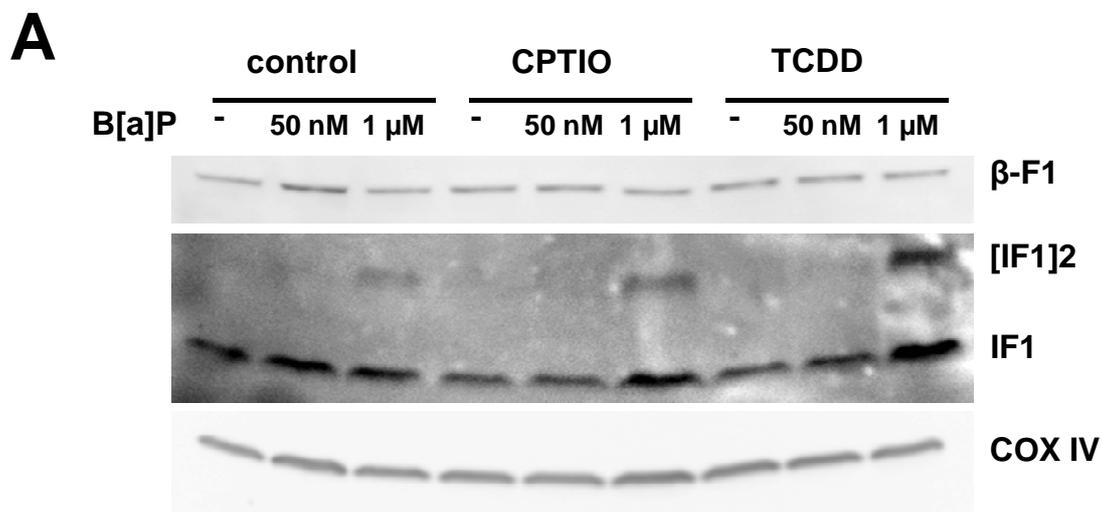
**A**



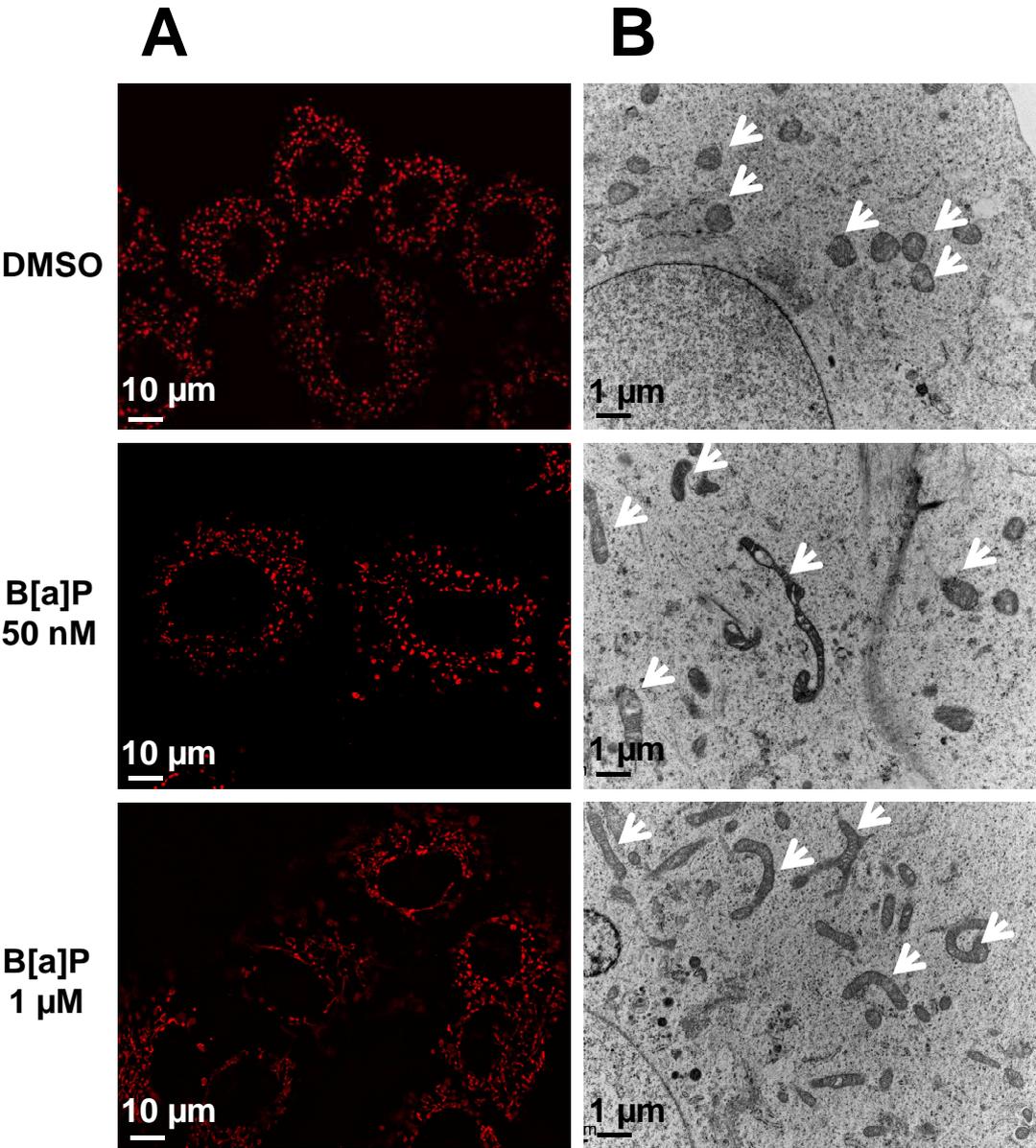
**B**



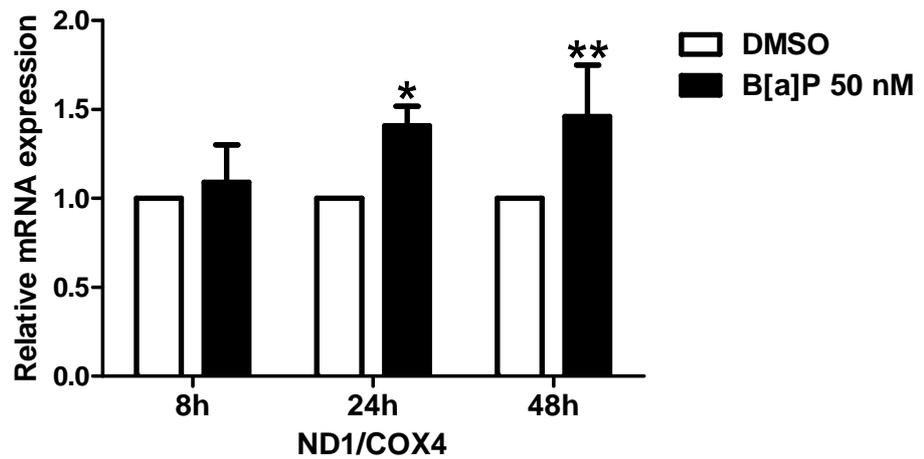
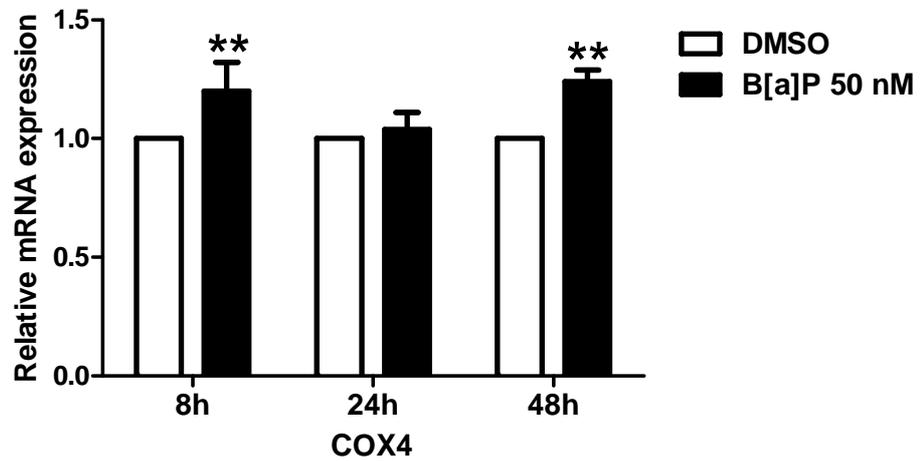
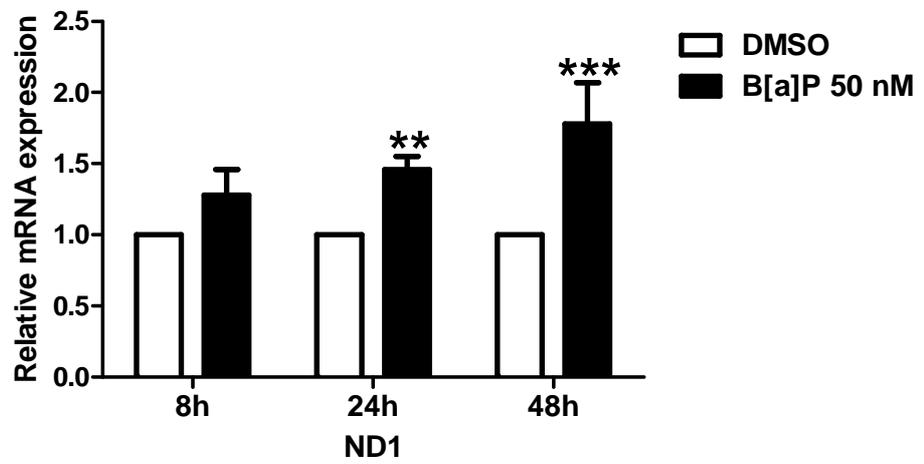
### Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



## Supplementary Figure 5





# **DISCUSSION GENERALE**



## Discussion générale et perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse et qui sont regroupés dans la figure 38, ont clairement mis en évidence des effets du B[a]P sur le métabolisme mitochondrial. Nous avons pu démontrer que ces perturbations constituaient de véritables mécanismes de survie, limitant ainsi les effets toxiques du B[a]P. Ceci est d'autant plus marquant que ces altérations se produisent même en présence de faibles concentrations de B[a]P, relativement proches des niveaux auxquels l'Homme pourrait théoriquement être exposé dans son environnement. Nous avons ainsi pu établir que le B[a]P est à l'origine d'une production de NO qui résulte de l'activation de la iNOS; cette production induit une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, et est à l'origine d'une survie accrue des cellules de la lignée épithéliale hépatique F258. Nous avons ensuite démontré dans ces cellules que le B[a]P induisait un remodelage métabolique profond, se caractérisant par une reprogrammation métabolique vers la glycolyse, amplifiant également leur survie. Enfin, nous avons identifié que l'une des cibles mitochondriales des hydrocarbures impliquées dans cette reprogrammation métabolique et cette survie, est l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, à savoir le peptide IF1. Par ailleurs, nous avons pu constater qu'un tel effet des hydrocarbures sur l'expression d'IF1 s'opère également *in vivo* sur le plus long terme chez le rat, et pourrait ainsi constituer une nouvelle modalité par laquelle ces composés pourraient induire des processus de cancérogénèse.

Néanmoins, de nombreux points restent à approfondir afin de préciser le rôle du NO à la mitochondrie, et de définir plus précisément la signalisation impliquée dans ses effets. De plus, même si nous avons pu démontrer que le B[a]P est à l'origine de remaniements métaboliques profonds, les mécanismes intervenant en amont de ces perturbations restent cependant à clarifier. Enfin, il semble primordial de terminer la caractérisation de la signalisation impliquée dans la régulation de l'expression d'IF1 en présence de B[a]P, et de préciser si ce peptide constitue ou non un marqueur fiable des effets cancérogènes des hydrocarbures.

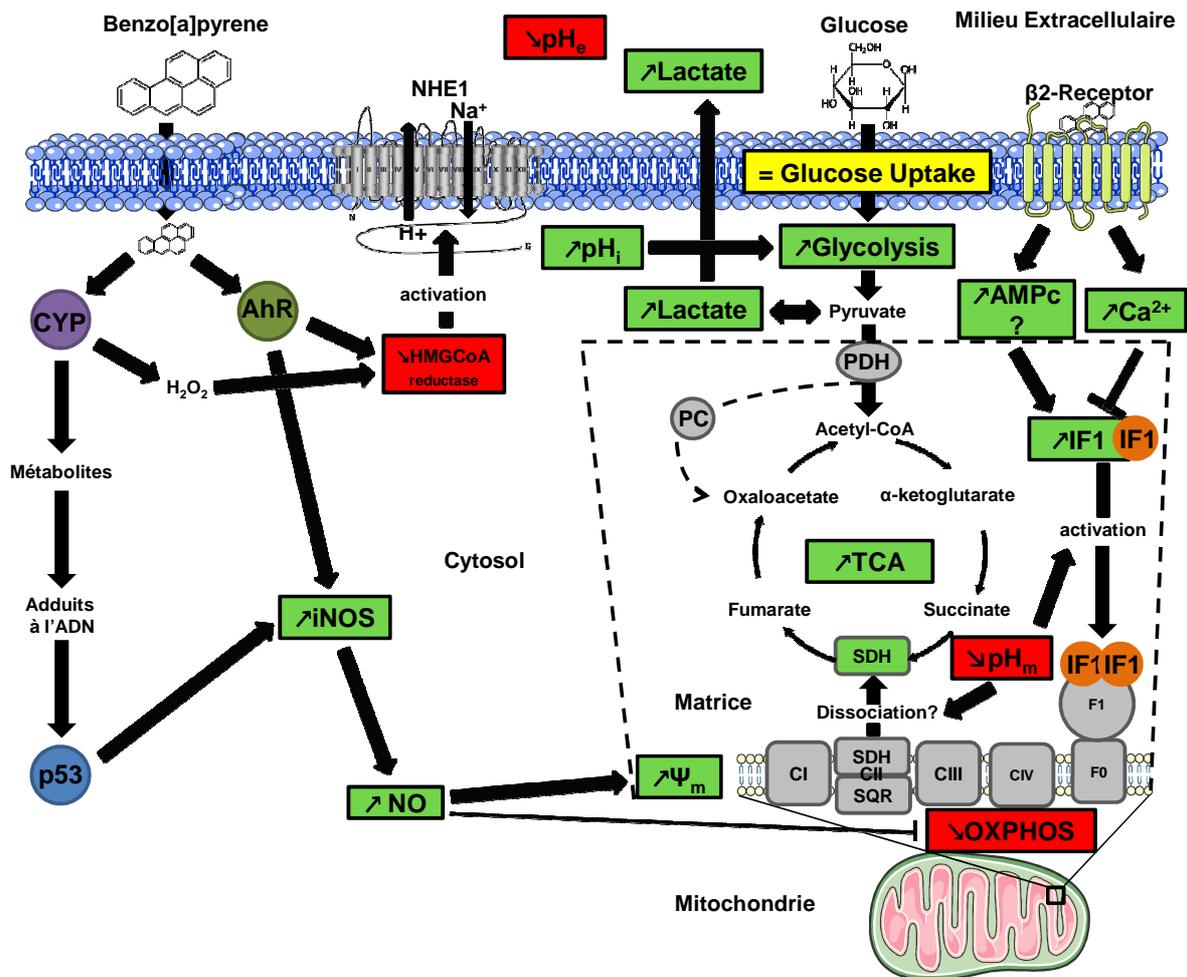


Figure 38. Schéma bilan modélisant la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P et impliquée dans la survie dans les cellules F258.

## I. Rôle de la production de NO

Nous avons mis en évidence dans cette thèse une nouvelle voie de survie induite par le B[a]P au niveau hépatique, cette voie faisant intervenir une production de NO, qui régule notamment le  $\Delta\Psi_m$ . Ceci est d'autant plus remarquable que de nombreuses modifications, qui se produisent au sein de la mitochondrie lors de la transformation maligne des cellules néoplasiques, sont liées à une augmentation du  $\Delta\Psi_m$ . Ainsi une hyperpolarisation mitochondriale a été associée à une perturbation de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose, une diminution de l'expression de certains gènes et/ou la survenue de délétions dans le génome mitochondrial, et des altérations des activités enzymatiques mitochondriales (Heerdt *et al.*, 2006). De plus, de nombreux modèles de lignées tumorales présentent constitutivement des valeurs de  $\Delta\Psi_m$  élevées (Fantin *et al.*, 2002). Au-delà du stress oxydant

et nitrosant, l'exposition chronique à des polluants environnementaux tels que les HAP, pourrait favoriser l'émergence de certains cancers, et ce, en maintenant le compartiment mitochondrial en état de stress *via* une production de NO, qui régulerait négativement l'OXPPOS. Dans notre modèle cellulaire d'étude, cette production de NO fait intervenir l'induction de la iNOS en réponse au B[a]P. Néanmoins, l'étude des mécanismes impliqués dans les dysfonctionnements mitochondriaux résultant d'une exposition aux hydrocarbures s'avère complexe, impliquant, comme nous l'avons vu, de nombreux partenaires. En conséquence, des travaux complémentaires seront nécessaires afin de caractériser pleinement les processus mis en jeu.

### **I-1. Rôles respectifs du RAh et de p53 dans la production de NO**

Comme l'ont démontré nos résultats dans la lignée épithéliale hépatique F258 exposée au B[a]P, l'activation simultanée du RAh et celle du gène suppresseur de tumeur p53, jouent un rôle primordial dans la production de NO ainsi que dans l'hyperpolarisation mitochondriale résultante. Cependant, des doutes subsistent quant au rôle de p53 dans les effets observés. En effet, il a déjà été montré que la pifithrine  $\alpha$ , l'inhibiteur pharmacologique utilisé ici, bloque la production de NO sous l'effet d'une stimulation au LPS dans la lignée de macrophages RAW 264.7. Cette inhibition était alors indépendante de l'effet inhibiteur de cette molécule sur p53, et passait plutôt par une régulation négative de l'expression de l'IFN- $\beta$  (Mendjargal *et al.*, 2013). En conséquence, pour confirmer l'implication de p53, il sera intéressant de tester sur la production de NO induite par le B[a]P, l'effet d'une extinction de p53 par des ARN interférents. Un tel résultat nous renseignera davantage sur la voie de signalisation majoritairement impliquée, RAh ou p53, dans la production de NO observée sous l'effet du B[a]P.

Même si p53 et RAh semblent impliqués, la part respective de ces deux cibles dans la production de NO n'a pas été clairement identifiée. Nos données montrent que l'inhibition de ces deux cibles par des inhibiteurs chimiques empêche l'induction de la iNOS, ce qui suggère un rôle à la fois de p53 et du RAh. Outre la validation de l'implication de p53, les rôles respectifs du RAh et de p53 dans cette induction restent donc à déterminer. Des travaux du laboratoire ont déjà mis en évidence une coopération entre le RAh et p53 dans la différenciation des cellules BeWo induite par le B[a]P (Le Vee *et al.*, 2013). Dans ces travaux, le RAh est impliqué dans la régulation des CYP. Ainsi, son activation par le B[a]P

pourrait favoriser l'activation de p53 en augmentant la production de métabolites réactifs, et donc les dommages à l'ADN.

Par ailleurs, il a été montré que l'activation du RAh bloque l'activation de p53 par un jeu de phosphorylation et d'acétylation dans la lignée HepG2, contribuant par ce biais au développement tumoral. Cet effet des ligands du RAh sur la régulation de p53 résulte alors de la fixation du RAh sur AGR2 (*Anterior GRadiant protein 2 homolog*) (Ambolet-Camoit *et al.*, 2010). Ce marqueur tumoral a été décrit pour favoriser la survie et la transformation néoplasique en contrecarrant la fonction de suppresseur de tumeur de p53 (Brychtova *et al.*, 2011).

Cependant, les précédents travaux du laboratoire (Tekpli *et al.*, 2010), ainsi que les analyses réalisées au cours de ma thèse dans la lignée F258 (article 1) impliquent un mécanisme différent de ceux décrits ci-dessus puisque la phosphorylation de p53 en réponse au B[a]P est détectée même en l'absence de RAh.

Il a été montré que le statut de p53, WT ou muté, influence le niveau d'expression du RAh dans des tissus cancéreux mammaires humains (Li *et al.*, 2014). L'activation de p53 dans des cellules humaines soumises à un stress génotoxique, conduit de plus à une augmentation de l'expression du RAh *via* un mécanisme post-transcriptionnel (Panchanathan *et al.*, 2015). Par ailleurs, il a été montré que le statut de p53 influence l'activité en tant que facteur de transcription du RAh; en effet, p53 est capable d'affecter l'expression de gènes sous le contrôle du RAh (Amit Kochhar *et al.*, 2014). Dans cette étude le fait de restaurer l'expression de p53 au moyen du CP-31398, une molécule chimique connue pour restaurer l'activité de p53 dans les cellules cancéreuses, abolissait l'induction des CYP1A1 et 1B1 par le B[a]P. Cet effet sur le RAh passerait notamment par l'induction de la protéine Aha1 (*activator of Heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1*) (Amit Kochhar *et al.*, 2014).

Quoi qu'il en soit, ces doutes quant à l'implication directe de p53 dans ce mécanisme pourraient être facilement levés en testant les effets d'une inhibition plus spécifique de ces deux cibles; une invalidation de p53 pourrait ainsi être réalisée afin d'analyser le rôle de p53 dans l'activation du RAh, et dans l'induction de la NOS et de l'hyperpolarisation mitochondriale.

## **I-2. L'isoforme mitochondriale de la NO Synthase pourrait-elle jouer un rôle dans ce mécanisme?**

Nous avons déterminé par des expériences d'immunolocalisation de la iNOS que cette production de NO sous l'impulsion du B[a]P semblait plutôt localisée dans le cytosol qu'au niveau des mitochondries. Cependant, l'utilisation du DAF2-DA en microscopie pour suivre la localisation du NO, indique également une production au niveau des mitochondries (Hardonnière et al., 2015, supplementary figure 2A). Ainsi, d'autres modalités de production du NO pourraient être impliquées. Il a été démontré au niveau hépatique chez le rat que la NO synthase mitochondriale (mtNOS) était fonctionnellement intégrée au complexe I. Dans ce modèle, plus l'activité du complexe I est soutenue et plus la mtNOS produit une quantité importante de NO. Ce mécanisme pourrait avoir pour effet d'harmoniser les activités des complexes suivants sur l'activité du complexe I; cependant, il pourrait aussi jouer un rôle dans l'autorégulation du complexe I puisqu'un effet inhibiteur du NO sur le complexe I est également connu. Par ailleurs, la mtNOS est calcium dépendante : plus la  $[Ca^{2+}]_m$  est élevée, et plus son activité est intense (Parihar *et al.*, 2008). De plus, même si dans notre modèle, le NO semble contrôler le  $\Delta\Psi_m$  et donc intervenir en amont de celui-ci, une relation inverse est également possible. En effet, l'activité de la mtNOS a été décrite comme reposant sur l'état métabolique des mitochondries modélisé par la force protomotrice, et semble préférentiellement liée à la composante  $\Delta\Psi_m$  plutôt qu'au pH matriciel. Ainsi, l'hyperpolarisation résultant de l'inhibition du complexe V par l'oligomycine A dans des mitochondries issues du cœur, du foie et des reins de rats Sprague-Dawley, avait pour effet de maximiser la production de NO par cette enzyme voltage-dépendante associée à la membrane interne. A l'inverse, la diminution progressive du  $\Delta\Psi_m$  diminuait graduellement la production de NO. Les auteurs en avaient notamment déduit que cette production de NO pourrait être un moyen de signaler au compartiment cytosolique une charge énergétique mitochondriale élevée (Valdez *et al.*, 2006). Ainsi, il serait intéressant d'approfondir ce point dans la lignée F258, afin de vérifier si cette isoforme mitochondriale des NOS participe ou non à la production de NO que nous avons caractérisée sous l'effet du B[a]P. Pour ce faire, il sera intéressant d'analyser le contenu en NOS dans les fractions mitochondriales par western blotting ; cependant les différentes isoformes de NOS sont particulièrement difficiles à détecter dans notre modèle par cette technique. Il nous faudra donc tenter d'affiner la résolution de nos expériences d'immunolocalisation afin de voir si la mtNOS est impliquée dans la production de NO à la mitochondrie dans notre modèle cellulaire.

### I-3. Rôle du NO dans la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P

En lien avec la régulation du  $\Delta\Psi_m$  et la capacité du NO à inhiber les complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire (Antico Arciuch *et al.*, 2012), nous avons donc voulu déterminer en perspective à ce projet si l'action protectrice du NO vis-à-vis de la mort cellulaire induite par le B[a]P pouvait impliquer une reprogrammation métabolique des cellules F258. En effet, quelques études ont clairement établi un lien entre production de NO et effet Warburg. Ainsi, un apport de NO exogène induit un effet Warburg dans des cellules de cancers ovariens, avec une glycolyse accrue, une réduction notable d'OXPPOS, malgré une augmentation du flux du TCA et de la glutaminolyse (Caneba *et al.*, 2014). Concernant nos travaux, l'utilisation du CPTIO, molécule piègeuse du monoxyde d'azote, en présence de B[a]P ne semble toutefois pas inhiber la reprogrammation métabolique (Figure 39). Il apparaît même que la réduction du contenu cellulaire en NO dans les conditions basales soit à l'origine d'une augmentation significative de l'accumulation de lactate dans le milieu extracellulaire. Différentes études semblent majoritairement établir que le NO favoriserait la glycolyse mais des données suggèrent également que celui-ci pourrait inhiber cette voie métabolique (Benavides *et al.*, 2013). En raison de la variété d'effets biologiques du NO, il serait donc intéressant de déterminer précisément les concentrations en NO dans nos différentes conditions afin de pouvoir discriminer le type de signalisation induite par le NO en fonction du contexte.

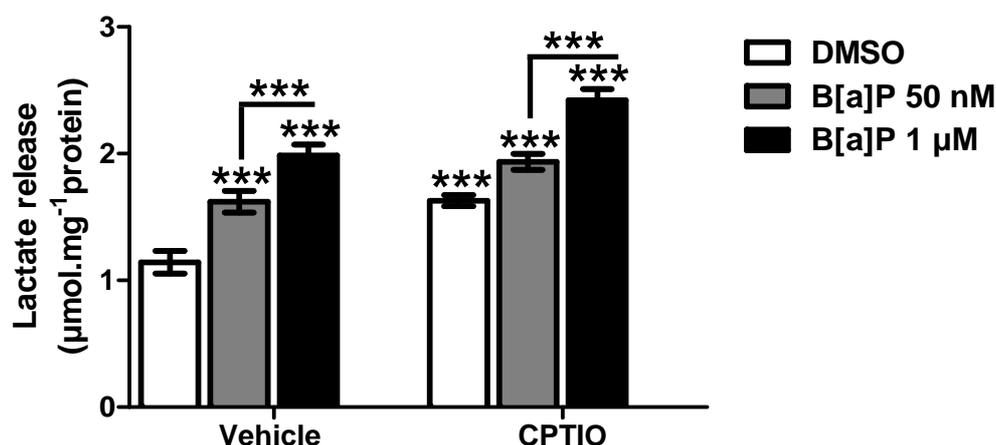


Figure 39. Effet du CPTIO (25  $\mu\text{M}$ ), un piègeur de NO, sur l'accumulation de lactate extracellulaire après 48 heures d'exposition au B[a]P. n=3.

Ainsi, en lien avec la capacité du NO à inhiber la phosphorylation oxydative (Cooper *et Giulivi*, 2007), il serait également intéressant d'identifier précisément les cibles

mitochondriales de cette molécule dans les cellules F258 exposées au B[a]P, en réalisant par exemple des expériences de biotin switch qui permettent de détecter la S-nitrosylation des protéines, et ensuite d'évaluer plus spécifiquement les effets de cette production de NO sur l'OXPPOS et le TCA.

Enfin, il sera intéressant de tester si la GTPase NOA1 (Nitric Oxide-Associated protein 1) est également impliquée. En effet, cette enzyme a été identifiée comme un régulateur majeur capable d'ajuster l'activité des enzymes de la phosphorylation oxydative en fonction des concentrations en oxygène disponibles. Pour ce faire, cette enzyme est régulée transcriptionnellement en fonction de la concentration en O<sub>2</sub> disponible ; elle pourrait notamment réguler l'activité des complexes en jouant sur l'expression et la stabilité de ces derniers, mais également par l'intermédiaire de modifications translationnelles. De plus, cette GTPase est aussi connue pour interagir avec les mitoribosomes, contrôlant par ce biais les synthèses protéiques mitochondriales (Kolanczyk *et al.*, 2011; Heidler *et al.*, 2011).

#### **I-4. Une action régulatrice du NO sur la survivine serait-elle à entrevoir ?**

Un lien entre le NO et la survie pourrait également reposer sur la survivine (BIRC5), une protéine inhibitrice de l'apoptose (IAP), d'autant qu'une corrélation entre l'expression de la iNOS et l'ARNm de cette protéine a été identifiée. En supprimant l'apoptose et en accélérant la prolifération, ce mécanisme pourrait jouer un rôle important dans la progression tumorale des carcinomes hépatocellulaires (Ikeguchi *et al.*, 2002). Tandis qu'une très forte concentration en NO exogène inhibait la survivine et sensibilisait les hépatocytes de rat à TRAIL *in vitro*, des concentrations plus modérées, retrouvées en réponse à l'activation de la iNOS, augmentaient l'expression de la survivine, favorisant ainsi la survie *via* les voies Akt/NFκB (Wang *et al.*, 2011). De plus, il a été identifié que la coopération entre la survivine et l'oncogène MYCN favorisait la survie et la prolifération, ainsi que l'acquisition d'un phénotype de type Warburg au cours de la transformation maligne (Hipp *et al.*, 2014). Au vu de l'impact du B[a]P sur le métabolisme énergétique dans notre modèle, cette modalité n'est pas non plus à exclure. A ce propos, il est intéressant de signaler que le RAh a été récemment montré comme responsable d'une induction de la survivine (Svobodová *et al.*, 2015).

## **II. Effet du B[a]P sur le métabolisme énergétique**

Contrairement à d'autres études, il est apparu que les variations du  $\Delta\Psi_m$  sous l'effet du B[a]P n'étaient pas transitoires dans notre modèle d'étude. L'impact du B[a]P sur ce paramètre est apparu comme dose-dépendant; de plus, l'intensité de cette hyperpolarisation semblait augmenter à mesure que la cinétique d'exposition évoluait (jusqu'à 72 heures). Ainsi, cet effet est fondamentalement distinct de l'hyperpolarisation transitoire précoce précédant la rupture de la membrane externe et la relargage des facteurs pro-apoptotiques (Poppe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003); il s'inscrit au contraire dans un contexte de survie en lien avec la transformation des cellules. De plus, l'impact du B[a]P sur la morphologie des cellules F258, même à faible dose, nous a encouragés à poursuivre les investigations quant à la capacité du B[a]P à promouvoir la survie. Dès lors, nous avons voulu évaluer les effets de notre composé sur le métabolisme énergétique. Nous avons pu montrer qu'en présence de B[a]P, le phénotype des cellules F258 devenait plus mésenchymateux, avec un potentiel de migration accru. Le métabolisme énergétique, quant à lui, subissait une reprogrammation de type Warburg, avec un ralentissement significatif de la phosphorylation oxydative et de la respiration, et une accélération du flux glycolytique.

### **II-1. Le RAh serait-il également un régulateur clé du métabolisme mitochondrial?**

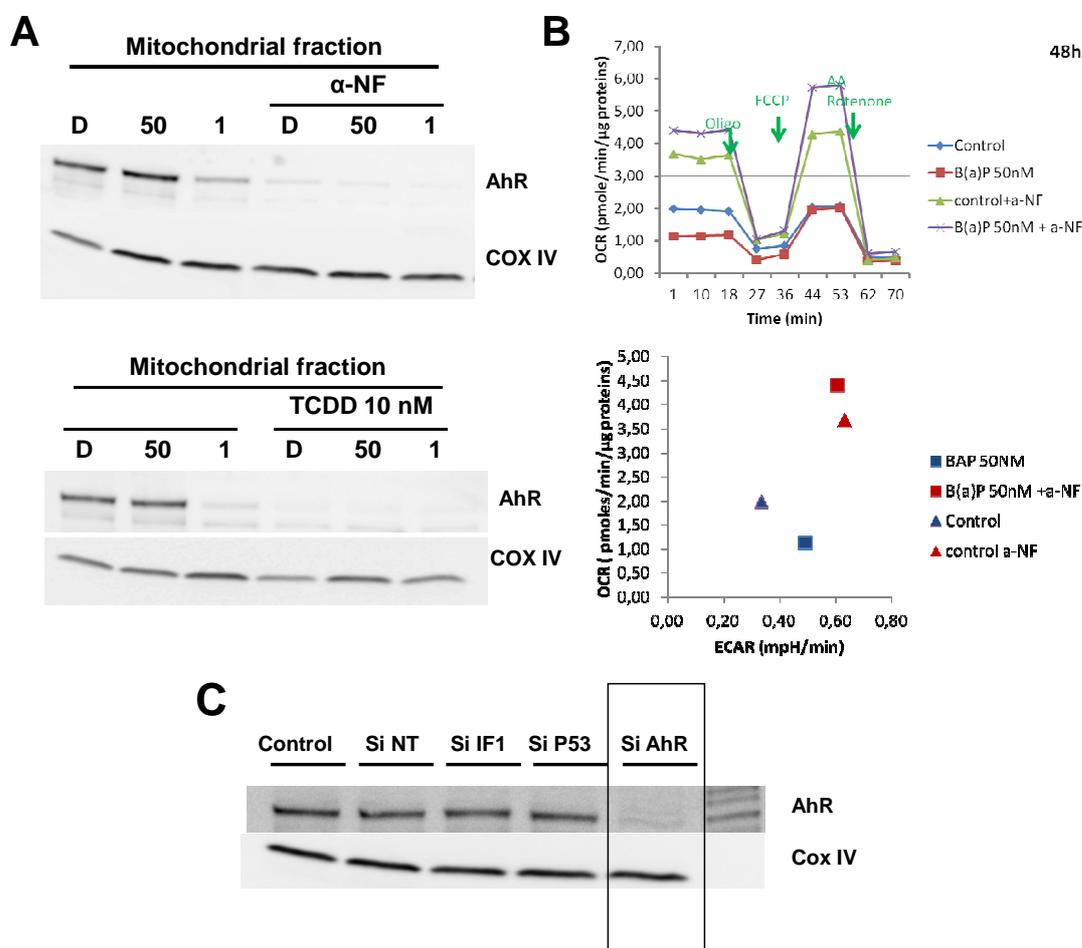
Nos résultats ont démontré que le récepteur Ah était impliqué dans la reprogrammation métabolique médiée par le métabolisme du B[a]P. Ainsi, l'inhibition de sa translocation nucléaire par le CH223191, un antagoniste du RAh (Données non présentées), ainsi que l'extinction de son expression par siRNA bloquent l'accumulation de lactate extracellulaire induite par une faible concentration de B[a]P. Peu de données sont disponibles quant à un éventuel rôle du RAh dans la reprogrammation métabolique. Cependant, l'activation transcriptionnelle du RAh par la TCDD avait permis d'identifier que ce récepteur était impliqué dans la régulation de gènes du métabolisme mitochondrial tels que des sous-unités des complexes I, III, IV et V (Forgacs *et al.*, 2010). Une étude fait également état de la capacité du RAh à réguler l'expression de la GAPDH sous l'effet d'une stimulation par la TCDD ou par la  $\beta$ -naphthoflavone (Reyes-Hernandez *et al.*, 2009). Or, cette enzyme de la glycolyse est un senseur du stress lié au NO et est par ailleurs régulée par nitrosylation. Cette enzyme est également connue pour agir comme un facteur de survie; en effet, l'augmentation de son expression, en plus de maintenir un niveau d'ATP suffisant pour la survie en amplifiant la

glycolyse, semble promouvoir le recyclage des mitochondries endommagées par l'autophagie dans les cellules HeLa (Colell *et al.*, 2007; Colell *et al.*, 2009). Cependant, l'expression de cette dernière ne semble pas véritablement modifiée dans notre modèle d'étude (données non publiées).

Les études sur le RAh ont longtemps été confinées à un cadre strictement toxicologique, en lien avec ses ligands exogènes: la TCDD ou les hydrocarbures, dont le B[a]P (Barouki *et al.*, 2007). Pour autant, son activité transcriptionnelle régule de nombreuses fonctions cellulaires comme le système immunitaire et l'inflammation, la différenciation, le cycle cellulaire, la mort cellulaire ou encore la migration (Lindsey et Papoutsakis, 2012). Au-delà de ses activités transcriptionnelles, de nouvelles fonctions du RAh ont été identifiées comme son activité E3 ubiquitine ligase (Ohtake *et al.*, 2007). Quant à un éventuel rôle du RAh à la mitochondrie, très peu de données sont disponibles. Or, nos travaux suggèrent que ce récepteur pourrait également avoir un important rôle en tant que régulateur du métabolisme mitochondrial. En effet, la TCDD induisait non seulement une hyperpolarisation transitoire de la membrane mitochondriale détectable depuis 24h jusqu'à 48h d'exposition (Hardonnière et al., 2015, supplementary figure 6), mais aussi une augmentation de la production de lactate. De plus, l'inhibition spécifique du RAh par le CH223191 bloquait totalement l'hyperpolarisation induite par le B[a]P (hardonnière *et al.*, Figure 6A), de même que la production de lactate (Données non présentées). Dans ce contexte, même si on ne peut exclure à l'heure actuelle un rôle transcriptionnel du RAh dans la régulation du métabolisme énergétique, le pool mitochondrial de ce récepteur pourrait jouer un rôle clé, qui reste à définir.

A cet égard, Tappenden et ses collaborateurs avaient démontré, dans la lignée Hepa1c1c7, grâce à l'utilisation de la méthode tap (tandem affinity purification) couplée à la spectrométrie de masse, qu'en l'absence de ligand, le RAh interagissait fortement avec la sous-unité ATP5 $\alpha$ 1 de la F0F1ATPase (Tappenden et al., 2011). Nous avons également pu détecter le RAh dans les fractions mitochondriales de la lignée F258. Le B[a]P ou la TCDD provoquaient la sortie du RAh du compartiment mitochondrial dans notre modèle (Figure 40A). De plus, dans la recherche des voies de signalisation impliquées dans la régulation d'IF1, nous avons pu constater que l' $\alpha$ -NF, un inhibiteur du métabolisme du B[a]P, diminuait significativement le pool mitochondrial du RAh, contrairement au CH223191, connu pour bloquer la translocation nucléaire du récepteur Ah. L' $\alpha$ -NF a également été testé vis-à-vis de la respiration cellulaire. Les expériences ont révélé qu'en présence d' $\alpha$ -NF, la respiration des cellules F258 était fortement stimulée, aussi bien dans les conditions témoins qu'en présence de B[a]P (Figure

40B). De plus, alors que le B[a]P diminuait la respiration dans les conditions témoins, il potentialisait celle-ci en présence d' $\alpha$ -NF. En lien avec les travaux de Tappenden, nos travaux suggèrent donc également une localisation mitochondriale du RAh, qui pourrait permettre de réguler OXPHOS indépendamment de son activité transcriptionnelle. En effet, cette équipe avait identifié que, dans les cellules Hepa1c1c7, la TCDD induisait une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, et celle-ci avait alors été corrélée à une diminution du contenu mitochondrial de la protéine RAh (Tappenden *et al.*, 2011). Il est intéressant de signaler ici que l'utilisation de siRAh induit une forte diminution du RAh à la mitochondrie (Figure 40C). En revanche, l'utilisation des sip53 et siIF1 reste sans effet sur le contenu mitochondrial en RAh (Figure 40C).



**Figure 40. L'effet du B[a]P sur le contenu mitochondrial en RAh dans la lignée F258 pourrait avoir un rôle prépondérant dans l'activité métabolique de l'organite.** (A) Analyse du pool mitochondrial d'AhR par western blotting. (B) La consommation d'oxygène (OCR) ainsi que l'acidification extracellulaire (ECAR) ont été analysées avec le kit Mito Stress sur un Seahorse XF24. Les valeurs d'OCR ont également été exprimées en fonction des valeurs d'ECAR afin de mettre en exergue le profil métabolique des cellules dans les différentes conditions. (C) Extinction du RAh à la mitochondrie par siRNA.

Ainsi, cette modulation de la quantité de RAh localisé à la mitochondrie pourrait être directement liée à l'élévation significative de la consommation d'oxygène que nous avons observée. Cette présence du RAh à la mitochondrie pourrait dès lors agir comme un régulateur physiologique de la machinerie oxydative, mais pourrait aussi de par sa translocation, signaler des situations de stress aux autres compartiments cellulaires. Dans ce contexte, ces résultats très préliminaires, mériteront d'être confirmés et approfondis. Il sera notamment intéressant de réaliser des expériences d'immunoprécipitations afin de vérifier si le RAh interagit directement avec l'ATPase dans notre modèle. Une lignée stable déficiente en RAh pourra également être générée afin d'évaluer l'éventuel impact du RAh sur le métabolisme mitochondrial dans les conditions basales, en comparant par exemple les niveaux de respiration de ces deux lignées.

## **II-2. Quelle est la contribution du pH à la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P?**

L'une des découvertes majeures de l'équipe a été d'identifier que le métabolisme du B[a]P par les CYPs était responsable de l'activation de NHE1 dans la lignée F258, cette activation conduisant à une alcalinisation intracellulaire (Huc *et al.*, 2004; Huc *et al.*, 2007; Tekpli *et al.*, 2012). Or, une telle alcalinisation médiée par NHE1 a déjà été identifiée comme un événement précoce dans la transformation maligne, ce facteur favorisant notamment l'acquisition d'un phénotype de type Warburg (Reshkin *et al.*, 2000). Ce paramètre est en effet connu pour augmenter l'activité des enzymes de la glycolyse (Alfarouk *et al.*, 2014). Dans notre modèle d'étude, l'activation de NHE1 en réponse au B[a]P, avait été reliée à la mort cellulaire (Huc *et al.*, 2004). Cependant, dans un autre modèle, les cellules Hepa1c1c7, dans lesquelles NHE1 est également activé par le B[a]P, cette activation ne semble pas être impliquée dans l'apoptose associée (Holme *et al.*, 2007). Malgré ces divergences fonctionnelles dans l'établissement de la mort cellulaire, nos résultats mettent clairement en évidence que cette cible du B[a]P est impliquée dans la reprogrammation métabolique induite dans ces deux lignées. Ces différences concernant l'implication de NHE1 dans les voies de mort et de survie induites par le B[a]P pourraient provenir du phénotype différent entre les cellules F258 et Hepa1c1c7: spontanément transformé et cancéreux, respectivement. Une autre explication pourrait être que différentes fonctions de NHE1 (transport des H<sup>+</sup> ou plateforme de signalisation) interviennent dans les voies de mort et de survie sous l'effet du B[a]P.

Nous avons également testé la capacité d'autres HAP à promouvoir la reprogrammation métabolique. Nous avons ainsi constaté que le DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]thracene) était également à l'origine d'une production de lactate exacerbée. Or, l'équipe avait déjà pu mettre en évidence que cet hydrocarbure était également responsable d'une alcalinisation intracellulaire (Huc *et al.*, 2004). Ce résultat confirme ainsi l'importance de l'activation de NHE1 dans la détermination du phénotype glycolytique. Dans ce contexte, il sera judicieux de tester l'effet du cariporide sur l'activité des enzymes de la glycolyse afin d'approfondir le rôle du pH dans cette reprogrammation.

Une stimulation de l'activité de certaines enzymes de la glycolyse avait été identifiée de longue date dans les tissus pulmonaires de souris traitées au B[a]P (Rády *et al.*, 1980). Dans notre étude, il est apparu que l'activation de l'échangeur NHE1 était impliquée dans l'augmentation de l'oxydation du glucose promue par le B[a]P. Un rôle de l'activation de NHE1 dans la stimulation de l'oxydation du glucose et du cycle des acides tricarboxyliques a déjà été rapporté. Ce mécanisme permettait, *via* l'activation du transporteur NHE1, de limiter les lésions cardiaques en cas d'ischémie-reperfusion chez la souris (Mraiche *et al.*, 2011). C'est pourquoi, dans nos conditions, un effet direct du pH sur l'activité des enzymes du cycle de Krebs est envisagé. Les effets du B[a]P sur le TCA pourraient impliquer la forme mitochondriale de NHE1 (mNHE1). En effet, cette isoforme, également sensible au cariporide, a été décrite récemment dans le tissu cardiaque, et pourrait jouer un rôle dans la régulation du pH mitochondrial (Garciaarena *et al.*, 2008; Alvarez et Villa-Abrille, 2013); en effet, son activation conduirait à un afflux de protons dans la matrice mitochondriale (Alvarez et Villa-Abrille, 2013). De plus, un rôle de cette isoforme dans la survie a déjà été suggéré; en effet, l'activité de celle-ci pourrait permettre de prévenir l'ouverture du PTP lors d'une stimulation calcique, et jouerait donc également un rôle dans le maintien du  $\Delta\Psi_m$  (Alvarez et Villa-Abrille, 2013). Or, dans les cellules F258, le B[a]P induit dès 24 heures, et au moins jusqu'à 48 heures, une acidification de la matrice mitochondriale. Ce résultat pourrait donc impliquer un effet du B[a]P sur cette isoforme mitochondriale de NHE1, mais nous devons poursuivre les investigations pour tester cette hypothèse. Il semble ainsi possible d'inhiber spécifiquement cette isoforme (Villa-Abrille *et al.*, 2011), afin de déterminer si elle est à l'origine de l'acidification matricielle que nous avons observée sous l'effet du B[a]P.

L'acidification matricielle induite par le B[a]P pourrait être à l'origine de la dissociation du complexe II (Lemarié *et al.*, 2011), d'où une stimulation du TCA (Grimm, 2013; Hwang *et al.*, 2014), et ce, malgré les effets délétères du B[a]P sur la machinerie oxydative. Afin

d'affiner nos résultats, il sera intéressant de confirmer notre hypothèse du point de vue de la dissociation du complexe II par Blue native gel PAGE. De même, un diagnostic mitochondrial par oxygraphie, permettra de déterminer plus spécifiquement quelles altérations fonctionnelles de la chaîne respiratoire sont provoquées par le B[a]P. Concernant le complexe II, si sa dissociation est confirmée, nous pourrions alors tester l'effet du cariporide afin de voir si l'activation de NHE1 par le B[a]P est impliquée. En outre, comme décrit précédemment, nos travaux suggèrent également l'implication du récepteur Ah dans la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P. Comme nos travaux antérieurs avaient identifié que le RAh était impliqué dans l'activation de NHE1 sous l'effet de ce cancérigène dans les cellules F258 via son rôle dans le remodelage membranaire (Tekpli *et al.*, 2010; 2012), il n'est pas à exclure que l'action du récepteur Ah dans la reprogrammation glycolytique soit principalement liée à cette activation de NHE1. Ainsi, l'utilisation de siRAh pourra permettre de tester l'implication de ce récepteur dans l'acidification matricielle et la dissociation du complexe II.

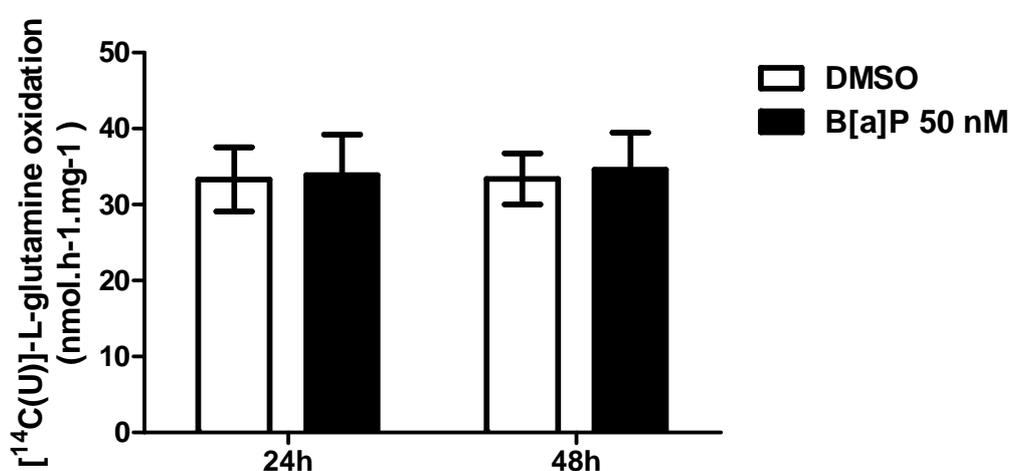
### **II-3. Quel est le rôle joué par p53 dans la reprogrammation métabolique induite par le B[a]P?**

Il est apparu que p53 était aussi impliqué dans les remaniements métaboliques observés sous l'effet du B[a]P dans les cellules F258 (Résultats complémentaires article 2). Nous avons cependant choisi de ne pas inclure ces résultats préliminaires dans l'article 2 puisqu'il nous reste à comprendre comment l'ensemble des acteurs interagissent entre eux. p53 joue un rôle critique dans le contrôle d'un certain nombre de processus cellulaires, y compris l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la stabilité du génome, et l'angiogenèse. Sa capacité à réguler le métabolisme énergétique a déjà été décrite puisque p53 est impliqué dans la régulation du transport de glucose (Swartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004), de la glycolyse *via* TIGAR (Bensaad *et al.*, 2006), de la voie des pentoses phosphates, du cycle de Krebs, du métabolisme de la glutamine (Hu *et al.*, 2010) ou encore de OXPHOS (Matoba *et al.*, 2006), en interagissant avec le complexe V (Bergetaud *et al.*, 2013). p53 régule ainsi le métabolisme en limitant la glycolyse et en améliorant la phosphorylation oxydative (Kruiswijk *et al.*, 2015).

Dans notre modèle, l'activation de p53 par le B[a]P jouerait également un rôle dans la survie en lien avec les modifications métaboliques que nous avons pu mettre en évidence. En effet, l'inhibition de p53 bloque, au même titre que pour le RAh, la reprogrammation métabolique observée (Résultats complémentaires article 2, Figure B). Un tel effet va à l'encontre de ce qui est classiquement décrit quant au rôle de p53 dans la reprogrammation métabolique. Dès lors,

on pourrait envisager que dans ce contexte ces effets de p53 sur le métabolisme passent plutôt par un effet régulateur de ce dernier sur l'activité transcriptionnelle du RAh (Kocchar et al., 2014), comme décrit plus haut. Cette hypothèse pourrait par ailleurs permettre d'expliquer pourquoi l'inhibition de ces deux cibles distinctes conduit à une inhibition très marquée de la reprogrammation métabolique promue par le B[a]P.

Par ailleurs, l'activation de p53 est connue pour favoriser la conversion de la glutamine en glutamate pour amplifier le TCA. Cependant, un tel effet n'a pas été observé dans notre modèle cellulaire; en effet, les niveaux d'oxydation de la glutamine ne sont pas modifiés sous l'effet du B[a]P (Figure 41).



**Figure 41. Effet du B[a]P sur l'oxydation de la glutamine. (n=3)**

Si l'implication de p53 dans la régulation du métabolisme n'est plus à démontrer, les modalités demeurent relativement complexes puisque le statut de p53 (Galluzzi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), ainsi que son niveau d'expression orientent considérablement le type de réponse (Antico Arciuch *et al.*, 2012). Dans la suite de ce travail, il s'agira donc de clarifier le statut de p53 dans notre lignée.

### **III. Le peptide IF1, une cible mitochondriale des hydrocarbures**

Les travaux précédents de l'équipe avaient suggéré que la F0F1ATPase pouvait être une cible du B[a]P, celui-ci supposé induire une activité reverse de cette ATPase, responsable d'une acidification cytosolique secondaire (Huc *et al.*, 2006). Ainsi, en lien avec les

dysfonctionnements métaboliques préalablement caractérisés, nous avons cherché à étudier plus spécifiquement la régulation du complexe V. C'est ainsi que nous avons identifié IF1, l'inhibiteur physiologique de l'ATPase, comme un candidat potentiel pour expliquer les effets observés. De façon intéressante, l'apoptose induite par le B[a]P dans les cellules F258 ne fait pas intervenir la libération du cytochrome c. Ceci pourrait être justement dû à l'action d'IF1, qui, lorsqu'il est fixé sur la sous-unité F1 de l'ATPase, bloquerait l'ouverture du PTP, ce dernier étant formé du dimère de F0F1ATPase (Giorgio *et al.*, 2013; Bernardi *et al.*, 2015). Cependant, nous avons mesuré l'activité synthase du complexe V mais nous n'avons évalué qu'indirectement son activité hydrolase par une analyse des concentrations en ATP intracellulaire en présence d'oligomycine A. Il sera donc également nécessaire d'affiner ces données en réalisant cette mesure. De plus, il sera intéressant de voir si l'extinction d'ATPIF1 entraîne une libération du cytochrome c et une augmentation de l'activité des caspases dans les cellules F258 traitées par le B[a]P.

### **III-1. La balance AMPc/Ca<sup>2+</sup> est-elle déterminante dans la régulation d'IF1?**

Il nous a été difficile d'identifier précisément les modalités de régulation du peptide inhibiteur IF1 par le B[a]P. Néanmoins, il nous est vite apparu que l'augmentation du contenu mitochondrial en IF1 était indépendante du métabolisme du B[a]P, ainsi que des voies classiquement activées par cet hydrocarbure dans notre modèle. En effet, plutôt que de prévenir l'augmentation du contenu mitochondrial d'IF1 sous l'effet du B[a]P, l'inhibition chimique de certaines de ces voies potentialisait cette augmentation. A ce propos, bien que les mécanismes impliqués dans cette potentialisation restent à déterminer, il est intéressant de noter que celle-ci était associée à une perte du RAh mitochondrial. Nous avons testé l'implication de la voie  $\beta$ 2 adrénergique, connue pour être activée par le B[a]P, et ce, indépendamment de son métabolisme; l'activation de cette voie conduit à une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Mayati *et al.*, 2012). Une stimulation a ainsi été réalisée au moyen d'une forme perméante d'AMPc, à savoir le 8-Br-AMPc. Nous avons pu observer que l'apport exogène de ce second messager avait pour effet d'augmenter l'expression d'IF1. Nous avons ensuite voulu approfondir les résultats et confirmer un tel rôle de la voie  $\beta$ 2 dans la régulation d'IF1 en jouant sur l'expression de ce récepteur par une stratégie de siRNA. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à éteindre significativement son expression. Nous avons donc cherché à inhiber les intermédiaires clés de cette voie de signalisation cellulaire. Cependant, les expériences visant à tester l'effet d'une inhibition de la protéine

kinase PKA par le H89 n'ont pas donné de résultats probants vis-à-vis de l'induction du peptide IF1 en présence de B[a]P. Pourtant, l'activation de la voie PKA par l'AMPC a déjà été impliquée dans la régulation d'OXPLOS (Acin-Perez *et al.*, 2009), et joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme mitochondrial (Acin-Perez *et al.*, 2011). Dès lors, une production d'AMPC localisée à la membrane mitochondriale pourrait donc être directement impliquée. Dans ce contexte, la protéine adaptatrice AKAP121, jouerait un rôle de recrutement des adénylates cyclases solubles (ACs) permettant une production localisée d'AMPC au niveau mitochondrial (Huang *et al.*, 1997). Il a d'ailleurs été montré que lorsque l'intégrité de cette protéine est compromise, elle est la source d'importants dysfonctionnements mitochondriaux, nuisant significativement à la survie des cellules (Perrino *et al.*, 2010). Mais d'autres AKAPs comme WAVE1 (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1*) (Danial *et al.*, 2003), ou encore SKIP (*Sloan-Kettering Institute Protein*) (Means *et al.*, 2011), pourraient être à l'origine du recrutement d'ACs à la mitochondrie. Un tel mécanisme pourrait ainsi être impliqué pour réguler l'activité mitochondriale en situation de stress, notamment *via* IF1, dans le but de préserver l'intégrité de l'organite et la survie des cellules. Ainsi, il sera intéressant de mesurer les niveaux d'AMPC totaux et mitochondriaux afin de tester cette hypothèse, mais également d'approfondir ce point en testant l'implication des AKAPs. Parmi les pistes les plus probables, un rôle du pool d'AMPC mitochondrial ainsi constitué dans la régulation de la protéase mitochondriale Lon serait à entrevoir (Osbourne *et al.*, 2014), d'autant qu'une telle modalité de régulation d'IF1 a déjà été suggérée (Shen *et al.*, 2009).

Parallèlement à l'AMPC, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un autre messager résultant de l'activation de la voie  $\beta 2$ . L'utilisation du chélateur calcique BAPTA-AM (Figure 6A, Article 3), suggère que l'homéostasie calcique jouerait un rôle négatif dans la régulation d'IF1, puisque le BAPTA-AM potentialisait son induction. Par ailleurs, le calcium est un élément essentiel dans les interactions entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie F1 ainsi que la sous-unité e de la partie F0 de la F0F1ATPase (Bernardi *et al.*, 2015) ; il pourrait également influencer l'efficacité de l'ATPase par ce biais. Un rôle de la calmoduline dans la régulation d'IF1 a déjà été identifié (Contessi *et al.*, 2007) ; une compétition entre cette dernière et IF1 pour la liaison sur l'ATPase n'est pas exclue. Il sera ainsi déterminant de tester le rôle de la calmoduline, afin de déterminer plus précisément de quelle façon le calcium intervient dans la régulation d'IF1.

Dès lors, l'équilibre de la balance AMPC/  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait être un élément déterminant pour la régulation d'IF1. En outre, des changements en  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  se traduiraient également par une

modulation de la production d'AMPc. Cependant, ces effets semblent particulièrement complexes, puisque ces deux messagers, AMPc et  $\text{Ca}^{2+}$ , s'influencent réciproquement, avec parfois des rôles antagonistes ou alors synergiques (Antico-Arciuh *et al.*, 2012). Il sera donc primordial d'éclaircir les interactions de ces deux messagers, en regardant par exemple l'effet d'une chélation du  $\text{Ca}^{2+}$  par le BAPTA-AM, ou de l'inhibition de l'import calcique à la mitochondrie avec du RU360, molécule ciblant le MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*), sur le niveau d'AMPc à la mitochondrie.

Une publication a très récemment abordé les modalités de régulation d'IF1 par la voie  $\beta$ -adrénergique. Dans ce travail, l'action de cette voie passerait par une phosphorylation directe d'IF1 par la PKA (García-Bermúdez *et al.*, 2015). Ainsi, en interférant avec le ligand endogène du récepteur  $\beta_2$ , le B[a]P pourrait perturber les processus de régulation du métabolisme énergétique. Il faudra donc s'intéresser également au statut de phosphorylation d'IF1 dans la suite de notre travail. Cependant, il est important de souligner ici que nos résultats n'avaient pas seulement relié l'activation de la voie  $\beta_2$ -adrénergique par le B[a]P à l'activation du peptide, mais montraient également que cette voie jouait un rôle dans la régulation de l'expression d'IF1, avec une légère augmentation du niveau de son ARNm, suggérant un mécanisme plus complexe qu'une simple phosphorylation.

### **III-2. L'impact d'IF1 sur la dynamique mitochondriale : un élément déterminant dans la survie ?**

Bien que le B[a]P soit impliqué dans les différentes phases du développement tumoral, la contribution des dysfonctionnements mitochondriaux provoqués par cet agent à la transformation des cellules néoplasiques est encore mal connue. L'hyperpolarisation mitochondriale observée pourrait être liée à l'activation d'IF1, comme cela a déjà été identifiée (Sánchez-Cenizo *et al.*, 2010; Formentini *et al.*, 2012). Dans ce contexte, l'activation d'IF1, en favorisant un remodelage structural profond, pourrait favoriser la survie en préservant l'intégrité du réseau mitochondrial (Campanella *et al.*, 2009). Ce mécanisme faciliterait la biogenèse et la fusion mitochondriale. Ainsi, l'exposition aux HAP pourrait permettre de sélectionner des sous-populations mitochondriales présentant une meilleure plasticité métabolique et un  $\Delta\Psi_m$  plus élevé. Dans ce contexte, l'action inhibitrice d'IF1 sur la FOF1ATPase agirait comme un mécanisme de survie, permettant aux mitochondries endommagées de contourner les mécanismes de contrôle de qualité mitochondriaux, en induisant une hyperfusion (Campanella *et al.*, 2009). En effet, ce mécanisme a été identifié

comme un processus visant à préserver la viabilité cellulaire, l'élongation mitochondriale permettant aux mitochondries d'échapper aux processus de dégradation lorsque l'autophagie est soutenue (Gomes *et al.*, 2011). De plus, la surexpression d'IF1 conduit en parallèle à un ralentissement des processus autophagiques (Campanella *et al.*, 2009). Nous avons donc été interpellés par le fait que le B[a]P, qui augmentait l'expression d'IF1 dans notre modèle F258, induisait des effets similaires sur le réseau mitochondrial, avec un déséquilibre marqué de la balance fission/fusion en faveur de la fusion. Par ailleurs, l'hyperfusion mitochondriale, qui est dépendante du  $\Delta\Psi_m$ , est connue pour transitoirement tamponner les effets liés aux dysfonctionnements de la chaîne respiratoire, et ainsi éviter le recyclage des mitochondries altérées par des processus mitophagiques (Twig et Shirihai, 2011). Même si cet effet semble clairement lié à l'augmentation de l'expression d'IF1, nous n'avons cependant pas vérifié si l'extinction d'IF1 empêche les processus de fusion mitochondriaux.

Un  $\Delta\Psi_m$  élevé a aussi été relié à un renforcement de l'efficacité de la machinerie mitochondriale d'import/export protéique, ce qui pourrait favoriser le recyclage du contenu protéique mitochondrial en dépit du ralentissement des processus mitophagiques (Schmidt, 2010; Galluzzi *et al.*, 2012). Un tel mécanisme pourrait ainsi améliorer la résistance de ces mitochondries, et plus globalement des cellules lors des situations de stress (Harbauer *et al.*, 2014). Par ailleurs, cette pression de sélection exercée par les polluants de l'environnement pourrait par exemple expliquer les fréquences étonnement élevées d'homoplasmie dans les mutations de l'ADNmt retrouvées dans les tumeurs, en lien avec les altérations de la machinerie oxydative (Coller *et al.*, 2001; Gasparre *et al.*, 2013). Ainsi, il sera important de vérifier dans notre modèle que l'extinction d'IF1 prévient bien de ces phénomènes d'hyperfusion mitochondriale. Il pourrait également être intéressant d'évaluer l'impact de cette extinction sur le dysfonctionnement autophagique que nous avons pu caractériser dans les cellules F258 exposées au B[a]P, et qui sera détaillé à la fin de cette partie.

La production de NO a également été décrite pour jouer un rôle dans la régulation de la structure du réseau mitochondrial. Cependant, l'induction de la iNOS serait plutôt responsable d'un déséquilibre de la balance fission/fusion en faveur de la fission (Gonzalez *et al.*, 2014), (Kanga Price *et al.*, 2014). La protéine DRP1 (*Dynamamin-Related Protein 1*), protéine impliquée dans la fission des mitochondries, est en effet régulée par S-nitrosylation. Il semblerait que cette modalité de régulation aboutisse à un emballement des processus de fission (Cho *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2010). Ceci ne semble pas en adéquation avec ce que nous avons observé puisque dans notre modèle, le déséquilibre de la balance

fusion/fission sous l'effet du B[a]P apparaît nettement en faveur de la fusion. Ainsi cet effet marqué sur la fusion pourrait être lié plutôt à l'activation de la PKA par le NO et ses dérivés (Kamga Pride *et al.*, 2014). A cet égard, il faut signaler que l'activation de cette kinase par le NO, toujours en lien avec une fusion marquée du réseau mitochondrial, a également été associée à une stimulation de la glycolyse dans des adipocytes (Khoo *et al.*, 2014). Par conséquent, il sera intéressant de tester aussi l'effet d'une inhibition de la production de NO sur l'ultrastructure du réseau mitochondrial afin de voir, au-delà de l'hyperpolarisation, si celle-ci contribue également à ces effets sur la dynamique du réseau mitochondrial sous l'effet du B[a]P.

### **II-3. IF1 et autophagie**

Plusieurs études récentes, bien que rares, établissent clairement l'implication d'IF1 dans les processus autophagiques. Ainsi, dans les cellules HeLa, le niveau d'expression d'IF1 déterminerait l'intensité des processus de dégradation autophagique; plus l'expression du peptide inhibiteur va être importante et plus le flux autophagique sera ralenti (Campanella *et al.*, 2009). De plus, une étude génomique suggère qu'IF1 serait essentiel pour le recyclage des mitochondries endommagées *via* des processus mitophagiques, en permettant notamment le recrutement de PARK2 à la mitochondrie (Lefebvre *et al.*, 2013). Au-delà de l'implication d'IF1, il apparaît clairement que la régulation de la machinerie autophagique est intimement liée au métabolisme énergétique (Galluzzi *et al.*, 2014). La fonction d'IF1 vis-à-vis du cycle mitochondrial serait alors double, stimulant non seulement la fusion mitochondriale mais jouant également un rôle dans l'élimination des mitochondries altérées.

Malgré le caractère ubiquitaire d'IF1 chez les eucaryotes et son importance dans la physiologie des mitochondries, il semblerait qu'IF1 ne soit pas une protéine indispensable. En effet, l'autophagie ne semble pas altérée dans un modèle de souris KO pour IF1 en l'absence de stress (Nakamura *et al.*, 2013). Cependant, comme le démontrent nos travaux, l'intérêt de ce peptide se trouverait plutôt dans sa capacité à préserver la survie des cellules, notamment dans des situations de stress exacerbé, en limitant les dégâts causés aux mitochondries, mais aussi en évitant l'épuisement des réserves énergétiques.

Au cours de l'autophagie, la morphologie du réseau mitochondrial va fortement influencer le devenir des cellules. Ainsi, lorsque des processus autophagiques vont se mettre en place, le niveau d'AMPc va augmenter, conduisant à l'activation de la PKA (*Protéine Kinase A*). La

PKA va alors phosphoryler DRP1, ce qui va avoir pour effet de bloquer sa translocation mitochondriale, favorisant ainsi la fusion (Gomes *et al.*, 2011). Ce mécanisme va avoir pour effet de protéger les mitochondries vis-à-vis de leur éventuelle dégradation par des processus autophagiques. Au-delà de l'aspect purement morphologique, ces mitochondries vont également présenter des crêtes plus denses, ainsi qu'un degré de dimérisation et une activité plus importante de l'ATP synthase, d'où une capacité maintenue à synthétiser de l'ATP. Ce mécanisme de protection des organites a pu être identifié à la fois *in vitro* dans un modèle de cellules MEFs et *in vivo* (Gomes *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que GSK3, une cible du B[a]P dans notre modèle, renforçait cette voie AMPc/PKA/Drp1 (Loh *et al.*, 2015).

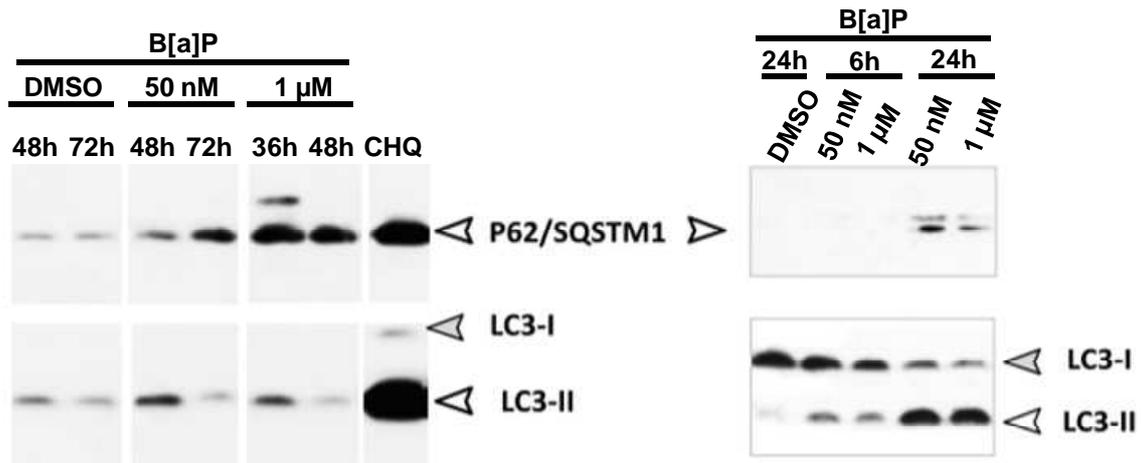
DRP1 serait également régulé par des processus d'ubiquitination, impliquant notamment la ligase MITOL/MARCH5 (Nagashima *et al.*, 2014). Nous avons pu constater une diminution de l'expression de DRP1 en présence de B[a]P (Résultats préliminaires non présentés). Or le RAh est aussi connu pour exercer une activité E3 ubiquitine ligase (Ohtake *et al.*, 2007). Dès lors, il serait envisageable que le RAh contribue à ces effets sur la dynamique mitochondriale par ce biais. Ainsi, les effets observés sur la dynamique mitochondriale en présence de B[a]P pourrait éventuellement être liés à une augmentation de la dégradation de DRP1 sous l'impulsion du RAh. Il sera par exemple intéressant de mesurer si l'inhibition du RAh, modifie le niveau d'ubiquitination de DRP1 en présence de B[a]P afin de déterminer si cette activité E3 ubiquitine ligase du RAh peut être impliquée.

En résumé, l'augmentation d'IF1 dans notre modèle intervient parallèlement à un effet très marqué du B[a]P sur la structure du réseau mitochondrial, proche des effets décrits par Campanella et collaborateurs (Campanella *et al.*, 2009). Ceci nous a amenés très récemment à nous poser la question d'un éventuel dysfonctionnement autophagique. De plus, nous avons déjà pu mettre en évidence des altérations des lysosomes en réponse à notre contaminant (Gorria *et al.*, 2008).

#### **IV. Quels effets du B[a]P sur la machinerie autophagique?**

Des études ont déjà montré que certains polluants de l'environnement sont capables d'altérer les processus autophagiques. C'est par exemple le cas du cadmium (Chargui *et al.*, 2011), de l'arsenic (Lau *et al.*, 2013) ou encore de la patuline, une toxine fongique (Guo *et al.*, 2013). Des analyses préliminaires, en collaboration avec Baharia Mograbi (IRCAN, Nice) suggèrent que le B[a]P serait également capable d'agir sur les processus autophagiques. Certaines de ces

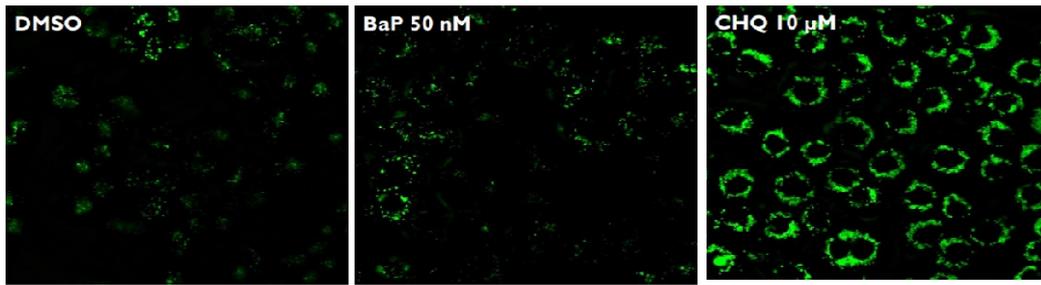
expériences préliminaires seront brièvement détaillées dans cette partie. Ainsi, l'exposition des cellules F258 au B[a]P induit la conversion de LC3-I en LC3-II impliquée dans la formation et la fermeture des autophagosomes; une accumulation de la protéine cargo p62 dont la fonction est de convoier les protéines ubiquitinées dans ces vacuoles autophagiques, est également détectée (Figure 42).



**Figure 42.** Effet du B[a]P (50 nM *versus* 1μM) sur l'expression des marqueurs autophagiques p62 et LC3 analysée par western blotting dans la lignée F258. La chloroquine (CHQ), agent neutralisant le pH lysosomal, a été utilisée comme contrôle de l'inhibition autophagique. Ces résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences.

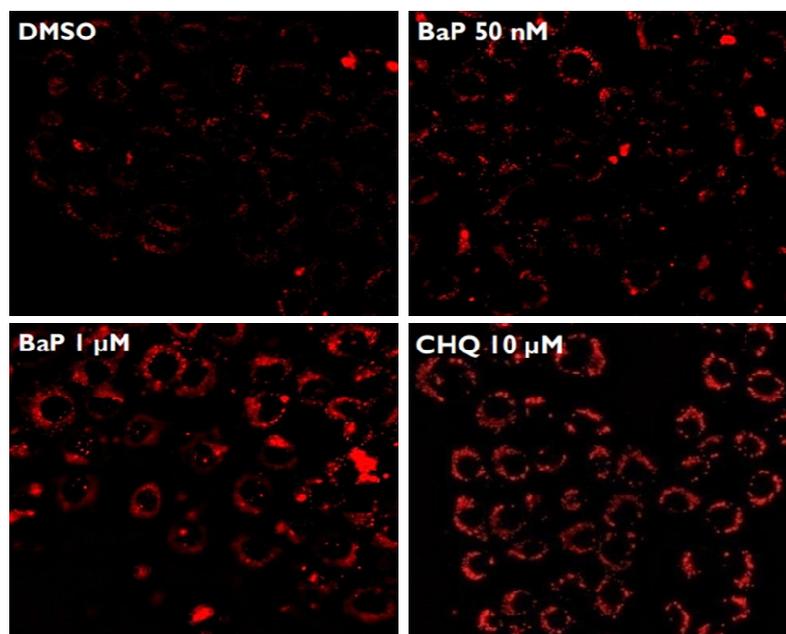
Nous avons par la suite poursuivi nos investigations en caractérisant le flux autophagique. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression de ces mêmes protéines en présence d'inhibiteurs des protéases lysosomales, le E64d et la pepstatine A. Ces expériences ont démontré que malgré des perturbations importantes, l'inhibition du flux autophagique n'était pas totale. En effet, en présence de ces inhibiteurs, des niveaux d'expression de p62 et de LC3-II plus importants ont été observés (résultats non présentés).

L'accumulation de vacuoles autophagiques a ensuite été mise en évidence en microscopie à fluorescence en réalisant un marquage avec un dérivé de monodansylcadaverine, marqueur de ces vacuoles (Biederbick *et al.*, 1995), au moyen du kit Cyto-ID autophagy detection. Une accumulation de vacuoles marquées est observée (Figure 43) sous l'effet du B[a]P, confirmant les perturbations autophagiques préalablement identifiées.



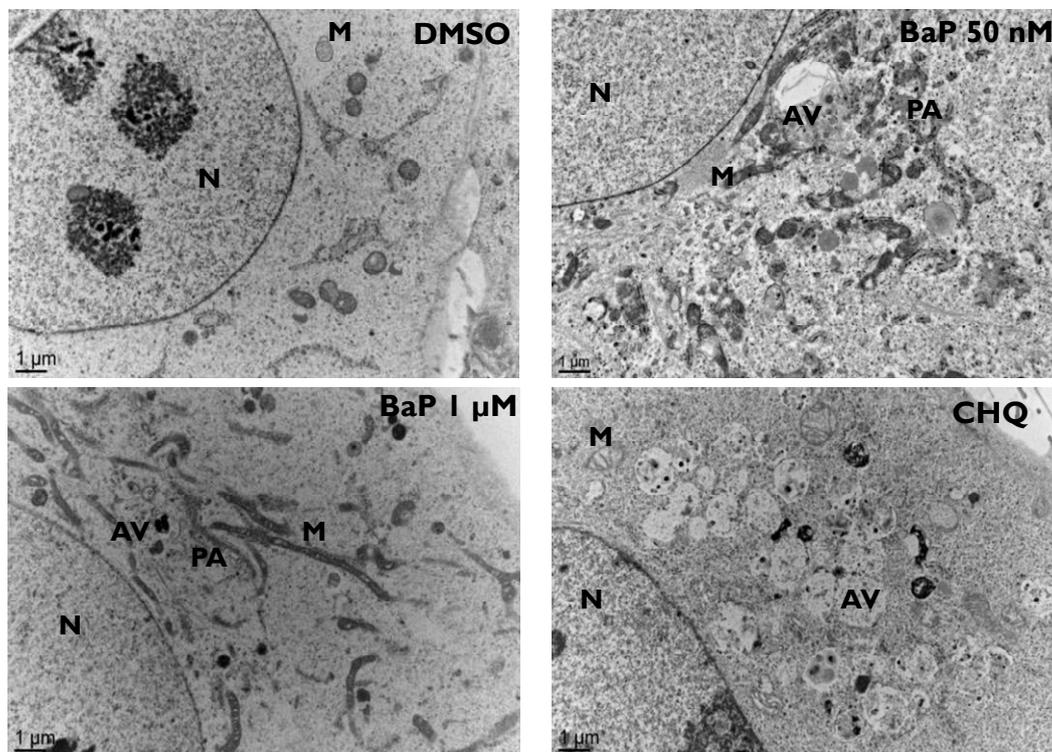
**Figure 43. Effet de 24h d'exposition au B[a]P sur l'accumulation des vacuoles autophagiques.** Ce paramètre a été évalué par microscopie à fluorescence après marquage sur cellules vivantes avec le kit de détection autophagique Cyto-ID (Enzo Lifesciences). La chloroquine (CHQ) a été utilisée comme contrôle positif de l'inhibition autophagique. Grossissement : 60 x.  $n \geq 3$ .

Nous avons ensuite évalué l'accumulation de corps d'inclusion, ou agrégosomes, contenant des protéines altérées (Figure 44). Ce marquage repose sur la détection des protéines ubiquitinées par microscopie à fluorescence en utilisant le kit Proteostat aggresome detection (Enzo Life sciences). Il a révélé un défaut de recyclage des protéines dégradées dès 24 heures d'exposition, avec un effet dose-dépendant du B[a]P.



**Figure 44. Effet de 24h d'exposition au B[a]P sur l'accumulation des agrégosomes.** Ce paramètre a été évalué par microscopie à fluorescence après marquage sur cellules vivantes avec le kit Proteostat aggresome detection (Enzo Lifesciences). La chloroquine (CHQ) a été utilisée comme contrôle positif de l'inhibition autophagique. Grossissement : 60 x.  $n \geq 3$ .

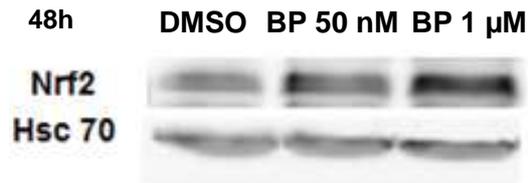
La présence de vacuoles autophagiques et d'aggrésomes a également été confirmée en analysant des coupes ultrafines par microscopie électronique à transmission (Figure 45).



**Figure 45. Analyse de l'impact du B[a]P sur l'ultrastructure cellulaire par MET (x8K) (AV: autophagic vesicles; M: mitochondria; N: Nucleus; PA : protein aggresome).**

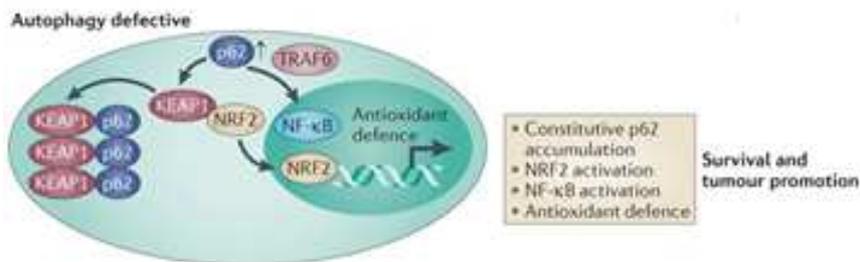
Ainsi, nos résultats démontrent que le B[a]P perturbe fortement les processus autophagiques dans la lignée F258, même si l'origine de ces effets reste à déterminer. Malgré tout, nos résultats préliminaires suggèrent que ces altérations de la machinerie autophagique seraient dépendantes du métabolisme de notre hydrocarbure. L'origine de ce ralentissement de la machinerie autophagique pourrait aussi être la forte expression d'IF1, un tel effet de ce peptide ayant déjà été établi dans la lignée HeLa (Campanella *et al.*, 2009). Cette hypothèse sera testée très prochainement.

Probablement en raison de la forte accumulation de p62 en présence de B[a]P, nous avons également pu mettre en évidence une activation soutenue du facteur de transcription Nrf2 en présence de B[a]P (Figure 46).



**Figure 46. Effet du B[a]P sur l'expression du facteur de transcription Nrf2.**

Cette induction de Nrf2 pourrait résulter de l'accumulation de la forte accumulation de p62 que nous observons sous l'effet du B[a]P. Dans ce contexte, les altérations des mécanismes autophagiques induites par le B[a]P pourraient favoriser la survie et la transformation des cellules en stimulant l'activité transcriptionnelle de Nrf2; en effet, ce facteur de transcription est connu pour activer différents systèmes anti-oxydants en situation de stress (Dinkova-Kostova et Abramov, 2015), comme illustré sur la figure 47 ci-dessous. Par ailleurs, l'activation de Nrf2 a été décrite pour rediriger le glucose et la glutamine dans les voies anaboliques, telles que la voie des pentoses phosphates et celle de la synthèse des nucléotides qui soutiennent la prolifération des cellules tumorales (Mitsuishi *et al.*, 2012). Dans ce contexte, il sera intéressant d'évaluer la contribution des perturbations de la machinerie autophagique aux voies de survie promues par le B[a]P, ainsi que dans la reprogrammation métabolique que nous avons identifiée.



**Figure 47. Régulation de Nrf2 par l'autophagie, KEAP1 et p62 (Adapté de White, 2012).**

p53 est un puissant régulateur des fonctions autophagiques (Tang *et al.*, 2015). Les mécanismes par lesquels l'autophagie favorise le cancer impliqueraient notamment la suppression de l'induction de la protéine suppresseur de tumeur p53 conduisant alors à des modifications de la fonction métabolique des mitochondries. On distingue ainsi les effets

initiateurs de l'autophagie vis-à-vis du cancer qui se caractérisent par l'accumulation de p62, des dysfonctionnements mitochondriaux, un stress oxydant accru, des dommages à l'ADN et une mort cellulaire augmentée, des effets promoteurs liés à une stimulation de l'autophagie et impliquant notamment une diminution de l'expression de p53 (White, 2015). Ainsi, dans le cadre d'une exposition au B[a]P *in vitro* dans notre modèle, les perturbations autophagiques seraient plutôt à rapprocher des processus d'initiation.

Cependant, des travaux récents ont montré que la régulation de l'autophagie par p53 était sous le contrôle de la glycolyse, et jouait un rôle crucial dans la survie des cellules (Duan *et al.*, 2015). Le statut de p53 influencerait alors le rôle de l'autophagie dans le développement des tumeurs. Ainsi, la perte de fonction de p53 diminuerait l'intensité du flux autophagique, cette inhibition de l'autophagie pouvant conduire en l'absence de p53 à une stimulation de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (Rosenfeldt *et al.*, 2013). Il sera ainsi intéressant de caractériser le statut de p53 dans le modèle cellulaire F258, mais également de voir si l'extinction de p53 a un quelconque rôle dans les altérations de la machinerie autophagique provoquées par le B[a]P.

Les effets du B[a]P sur l'autophagie pourraient également trouver leur origine dans les effets déjà identifiés du B[a]P sur l'HKII, qui est fortement impactée dans notre modèle (Huc *et al.*, 2007). Au-delà de son rôle dans la régulation de la glycolyse, l'HKII pourrait également réguler la machinerie autophagique. En effet, un domaine d'interaction entre l'HKII et mTORC1 a été identifié (Roberts *et al.*, 2014). Cette modalité de régulation permettrait d'ajuster l'intensité du flux autophagique au statut métabolique de la cellule, et jouerait ainsi un rôle dans le contrôle de la survie cellulaire (Roberts et Miyamoto, 2015). L'HK2 agit comme un véritable switch, intégrant la glycolyse et l'autophagie, et jouant un rôle crucial dans la survie des cardiomyocytes en situation de stress. Ainsi, l'hexokinase II pourrait stimuler l'autophagie lorsque l'apport en glucose est minoré, en se liant sur mTORC1 (Tan et Miyamoto, 2015). Cette interaction aurait pour effet d'empêcher cette dernière d'inhiber les kinases ULK. En l'absence d'inhibition par mTOR, ces kinases stimuleraient alors l'autophagie en phosphorylant Beclin-1 (Russel *et al.*, 2013). Cependant, dans notre modèle, l'expression de l'HKII diminue sous l'effet du B[a]P dans la lignée F258. De plus, dans ces circonstances, l'association de l'HKII à la mitochondrie est diminuée (Huc *et al.*, 2007; Dendelé *et al.*, 2012), confirmant que ce mécanisme jouerait davantage un rôle dans la toxicité du B[a]P plutôt que dans ces voies de survie. On peut dès lors s'interroger sur l'implication d'un autre partenaire dans ce mécanisme, peut-être une autre isoforme de

l'hexokinase par exemple. Il serait malgré tout très intéressant de réaliser des expériences d'immunoprécipitation pour vérifier si le B[a]P est capable de ralentir le flux autophagique en limitant par exemple l'interaction entre l'HKII et mTOR.

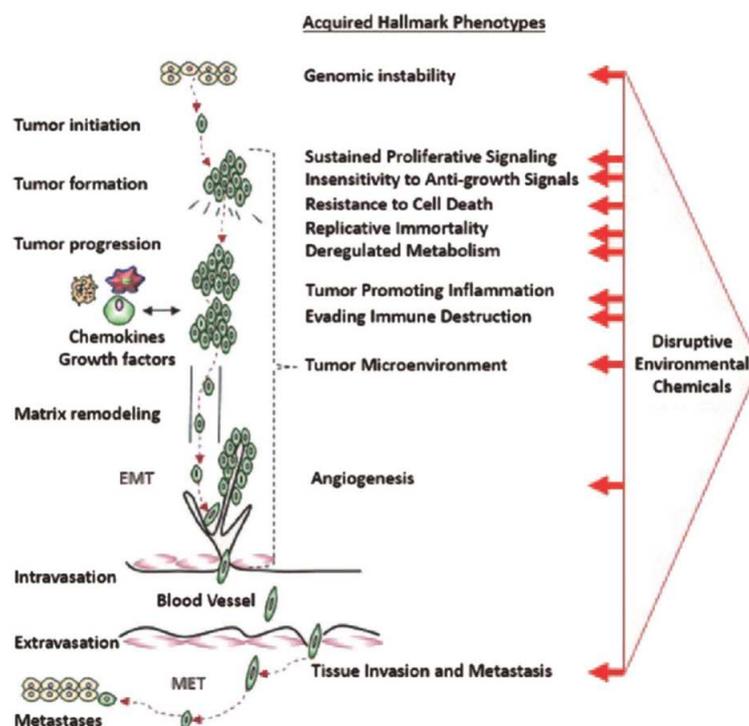
Ainsi, le défaut de recyclage des constituants cellulaires, en lien avec la reprogrammation métabolique, pourrait être une source supplémentaire de stress pour les cellules, et pourrait également contribuer aux processus de cancérogénèse. En effet, il a été montré que les souris KO pour beclin 1, développaient spontanément des carcinomes hépatocellulaires (Takamura *et al.*, 2011). Ces effets pourraient par ailleurs être reliés à d'importantes dérégulations métaboliques dans le tissu hépatique (Codogno et Lotersztajn, 2014). Ainsi, l'accumulation de p62 pourrait conduire à une activation persistante des voies NFκB et Nrf2, redirigeant le glucose et la glutamine vers des voies anaboliques (voie des pentoses phosphates, synthèse des nucléotides purine), ce qui favoriserait ainsi le développement et la prolifération des cellules tumorales (Mitsuishi *et al.*, 2012 ; Codogno et Meijer, 2013). Par ailleurs, au même titre que les mécanismes caractérisés au cours de cette thèse, les perturbations de la machinerie autophagique que nous avons pu mettre en évidence seraient également susceptibles de favoriser la survie et la transformation des cellules, même si ces données restent préliminaires, et nécessiteront confirmation. Il sera notamment primordial de caractériser le rôle de p62 dans notre modèle ainsi que l'origine de ces dysfonctionnements autophagiques.

Ainsi, les effets des hydrocarbures sur l'homéostasie cellulaire pourraient toucher tous les compartiments cellulaires et avoir un spectre d'action très large. La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes pourrait nous permettre de mieux interpréter le potentiel cancérogène des composés, et éventuellement faire émerger de nouvelles cibles pour la prise en charge thérapeutique des cancers induits par ces composés.

## **V. D'autres facteurs environnementaux sont par ailleurs impliqués dans l'acquisition d'un phénotype Warbug**

Pour finir, il est important de souligner ici que parmi la multitude de composés auxquels nous sommes couramment exposés via notre environnement, d'autres composés semblent faciliter l'acquisition d'un phénotype cancéreux. En particulier, même si ce champ disciplinaire est relativement récent, il semble d'ores et déjà que d'autres contaminants soient capables

d'impacter le métabolisme énergétique. C'est par exemple le cas de l'arsenic qui modulerait le métabolisme énergétique. En effet, l'arsenic semble promouvoir la glycolyse dans la lignée BEAS-2B (Zhao *et al.*, 2013). Les contaminations aux métaux lourds pourraient également présenter des effets similaires puisque le niveau de biodisponibilité du cuivre modulerait également le métabolisme énergétique. En effet, la chélation d'une quantité importante de cuivre inhiberait la phosphorylation oxydative au profit de la glycolyse, stimulant la prolifération cellulaire. Les auteurs ont également pu constater *in vivo* chez la souris que le cuivre était un facteur limitant pour la croissance tumorale, et qu'un apport exogène *via* les eaux de boissons par exemple accélérerait significativement le développement des tumeurs (Ishida *et al.*, 2013). Enfin, le PCP (Pentachlorophenol) agirait comme un inhibiteur de la phosphorylation oxydative conduisant à une glycolyse accrue dans des embryons de zebrafish (Xu *et al.*, 2014). Il ressort donc de ces différentes données que de nombreux facteurs environnementaux joueraient un rôle dans l'acquisition des différents marqueurs du cancer (Engström *et al.*, 2015), comme représenté sur le schéma ci-dessous (Figure 48). Cependant, peu de données existent actuellement concernant les effets des contaminants cancérigènes vis-à-vis d'une reprogrammation métabolique. Il sera donc intéressant de poursuivre nos études en testant l'impact de ces autres contaminants.



**Figure 48. Les polluants de l'environnement contribuent activement à l'établissement du phénotype cancéreux (Goodson, 2015)**

Parmi les marqueurs clés du phénotype cancéreux, comprendre et hiérarchiser les liens étroits entre la reprogrammation métabolique s'opérant dans le cancer et l'exposition aux polluants de l'environnement sera primordial dans le futur, afin de déterminer précisément la contribution respective de chacun de ces acteurs dans les processus de cancérogénèse environnementale, comme soulignée récemment par le consortium Halifax (Brooks Robey *et al.*, 2015). Par ailleurs, même si chaque molécule prise isolément montre des effets significatifs sur le métabolisme, un autre défi majeur réside dans la compréhension des effets biologiques des mélanges de polluants auxquels nous sommes couramment exposés par l'intermédiaire de notre environnement, généralement à faible dose et sur le long terme, et dont les effets semblent très complexes à modéliser et à pronostiquer (Goodson *et al.*, 2015).

## **Conclusion**

L'identification par nos travaux de nouvelles voies de survie promues par les HAP apporte de nouveaux éclairages utiles à la compréhension du mode d'action des polluants environnementaux en lien avec leur capacité à promouvoir la transformation des cellules néoplasiques. Ces éléments démontrent que l'action mitochondriale des HAP au niveau hépatique pourrait contribuer au développement de cancers, et ce, en favorisant un métabolisme glycolytique aérobie. Nous avons en particulier identifié qu'IF1, l'inhibiteur physiologique de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase, constituait une cible privilégiée pour ces composés. Celui-ci pourrait de ce fait être un marqueur précoce pertinent pour évaluer la contribution des HAP, en particulier du B[a]P, dans la cancérogénèse induite par ces composés, même si d'autres facteurs sont également susceptibles de participer à la forte expression d'IF1 dans les cellules cancéreuses.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## Données agences internationales

CITEPA, 2013, **Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la pollution Atmosphérique**

EFSA, 2008, **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food**

IARC, 2010, **Monographs on the valuation of carcinogenic risks to humans, volume 92, Benzo[a]pyrene**

IARC, 2014, **World cancer report**

INERIS 2005, 2006, **Benzo[a]pyrene – fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques**

NTP 2012, **NTP Research Concept: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**

OCDE, 2004, **Health data**

OMS, 2015, **Rapport mondial sur le cancer**

PNSE, 2004; **Rapport de la commission d'orientation du plan national santé environnement**

US-EPA, 1998, **Draft Update of Human Health Ambient Water Quality Criteria – Locating and estimating air emissions from polycyclic organic matter**

WHO, 2003, **Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)**

## Publications internationales

Abu-Soud HM, Stuehr DJ. **Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 15;90(22):10769-72.

Acin-Perez R, Gatti DL, Bai Y, Manfredi G. **Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation.** *Cell Metab.* 2011 Jun 8;13(6):712-9.

Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. **Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation.** *Cell Metab.* 2009 Mar;9(3):265-76.

Aktan F. **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.** *Life Sci.* 2004 Jun 25;75(6):639-53.

Alavian KN, Li H, Collis L, Bonanni L, Zeng L, Sacchetti S, Lazrove E, Nabili P, Flaherty B, Graham M, Chen Y, Messerli SM, Mariggio MA, Rahner C, McNay E, Shore GC, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA. **Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase.** *Nat Cell Biol.* 2011 Sep 18;13(10):1224-33.

Alfarouk KO, Verduzco D, Rauch C, Muddathir AK, Adil HH, Elhassan GO, Ibrahim ME, David Polo Orozco J, Cardone RA, Reshkin SJ, Harguindey S. **Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question.** *Oncoscience.* 2014 Dec 18;1(12):777-802.

Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S. **Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26):

Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. **Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway.** *Nat Cell Biol.* 2004 Jan;6(1):45-51.

Alvarez BV, Villa-Abrille MC. **Mitochondrial NHE1: a newly identified target to prevent heart disease.** *Front Physiol.* 2013 Jun 28;4:152.

Ambolet-Camoit A1, Bui LC, Pierre S, Chevallier A, Marchand A, Coumoul X, Garlatti M, Andreau K, Barouki R, Aggerbeck M. **2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2.** *Toxicol Sci.* 2010 Jun;115(2):501-12.

Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. **Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8823-8.

Andersen AP, Moreira JM, Pedersen SF. **Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Feb 3;369(1638):20130098.

Anderson KE, Kadlubar FF, Kulldorff M, Harnack L, Gross M, Lang NP, Barber C, Rothman N, Sinha R. **Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Sep;14(9):2261-5.

Annunziata I, d'Azzo A. **Interorganellar membrane microdomains: dynamic platforms in the control of calcium signaling and apoptosis.** *Cells.* 2013 Aug 2;2(3):574-90.

Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. **Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation.** *Antioxid Redox Signal.* 2012 May 15;16(10):1150-80.

Antico Arciuch VG, Russo MA, Kang KS, Di Cristofano A. **Inhibition of AMPK and Krebs cycle gene expression drives metabolic remodeling of Pten-deficient preneoplastic thyroid cells.** *Cancer Res.* 2013 Sep 1;73(17):5459-72.

Appleby RD, Porteous WK, Hughes G, James AM, Shannon D, Wei YH, Murphy MP. **Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA.** *Eur J Biochem.* 1999 May;262(1):108-16.

Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brèthes D, Velours J. **The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology.** *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):40392-9.

Attanasio F, Caldieri G, Giacchetti G, van Horssen R, Wieringa B, Buccione R. **Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis.** *Eur J Cell Biol.* 2011 Feb-Mar;90(2-3):115-27.

Ba Q, Li J, Huang C, Li J, Chu R, Wu Y, Wang H. **Topological, functional, and dynamic properties of the protein interaction networks rewired by benzo(a)pyrene.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Mar 1;283(2):83-91.

Ba Q, Li J, Huang C, Qiu H, Li J, Chu R, Zhang W, Xie D, Wu Y, Wang H. **Effects of benzo[a]pyrene exposure on human hepatocellular carcinoma cell angiogenesis, metastasis, and NF- $\kappa$ B signaling.** *Environ Health Perspect.* 2015 Mar;123(3):246-54.

Backer JM, Weinstein IB. **Interaction of benzo(a)pyrene and its dihydrodiol-epoxide derivative with nuclear and mitochondrial DNA in C3H10T 1/2 cell cultures.** *Cancer Res.* 1982 Jul;42(7):2764-9.

Bacsi SG, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. **Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence.** *Mol Pharmacol.* 1995 Mar;47(3):432-8.

Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. **Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action.** *Environ Mol Mutagen.* 2005 Mar-Apr;45(2-3):106-14.

Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. **Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function.** *Trends Cell Biol.* 2007 Sep;17(9):456-64.

Bansal S, Leu AN, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Chowdhury AR, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. **Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction.** *J Biol Chem.* 2014 Apr 4;289(14):9936-51.

Barbato S, Sgarbi G, Gorini G, Baracca A, Solaini G. **The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics.** *J Biol Chem.* 2015 Mar 6;290(10):6338-48.

Baritaki S, Huerta-Yepez S, Sahakyan A, Karagiannides I, Bakirtzi K, Jazirehi A, Bonavida B. **Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP.** *Cell Cycle.* 2010 Dec 15;9(24):4931-40.

Barouki R, Aggerbeck M, Aggerbeck L, Coumoul X. **The aryl hydrocarbon receptor system.** *Drug Metabol Drug Interact.* 2012 Jan 31;27(1):3-8.

Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. **The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein.** *FEBS Lett.* 2007 Jul 31;581(19):3608-15.

Barouki R, Coumoul X. **Cell migration and metastasis markers as targets of environmental pollutants and the Aryl hydrocarbon receptor.** *Cell Adh Migr.* 2010 Jan-Mar;4(1):72-6.

Barrett JC. **Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.** *Environ Health Perspect.* 1993 Apr;100:9-20.

Bason JV, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. **Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F<sub>1</sub>-ATPase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Aug 5;111(31):11305-10.

Beltrán B, Mathur A, Duchen MR, Erusalimsky JD, Moncada S. **The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14602-7.

Beltrán B, Quintero M, García-Zaragoza E, O'Connor E, Esplugues JV, Moncada S. **Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8892-7.

Benard G, Triantafyllidis T, Bellance N, Berger P, Lavie J, Espil-Taris C, Rocher C, Eimer-Bouillot S, Goizet C, Nouette-Gaulain K, Letellier T, Lacombe D, Rossignol R. **Adaptative capacity of mitochondrial biogenesis and of mitochondrial dynamics in response to pathogenic respiratory chain dysfunction.** *Antioxid Redox Signal.* 2013 Aug 1;19(4):350-65.

Benavides GA, Liang Q, Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. **Inhibition of autophagy and glycolysis by nitric oxide during hypoxia-reoxygenation impairs cellular bioenergetics and promotes cell death in primary neurons.** *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:1215-28.

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. **TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis.** *Cell.* 2006 Jul 14;126(1):107-20.

Bergeaud M, Mathieu L, Guillaume A, Moll UM, Mignotte B, Le Floch N, Vayssière JL, Rincheval V. **Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase.** *Cell Cycle.* 2013 Sep 1;12(17):2781-93.

Bernardi P, Di Lisa F, Fogolari F, Lippe G. **From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase.** *Circ Res.* 2015 May 22;116(11):1850-62.

Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. **The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology.** *Physiol Rev.* 2015 Oct;95(4):1111-55.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. **Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer.** *Mitochondrion*. 2010 Nov;10(6):584-8.

Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. **Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles.** *Eur J Cell Biol*. 1995 Jan;66(1):3-14.

Bock KW, Köhle C. **Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis.** *Biochem Pharmacol*. 2005 May 15;69(10):1403-8.

Bölck B, Ibrahim M, Steinritz D, Morguet C, Dühr S, Suhr F, Lu-Hesselmann J, Bloch W. **Detection of key enzymes, free radical reaction products and activated signaling molecules as biomarkers of cell damage induced by benzo[a]pyrene in human keratinocytes.** *Toxicol In Vitro*. 2014 Aug;28(5):875-84.

Bonavida B, Baritaki S. **Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- $\kappa$ B/Snail/YY1/RKIP circuitry.** *Nitric Oxide*. 2011 Jan 1;24(1):1-7.

Börsch M1, Duncan TM. **Spotlighting motors and controls of single FoF1-ATP synthase.** *Biochem Soc Trans*. 2013 Oct;41(5):1219-26.

Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. **Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air.** *Environ Health Perspect*. 2002 Jun;110 Suppl 3:451-88.

Boyer PD. **The ATP synthase--a splendid molecular machine.** *Annu Rev Biochem*. 1997;66:717-49.

Brookes PS, Salinas EP, Darley-USmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-USmar VM, Anderson PG. **Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release.** *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20474-9.

Brown GC, Cooper CE. **Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase.** *FEBS Lett*. 1994 Dec 19;356(2-3):295-8.

Brunner K, Tortschanoff A, Hemmens B, Andrew PJ, Mayer B, Kungl AJ. **Sensitivity of flavin fluorescence dynamics in neuronal nitric oxide synthase to cofactor-induced conformational changes and dimerization.** *Biochemistry*. 1998 Dec 15;37(50):17545-53.

Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. **Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8483-8.

Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. **Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology.** *Cancer Lett*. 2011 May 1;304(1):1-7.

Bui LC, Tomkiewicz C, Chevallier A, Pierre S, Bats AS, Mota S, Raingeaud J, Pierre J, Diry M, Transy C, Garlatti M, Barouki R, Coumoul X. **Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity.** *Oncogene*. 2009 Oct 15;28(41):3642-51.

Burdick AD, Ivnitiski-Steele ID, Lauer FT, Burchiel SW. **PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells.** *Carcinogenesis*. 2006 Nov;27(11):2331-40.

Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. **The yin and yang of nitric oxide in cancer progression.** *Carcinogenesis*. 2013 Mar;34(3):503-12.

Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. **An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface.** *J Biol Chem*. 2005 Jan 21;280(3):1740-5.

Cabezón E, Arechaga I, Jonathan P, Butler G, Walker JE. **Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1.** *J Biol Chem*. 2000 Sep 15;275(37):28353-5.

Cabezón E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. **Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH.** *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25460-4.

Cabezón E, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. **The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1.** *Nat Struct Biol*. 2003 Sep;10(9):744-50.

Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. **Cancer cell metabolism.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:299-311.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. **Regulation of cancer cell metabolism.** *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85-95.

Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchon MR. **Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1.** *Cell Metab*. 2008 Jul;8(1):13-25.

Campanella M, Parker N, Tan CH, Hall AM, Duchon MR. **IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase.** *Trends Biochem Sci*. 2009 Jul;34(7):343-50.

Campanella M, Seraphim A, Abeti R, Casswell E, Echave P, Duchon MR. **IF1, the endogenous regulator of the F(1)F(o)-ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy.** *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1787(5):393-401.

Caneba CA, Yang L, Baddour J, Curtis R, Win J, Hartig S, Marini J, Nagrath D. **Nitric oxide is a positive regulator of the Warburg effect in ovarian cancer cells.** *Cell Death Dis*. 2014 Jun 26;5:e1302.

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. **AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity.** *Nature*. 2009 Apr 23;458(7241):1056-60.

Capuano F, Guerrieri F, Papa S. **Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic cell growth.** *J Bioenerg Biomembr*. 1997 Aug;29(4):379-84.

Caricchia AM, Chiavarini S, Creminini C, Morabito R, Perini A, Pezza M. **Determination of PAH in atmospheric particulates in the area of the Italian base in Antarctica: report on monitoring activities during the last three scientific expeditions.** *Environ Pollut*. 1995;87(3):345-56.

Carling D. **The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control.** *Trends Biochem Sci*. 2004 Jan;29(1):18-24.

Castillo-Sanchez R, Villegas-Comonfort S, Galindo-Hernandez O, Gomez R, Salazar EP. **Benzo-[a]-pyrene induces FAK activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells.** *Cell Biol Toxicol*. 2013 Aug;29(4):303-19.

Cavalieri E, Saeed M, Zahid M, Cassada D, Snow D, Miljkovic M, Rogan E. **Mechanism of DNA depurination by carcinogens in relation to cancer initiation.** *IUBMB Life*. 2012 Feb;64(2):169-79.

Chalkiadaki A, Guarente L. **The multifaceted functions of sirtuins in cancer.** *Nat Rev Cancer*. 2015 Oct;15(10):608-24.

Chang CF, Diers AR, Hogg N. **Cancer cell metabolism and the modulating effects of nitric oxide.** *Free Radic Biol Med*. 2015 Feb;79:324-36.

Chanvorachote P, Pongrakhananon V, Chunchacha P. **Prolonged nitric oxide exposure enhances anoikis resistance and migration through epithelial-mesenchymal transition and caveolin-1 upregulation.** *Biomed Res Int*. 2014;2014:941359.

Chargui A, Zekri S, Jacquillet G, Rubera I, Ilie M, Belaid A, Duranton C, Tauc M, Hofman P, Poujeol P, El May MV, Mograbi B. **Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure.** *Toxicol Sci*. 2011 May;121(1):31-42.

Chen CC, Kim KH, Lau LF. **The matricellular protein CCN1 suppresses hepatocarcinogenesis by inhibiting compensatory proliferation.** *Oncogene*. 2015 Jun 1.

Chen J, Yan Y, Li J, Ma Q, Stoner GD, Ye J, Huang C. **Differential requirement of signal pathways for benzo[a]pyrene (B[a]P)-induced nitric oxide synthase (iNOS) in rat esophageal epithelial cells.** *Carcinogenesis*. 2005 Jun;26(6):1035-43.

Chen JH, Chou FP, Lin HH, Wang CJ. **Gaseous nitrogen oxide repressed benzo[a]pyrene-induced human lung fibroblast cell apoptosis via inhibiting JNK1 signals.** *Arch Toxicol*. 2005 Dec;79(12):694-704.

- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, Tukey RH. **The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):19526-33.
- Cheng H, Wang L, Mollica M, Re AT, Wu S, Zuo L. **Nitric oxide in cancer metastasis.** *Cancer Lett.* 2014 Oct 10;353(1):1-7.
- Chiang Y, Chou CY, Hsu KF, Huang YF, Shen MR. **EGF upregulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness.** *J Cell Physiol.* 2008 Mar;214(3):810-9.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. **Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario.** *Cell Death Differ.* 2006 Aug;13(8):1396-402.
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. **S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury.** *Science.* 2009 Apr 3;324(5923):102-5.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. **Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator.** *J Biochem Mol Biol.* 2002 Jan 31;35(1):116-26.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. **Nitric oxide and cancer: a review.** *World J Surg Oncol.* 2013 May 30;11:118.
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. **Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 20;282(5):1075-9.
- Cidad P, Almeida A, Bolaños JP. **Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase.** *Biochem J.* 2004 Dec 15;384(Pt 3):629-36.
- Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. **Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases.** *FEBS Lett.* 1994 May 23;345(1):50-4.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. **Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7631-6.
- Clementi E, Nisoli E. **Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005 Oct;142(2):102-10.
- Cobbs CS, Whisenhunt TR, Wesemann DR, Harkins LE, Van Meir EG, Samanta M. **Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells.** *Cancer Res.* 2003 Dec 15;63(24):8670-3.

Codogno P, Lotersztajn S. **When autophagy chaperones liver metabolism.** *Cell Metab.* 2014 Sep 2;20(3):392-3.

Codogno P, Meijer AJ. **Autophagy in the liver.** *J Hepatol.* 2013 Aug;59(2):389-91.

Coelho E, Ferreira C, Almeida CMM. **Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters.** *J Braz Chem. Soc.* 2008 vol.19 no.6 São Paulo.

Colell A, Green DR, Ricci JE. **Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis.** *Cell Death Differ.* 2009 Dec;16(12):1573-81.

Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM, Green DR. **GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation.** *Cell.* 2007 Jun 1;129(5):983-97.

Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG. **High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection.** *Nat Genet.* 2001 Jun;28(2):147-50.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. **Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability.** *Carcinogenesis.* 2009 Jul;30(7):1073-81.

Conney AH. **Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture.** *Cancer Res.* 1982 Dec;42(12):4875-917.

Contessi S, Haraux F, Mavelli I, Lippe G. **Identification of a conserved calmodulin-binding motif in the sequence of F0F1 ATPsynthase inhibitor protein.** *J Bioenerg Biomembr.* 2005 Oct;37(5):317-26.

Cooke JP. **NO and angiogenesis.** *Atheroscler Suppl.* 2003 Dec;4(4):53-60.

Crabtree HG. **Observations on the carbohydrate metabolism of tumours.** *Biochem J.* 1929;23(3):536-45.

Dang CV. **MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Aug 1;3(8). pii: a014217.

Dang CV. **Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism.** *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70(3):859-62.

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. **BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis.** *Nature.* 2003 Aug 21;424(6951):952-6.

Davies KM, Strauss M, Daum B, Kief JH, Osiewacz HD, Rycovska A, Zickermann V, Kühlbrandt W. **Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 23;108(34):14121-6.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. **The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation.** *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):11-20.

Dendelé B, Tekpli X, Sergent O, Dimanche-Boitrel MT, Holme JA, Huc L, Lagadic-Gossmann D. **Identification of the couple GSK3 $\alpha$ /c-Myc as a new regulator of hexokinase II in benzo[a]pyrene-induced apoptosis.** *Toxicol In Vitro.* 2012 Feb;26(1):94-101.

Deng H, Yu F, Chen J, Zhao Y, Xiang J, Lin A. **Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 promotes glycolysis through activation of phosphofructokinase-1.** *J Biol Chem.* 2008 Jul 25;283(30):20754-60.

Denker SP, Barber DL. **Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1.** *J Cell Biol.* 2002 Dec 23;159(6):1087-96.

Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, Barber DL. **Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation.** *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1425-36.

Desai SP, Bhatia SN, Toner M, Irimia D. **Mitochondrial localization and the persistent migration of epithelial cancer cells.** *Biophys J.* 2013 May 7;104(9):2077-88.

Di Pancrazio F, Mavelli I, Isola M, Losano G, Pagliaro P, Harris DA, Lippe G. **In vitro and in vivo studies of F(0)F(1)ATP synthase regulation by inhibitor protein IF(1) in goat heart.** *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 4;1659(1):52-62.

Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. **The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression.** *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jun;1807(6):568-76.

Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M. **Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism.** *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1796(2):252-65.

Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. **The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function.** *Free Radic Biol Med.* 2015 May 11. pii: S0891-5849(15)00212-9.

Dipple A, Khan QA, Page JE, Pontén I, Szeliga J. **DNA reactions, mutagenic action and stealth properties of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens (review).** *Int J Oncol.* 1999 Jan;14(1):103-11.

Diry M, Tomkiewicz C, Koehle C, Coumoul X, Bock KW, Barouki R, Transy C. **Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism.** *Oncogene.* 2006 Sep 7;25(40):5570-4.

Domenis R, Comelli M, Bisetto E, Mavelli I. **Mitochondrial bioenergetic profile and responses to metabolic inhibition in human hepatocarcinoma cell lines with distinct differentiation characteristics.** *J Bioenerg Biomembr.* 2011 Oct;43(5):493-505.

Downward J. **How BAD phosphorylation is good for survival.** *Nat Cell Biol.* 1999 Jun;1(2):E33-5.

Du HJ, Tang N, Liu BC, You BR, Shen FH, Ye M, Gao A, Huang Cs. **Benzo[a]pyrene-induced cell cycle progression is through ERKs/cyclin D1 pathway and requires the activation of JNKs and p38 mapk in human diploid lung fibroblasts.** *Mol Cell Biochem.* 2006 Jul;287(1-2):79-89.

Duan L, Perez RE, Davaadelger B, Dedkova EN, Blatter LA, Maki CG. **p53-regulated autophagy is controlled by glycolysis and determines cell fate.** *Oncotarget.* 2015 Sep 15;6(27):23135-56.

Duchen MR. **Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology.** *Mol Aspects Med.* 2004 Aug;25(4):365-451.

Dunn BP. **Wide-range linear dose-response curve for DNA binding of orally administered benzo(a)pyrene in mice.** *Cancer Res.* 1983 Jun;43(6):2654-8.

Edwards NT. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment a review.** *J Environ Qual.* 1983; 12:427-441.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. **Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells.** *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3892-9.

Engström W, Darbre P, Eriksson S, Gulliver L, Hultman T, Karamouzis MV, Klaunig JE, Mehta R, Moorwood K, Sanderson T, Sone H, Vadgama P, Wagemaker G, Ward A, Singh N, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Colacci AM, Vaccari M, Mondello C, Scovassi AI, Raju J, Hamid RA, Memeo L, Forte S, Roy R, Woodrick J, Salem HK, Ryan EP, Brown DG, Bisson WH. **The potential for chemical mixtures from the environment to enable the cancer hallmark of sustained proliferative signalling.** *Carcinogenesis.* 2015 Jun;36 Suppl 1:S38-60.

Erusalimsky JD, Moncada S. **Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2524-31.

Faccenda D, Tan CH, Duchon MR, Campanella M. **Mitochondrial IF<sub>1</sub> preserves cristae structure to limit apoptotic cell death signaling.** *Cell Cycle.* 2013 Aug 15;12(16):2530-2.

Faccenda D, Tan CH, Seraphim A, Duchon MR, Campanella M. **IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling.** *Cell Death Differ.* 2013 May;20(5):686-97.

Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Leder P. **A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth.** *Cancer Cell*. 2002 Jul;2(1):29-42.

Farazi PA, DePinho RA. **The genetic and environmental basis of hepatocellular carcinoma.** *Discov Med*. 2006 Oct;6(35):182-6.

Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, Dupuy F, Chambers C, Fuerth BJ, Viollet B, Mamer OA, Avizonis D, DeBerardinis RJ, Siegel PM, Jones RG. **AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo.** *Cell Metab*. 2013 Jan 8;17(1):113-24.

Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC, Jones RG. **The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator.** *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt A):165-70.

Felley-Bosco E. **Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis.** *Cancer Metastasis Rev*. 1998 Mar;17(1):25-37.

Feng GS. **Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox.** *Cancer Cell*. 2012 Feb 14;21(2):150-4.

Ferecatu I, Borot MC, Bossard C, Leroux M, Boggetto N, Marano F, Baeza-Squiban A, Andreau K. **Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor.** *Part Fibre Toxicol*. 2010 Jul 21;7:18.

Finley LW, Haigis MC. **Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis.** *Trends Mol Med*. 2012 Sep;18(9):516-23.

Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, Gonzalez AS, Converso DP, Antico Arciuch VG, Serra MP, Poderoso JJ, Carreras MC. **Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death.** *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Sep;234(9):1020-8.

Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. **Risk-based consumption advice for farmed Atlantic and wild Pacific salmon contaminated with dioxins and dioxin-like compounds.** *Environ Health Perspect*. 2005 May;113(5):552-6.

Forgacs AL, Burgoon LD, Lynn SG, LaPres JJ, Zacharewski T. **Effects of TCDD on the expression of nuclear encoded mitochondrial genes.** *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Jul;246(1-2):58-65.

Forkink M, Manjeri GR, Liemburg-Apers DC, Nibbeling E, Blanchard M, Wojtala A, Smeitink JA, Wieckowski MR, Willems PH, Koopman WJ. **Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex I inhibition is sustained by low activity of complex II, III, IV and V.** *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1837(8):1247-56.

Formentini L, Sánchez-Aragó M, Sánchez-Cenizo L, Cuezva JM. **The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response.** *Mol Cell.* 2012 Mar 30;45(6):731-42.

Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR, Harris CC. **Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2442-7.

Förstermann U, Sessa WC. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d.

Foth H, Kahl R, Kahl GF. **Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat.** *Food Chem Toxicol.* 1988 Jan;26(1):45-51.

Freeman KW, Bowman BR, Zetter BR. **Regenerative protein thymosin beta-4 is a novel regulator of purinergic signaling.** *FASEB J.* 2011 Mar;25(3):907-15.

Freire MA, Guimarães JS, Leal WG, Pereira A. **Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord.** *Front Neurosci.* 2009 Sep 15;3(2):175-81.

Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. **Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability.** *J Biol Chem.* 2012 May 25;287(22):18781-7.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. **The role of nitric oxide in tumour progression.** *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):521-34.

Gal A, Wogan GN. **Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 24;93(26):15102-7.

Gall JM, Wong V, Pimental DR, Havasi A, Wang Z, Pastorino JG, Bonegio RG, Schwartz JH, Borkan SC. **Hexokinase regulates Bax-mediated mitochondrial membrane injury following ischemic stress.** *Kidney Int.* 2011 Jun;79(11):1207-16.

Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. **Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury.** *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jul;10(7):481-94.

Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. **Mitochondria: master regulators of danger signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec;13(12):780-8.

Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. **Mitochondrial control of cellular life, stress, and death.** *Circ Res.* 2012 Oct 12;111(9):1198-207.

Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Pinti M, Kroemer G. **Mitochondrial liaisons of p53.** *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 15;15(6):1691-714.

Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. **Metabolic control of autophagy.** *Cell.* 2014 Dec 4;159(6):1263-76.

Gameiro PA, Yang J, Metelo AM, Pérez-Carro R, Baker R, Wang Z, Arreola A, Rathmell WK, Olumi A, López-Larrubia P, Stephanopoulos G, Iliopoulos O. **In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation.** *Cell Metab.* 2013 Mar 5;17(3):372-85.

García JJ, Morales-Ríos E, Cortés-Hernandez P, Rodríguez-Zavala JS. **The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase.** *Biochemistry.* 2006 Oct 24;45(42):12695-703.

García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM. **PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP Synthase.** *Cell Rep.* 2015 Sep 16. pii: S2211-1247(15)00949-3.

Garciaarena CD, Caldiz CI, Correa MV, Schinella GR, Mosca SM, Chiappe de Cingolani GE, Cingolani HE, Ennis IL. **Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action.** *J Appl Physiol* (1985). 2008 Dec;105(6):1706-13.

Gasparre G, Porcelli AM, Lenaz G, Romeo G. **Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb 1;5(2).

Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. **Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study.** *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5216-23.

Gatenby RA, Gillies RJ. **A microenvironmental model of carcinogenesis.** *Nat Rev Cancer.* 2008 Jan;8(1):56-61.

Gelboin HV. **Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes.** *Physiol Rev.* 1980 Oct;60(4):1107-66.

Geng Y, Hansson GK, Holme E. **Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells.** *Circ Res.* 1992 Nov;71(5):1268-76.

Giannoni E, Taddei ML, Morandi A, Comito G, Calvani M, Bianchini F, Richichi B, Raugei G, Wong N, Tang D, Chiarugi P. **Targeting stromal-induced pyruvate kinase M2 nuclear translocation impairs oxphos and prostate cancer metastatic spread.** *Oncotarget.* 2015 Sep 15;6(27):24061-74.

Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. **Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 9;110(15):5887-92.

Giraud MF, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, Schaeffer J, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. **Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?** *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 10;1555(1-3):174-80.

Glancy B, Balaban RS. **Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics.** *Biochemistry*. 2012 Apr 10;51(14):2959-73.

Gledhill JR, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. **How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 2;104(40):15671-6.

Go RE, Hwang KA, Choi KC. **Cytochrome P450 1 family and cancers.** *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Mar;147:24-30.

Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. **During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.** *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):589-98.

Gomes LC, Scorrano L. **Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times.** *Autophagy*. 2011 Oct;7(10):1251-3.

Gonzalez AS, Elguero ME, Finocchietto P, Holod S, Romorini L, Miriuka SG, Peralta JG, Poderoso JJ, Carreras MC. **Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis.** *Free Radic Res*. 2014 Jul;48(7):769-83.

Gonzalez Herrera KN, Lee J, Haigis MC. **Intersections between mitochondrial sirtuin signaling and tumor cell metabolism.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015 May-Jun;50(3):242-55.

González-Pecchi V, Valdés S, Pons V, Honorato P, Martinez LO, Lamperti L, Aguayo C, Radojkovic C. **Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase.** *Microvasc Res*. 2015 Mar;98:9-15.

Goo CK, Lim HY, Ho QS, Too HP, Clement MV, Wong KP. **PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1.** *PLoS One*. 2012;7(9):e45806.

Goodson WH 3rd, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Manaf Ali A, Lopez de Cerain Salsamendi A, Lasfar A, Carnero A, Azqueta A, Amedei A, Charles AK, Collins AR, Ward A, Salzberg AC, Colacci A, Olsen AK, Berg A, Barclay BJ, Zhou BP, Blanco-Aparicio C, Baglolle CJ, Dong C, Mondello C, Hsu CW, Naus CC, Yedjou C, Curran CS, Laird DW, Koch DC, Carlin DJ, Felsher DW, Roy D, Brown DG, Ratovitski E, Ryan EP, Corsini E, Rojas E, Moon EY, Laconi E, Marongiu F, Al-Mulla F, Chiaradonna F, Darroudi F, Martin FL, Van Schooten FJ, Goldberg GS, Wagemaker G, Nangami GN, Calaf GM, Williams G, Wolf GT, Koppen G, Brunborg G, Lyerly HK, Krishnan H, Ab Hamid H, Yasaei H, Sone H, Kondoh H, Salem HK, Hsu HY, Park HH, Koturbash I, Miousse IR, Scovassi AI, Klaunig JE, Vondráček J, Raju J, Roman J, Wise JP Sr, Whitfield JR, Woodrick J, Christopher JA, Ochieng J, Martinez-Leal JF, Weisz J, Kravchenko J, Sun J, Prudhomme KR, Narayanan KB, Cohen-Solal KA, Moorwood K, Gonzalez L, Soucek L, Jian L, D'Abronzio LS, Lin LT, Li L, Gulliver L, McCawley LJ, Memeo L, Vermeulen L, Leyns L, Zhang L, Valverde M, Khatami M, Romano MF, Chapellier M, Williams MA, Wade M, Manjili MH, Leonart ME, Xia M, Gonzalez MJ, Karamouzis MV, Kirsch-Volders M, Vaccari M, Kuemmerle NB, Singh N, Cruickshanks N, Kleinstreuer N, van Larebeke N, Ahmed N, Ogunkua O, Krishnakumar PK,

Vadgama P, Marignani PA, Ghosh PM, Ostrosky-Wegman P, Thompson PA, Dent P, Heneberg P, Darbre P, Sing Leung P, Nangia-Makker P, Cheng QS, Robey RB, Al-Temaimi R, Roy R, Andrade-Vieira R, Sinha RK, Mehta R, Vento R, Di Fiore R, Ponce-Cusi R, Dornetshuber-Fleiss R, Nahta R, Castellino RC, Palorini R, Abd Hamid R, Langie SA, Eltom SE, Brooks SA, Ryeom S, Wise SS, Bay SN, Harris SA, Papagerakis S, Romano S, Pavanello S, Eriksson S, Forte S, Casey SC, Luanpitpong S, Lee TJ, Otsuki T, Chen T, Massfelder T, Sanderson T, Guarnieri T, Hultman T, Dormoy V, Odero-Marah V, Sabbisetti V, Maguer-Satta V, Rathmell WK, Engström W, Decker WK, Bisson WH, Rojanasakul Y, Luqmani Y, Chen Z, Hu Z. **Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead.** *Carcinogenesis*. 2015 Jun;36 Suppl 1:S254-96.

Gorria M, Tekpli X, Rissel M, Sergent O, Huc L, Landvik N, Fardel O, Dimanche-Boitrel MT, Holme JA, Lagadic-Gossmann D. **A new lactoferrin- and iron-dependent lysosomal death pathway is induced by benzo[a]pyrene in hepatic epithelial cells.** *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Apr 15;228(2):212-24.

Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, Patel T, Rodriguez AA, Cusimano J, Weiss HL, Zhao H, Landis MD, Dave B, Gross SS, Chang JC. **Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res*. 2015 Feb 22;17:25.

Green DR, Chipuk JE. **p53 and metabolism: Inside the TIGAR.** *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):30-2.

Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Cell biology. **Metabolic control of cell death.** *Science*. 2014 Sep 19;345(6203):1250256.

Grimm S. **Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis.** *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1827(5):565-72.

Guarente L. **The many faces of sirtuins: Sirtuins and the Warburg effect.** *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):24-5.

Guo J, Xu Y, Ji W, Song L, Dai C, Zhan L. **Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling.** *Toxicol Lett*. 2015 May 5;234(3):201-10.

Guo X, Dong Y, Yin S, Zhao C, Huo Y, Fan L, Hu H. **Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation.** *Cell Death Dis*. 2013 Oct 3;4:e822.

Guppy M, Greiner E, Brand K. **The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes.** *Eur J Biochem*. 1993 Feb 15;212(1):95-9.

Gupta SK, Vlahakis NE. **Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase.** *J Cell Sci.* 2009 Jun 15;122(Pt 12):2043-54.

Haigis MC, Sinclair DA. **Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance.** *Annu Rev Pathol.* 2010;5:253-95.

Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. **Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 28;111(43):15526-31.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. **Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites.** *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):389-93.

Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. **p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9666-70.

Harbauer AB, Zahedi RP, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. **The protein import machinery of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease.** *Cell Metab.* 2014 Mar 4;19(3):357-72.

Hardonnière K, Huc L, Podechard N, Fernier M, Tekpli X, Gallais I, Sergent O, Lagadic-Gossmann D. **Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential.** *Toxicol In Vitro.* 2015 Oct;29(7):1597-608.

Harris AL. **Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth.** *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47.

Hassinen IE, Vuorinen KH, Ylitalo K, Ala-Rämi A. **Role of cellular energetics in ischemia-reperfusion and ischemic preconditioning of myocardium.** *Mol Cell Biochem.* 1998 Jul;184(1-2):393-400.

Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. **Growth properties of colonic tumor cells are a function of the intrinsic mitochondrial membrane potential.** *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1591-6.

Heidler J, Al-Furoukh N, Kukat C, Salwig I, Ingelmann ME, Seibel P, Krüger M, Holtz J, Wittig I, Braun T, Szibor M. **Nitric oxide-associated protein 1 (NOA1) is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes.** *J Biol Chem.* 2011 Sep 16;286(37):32086-93.

Helleberg H, Xu H, Ehrenberg L, Hemminki K, Rannug U, Törnqvist M. **Studies of dose distribution, premutagenic events and mutation frequencies for benzo[a]pyrene aiming at low dose cancer risk estimation.** *Mutagenesis*. 2001 Jul;16(4):333-7.

Hervouet E, Cízková A, Demont J, Vojtísková A, Pecina P, Franssen-van Hal NL, Keijer J, Simonnet H, Ivánek R, Kmoch S, Godinot C, Houstek J. **HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer.** *Carcinogenesis*. 2008 Aug;29(8):1528-37.

Hillegass JM, Murphy KA, Villano CM, White LA. **The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease.** *Biol Chem*. 2006 Sep;387(9):1159-73.

Hipp NI, Christner L, Wirth T, Mueller-Klieser W, Walenta S, Schröck E, Debatin KM, Beltinger C. **MYCN and survivin cooperatively contribute to malignant transformation of fibroblasts.** *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):479-88.

Hockenbery DM. **Targeting mitochondria for cancer therapy.** *Environ Mol Mutagen*. 2010 Jun;51(5):476-89.

Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebø S, Solhaug A, Tekpli X, Landvik NE, Huc L, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. **Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells.** *Chem Biol Interact*. 2007 Apr 5;167(1):41-55.

Hönscher C, Ungermann C. **A close-up view of membrane contact sites between the endoplasmic reticulum and the endolysosomal system: from yeast to man.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014 May-Jun;49(3):262-8.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. **Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7455-60.

Huang LJ, Chuang IC, Dong HP, Yang RC. **Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver.** *Shock*. 2011 Jul;36(1):90-6.

Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. **D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 14;94(21):11184-9.

Huang Y, Zheng L, Yang H, Chen J, Wang Y, Li H, Xie S. **Calcium mobilization in HeLa cells induced by nitric oxide.** *Scanning*. 2014 Mar-Apr;36(2):258-62.

Huberman E, Sachs L, Yang SK, Gelboin V. **Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Feb;73(2):607-11.

Huc L, Gilot D, Gardyn C, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. **Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells: role of p53 and pHi changes.** *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:167-70.

Huc L, Lemarié A, Guéraud F, Héliers-Toussaint C. **Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells.** *Toxicol In Vitro.* 2012 Aug;26(5):709-17.

Huc L, Rissel M, Solhaug A, Tekpli X, Gorria M, Torriglia A, Holme JA, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. **Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells.** *J Cell Physiol.* 2006 Sep;208(3):527-37.

Huc L, Sparfel L, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, Fardel O, Lagadic-Gossmann D. **Identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons.** *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):344-6.

Huc L, Tekpli X, Holme JA, Rissel M, Solhaug A, Gardyn C, Le Moigne G, Gorria M, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. **c-Jun NH2-terminal kinase-related Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis.** *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1696-705.

Hung HS, Wu WJ, Cheng YW, Wu TC, Chang KL, Lee H. **Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro.** *Mutat Res.* 2007 Apr 2;628(2):107-16.

Hwang MS, Rohlena J, Dong LF, Neuzil J, Grimm S. **Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain.** *Mitochondrion.* 2014 Nov;19 Pt A:20-8.

Hyde BB, Twig G, Shirihai OS. **Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics.** *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Aug;21(6):575-81.

Icard P, Kafara P, Steyaert JM, Schwartz L, Lincet H. **The metabolic cooperation between cells in solid cancer tumors.** *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1846(1):216-25.

Ichikawa N, Ushida S, Kawabata M, Masazumi Y. **Nucleotide sequence of cDNA coding the mitochondrial precursor protein of the ATPase inhibitor from humans.** *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999 Dec;63(12):2225-7.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9265-9.

Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. **Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res.* 2002 Oct;8(10):3131-6.

Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, Auwerx J, Hanahan D. **Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 26;110(48):19507-12.

Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, Fujisawa H, Otsuka F, Esumi H. **Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines.** *Int J Cancer*. 2003 Jan 10;103(2):161-8.

Jakobs S. **High resolution imaging of live mitochondria.** *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1763(5-6):561-75.

Jang M, Kim SS, Lee J. **Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets.** *Exp Mol Med*. 2013 Oct 4;45:e45.

Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. **Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia.** *J Mol Cell Cardiol*. 1991 Dec;23(12):1383-95.

Jiang Y, Chen X, Yang G, Wang Q, Wang J, Xiong W, Yuan J. **BaP-induced DNA damage initiated p53-independent necroptosis via the mitochondrial pathway involving Bax and Bcl-2.** *Hum Exp Toxicol*. 2013 Dec;32(12):1245-57.

Jiang Y, Zhou X, Chen X, Yang G, Wang Q, Rao K, Xiong W, Yuan J. **Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells.** *Mutat Res*. 2011 Nov 27;726(1):75-83.

Jiménez BD, Quattrochi LC, Yockey CB, Guzelian PS. **Identification by differential display of the IF1 inhibitor peptide of ATP synthase/ATPase as a gene inducible in rat liver by pregnenolone 16alpha-carbonitrile.** *Life Sci*. 2000 Sep 1;67(15):1825-32.

Jimenez L, Laporte D, Duvezin-Caubet S, Courtout F, Sagot I. **Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation.** *J Cell Sci*. 2014 Feb 15;127(Pt 4):719-26.

Jin Z, Gao F, Flagg T, Deng X. **Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis.** *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23837-44.

Jose C, Bellance N, Rossignol R. **Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?** *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1807(6):552-61.

Jose C, Melser S, Benard G, Rossignol R. **Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis.** *Antioxid Redox Signal*. 2013 Mar 1;18(7):808-49.

Jost PJ, Kaufmann T. **Cancer caused by too much apoptosis--an intriguing contradiction?** *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1110-2.

Kadenbach B. **Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation.** *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1604(2):77-94.

Kagawa Y, Ohta S. **Regulation of mitochondrial ATP synthesis in mammalian cells by transcriptional control.** *Int J Biochem.* 1990;22(3):219-29.

Kalkhof S, Dautel F, Loguercio S, Baumann S, Trump S, Jungnickel H, Otto W, Rudzok S, Potratz S, Luch A, Lehmann I, Beyer A, von Bergen M. **Pathway and time-resolved benzo[a]pyrene toxicity on Hepa1c1c7 cells at toxic and subtoxic exposure.** *J Proteome Res.* 2015 Jan 2;14(1):164-82.

Kamga Pride C, Mo L, Quesnelle K, Dagda RK, Murillo D, Geary L, Corey C, Portella R, Zharikov S, St Croix C, Maniar S, Chu CT, Khoo NK, Shiva S. **Nitrite activates protein kinase A in normoxia to mediate mitochondrial fusion and tolerance to ischaemia/reperfusion.** *Cardiovasc Res.* 2014 Jan 1;101(1):57-68.

Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. **p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation.** *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):611-8.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. **HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression.** *Nat Rev Cancer.* 2011 Dec 15;12(1):9-22.

Ken-Dror G. **DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds.** *Harefuah.* 2005 Aug;144(8):583-7, 596.

Khoo NK, Mo L, Zharikov S, Kamga-Pride C, Quesnelle K, Golin-Bisello F, Li L, Wang Y, Shiva S. **Nitrite augments glucose uptake in adipocytes through the protein kinase A-dependent stimulation of mitochondrial fusion.** *Free Radic Biol Med.* 2014 May;70:45-53.

Kim HY, Kim HR, Kang MG, Trang NT, Baek HJ, Moon JD, Shin JH, Suh SP, Ryang DW, Kook H, Shin MG. **Profiling of biomarkers for the exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons: lamin-A/C isoform 3, poly[ADP-ribose] polymerase 1, and mitochondria copy number are identified as universal biomarkers.** *Biomed Res Int.* 2014;2014:605135.

Kim JM, Bae HR, Park BS, Lee JM, Ahn HB, Rho JH, Yoo KW, Park WC, Rho SH, Yoon HS, Yoo YH. **Early mitochondrial hyperpolarization and intracellular alkalinization in lactacystin-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 May;305(2):474-81.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. **HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.** *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):177-85.

Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han JA, Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR. **Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling.** *J Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):6740-7.

Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. **Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release.** *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):31437-41.

Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. **Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms.** *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):31138-48.

Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. **Mechanisms of nitrite bioactivation.** *Nitric Oxide.* 2014 Apr 30;38:58-68.

Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bächinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B. **Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin.** *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7336-42.

Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. **Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.** *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct 1;500(1-3):255-66.

Ko CB, Kim SJ, Park C, Kim BR, Shin CH, Choi S, Chung SY, Noh JH, Jeun JH, Kim NS, Park R. **Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction.** *Toxicology.* 2004 Jun 1;199(1):35-46.

Kochhar A, Kopelovich L, Sue E, Guttenplan JB, Herbert BS, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. **p53 modulates Hsp90 ATPase activity and regulates aryl hydrocarbon receptor signaling.** *Cancer Prev Res (Phila).* 2014 Jun;7(6):596-606.

Kohler JJ, Hosseini SH, Hoying-Brandt A, Green E, Johnson DM, Russ R, Tran D, Raper CM, Santoianni R, Lewis W. **Tenofovir renal toxicity targets mitochondria of renal proximal tubules.** *Lab Invest.* 2009 May;89(5):513-9.

Kolanczyk M, Pech M, Zemojtel T, Yamamoto H, Mikula I, Calvaruso MA, van den Brand M, Richter R, Fischer B, Ritz A, Kossler N, Thurisch B, Spoerle R, Smeitink J, Kornak U, Chan D, Vingron M, Martasek P, Lightowers RN, Nijtmans L, Schuelke M, Nierhaus KH, Mundlos S. **NOA1 is an essential GTPase required for mitochondrial protein synthesis.** *Mol Biol Cell.* 2011 Jan 1;22(1):1-11.

Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, Takenaka T, Shoji F, Yano T, Maehara Y. **Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway.** *Cancer Lett.* 2009 Jun 8;278(1):27-33.

Kondaveeti Y, Guttilla Reed IK, White BA. **Epithelial-mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines.** *Cancer Lett.* 2015 Aug 1;364(1):44-58.

Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Maric D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA. **Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation.** *Cancer Res.* 2008 Aug 15;68(16):6643-51.

Krasnov GS, Dmitriev AA, Lakunina VA, Kirpiy AA, Kudryavtseva AV. **Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy.** *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Oct;17(10):1221-33.

Kroemer G, Pouyssegur J. **Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel.** *Cancer Cell.* 2008 Jun;13(6):472-82.

Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. **p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jul;16(7):393-405.

Lackner LL. **Determining the shape and cellular distribution of mitochondria: the integration of multiple activities.** *Curr Opin Cell Biol.* 2013 Aug;25(4):471-6.

Lacza Z, Kozlov AV, Pankotai E, Csordás A, Wolf G, Redl H, Kollai M, Szabó C, Busija DW, Horn TF. **Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway.** *Free Radic Res.* 2006 Apr;40(4):369-78.

Lafleur AL, Taghizadeh K, Howard JB, Anacleto JF, Quilliam MA. **Characterization of flame-generated C10 to C 160 polycyclic aromatic hydrocarbons by atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry with liquid introduction via heated nebulizer interface.** *J Am Soc Mass Spectrom.* 1996 Mar;7(3):276-86.

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. **The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Dec;14(12):759-74.

Lau A, Zheng Y, Tao S, Wang H, Whitman SA, White E, Zhang DD. **Arsenic inhibits autophagic flux, activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner.** *Mol Cell Biol.* 2013 Jun;33(12):2436-46.

Le Vee M, Kolasa E, Jouan E, Collet N, Fardel O. **Differentiation of human placental BeWo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene.** *Chem Biol Interact.* 2014 Mar 5;210:1-11.

Lecureur V, Ferrec EL, N'diaye M, Vee ML, Gardyn C, Gilot D, Fardel O. **ERK-dependent induction of TNF $\alpha$  expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages.** *FEBS Lett.* 2005 Mar 28;579(9):1904-10.

Lee BK, Chung MY, Lee KW. **Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide inhibits gap junction intercellular communication via phosphorylation of tumor progression locus 2 in WB-F344 rat liver epithelial cells.** *Mol Carcinog.* 2015 May;54(5):351-8.

Lee BL, Sykes BD, Fliegel L. **Structural and functional insights into the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.** *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Aug;61:60-7.

Lee I, Bender E, Arnold S, Kadenbach B. **New control of mitochondrial membrane potential and ROS formation--a hypothesis.** *Biol Chem.* 2001 Dec;382(12):1629-36.

Lee YJ, Cho A, Cho BC, Yun M, Kim SK, Chang J, Moon JW, Park IK, Choi HJ, Kim JH. **High tumor metabolic activity as measured by fluorodeoxyglucose positron emission**

**tomography is associated with poor prognosis in limited and extensive stage small-cell lung cancer.** *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1;15(7):2426-32.

Lefebvre V, Du Q, Baird S, Ng AC, Nascimento M, Campanella M, McBride HM, Screaton RA. **Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy.** *Autophagy.* 2013 Nov 1;9(11):1770-9.

Lehninger AL, Kennedy EP. **The fatty acid oxidase complex of rat liver and intracellular structures.** *Fed Proc.* 1948 Mar;7(1 Pt):166.

Lehninger AL, Reynafarje B. **Cycles in the function of mitochondrial membrane transport systems.** *Curr Top Cell Regul.* 1981;18:329-41.

Lemarie A, Huc L, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Grimm S. **Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction.** *Cell Death Differ.* 2011 Feb;18(2):338-49.

Lewis DY, Soloviev D, Brindle KM. **Imaging tumor metabolism using positron emission tomography.** *Cancer J.* 2015 Mar-Apr;21(2):129-36.

Li C, Li Y, He L, Agarwal AR, Zeng N, Cadenas E, Stiles BL. **PI3K/AKT signaling regulates bioenergetics in immortalized hepatocytes.** *Free Radic Biol Med.* 2013 Jul;60:29-40.

Li J, Tang MS, Liu B, Shi X, Huang C. **A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal Cl41 cells.** *Oncogene.* 2004 May 13;23(22):3932-44.

Li ZD, Wang K, Yang XW, Zhuang ZG, Wang JJ, Tong XW. **Expression of aryl hydrocarbon receptor in relation to p53 status and clinicopathological parameters in breast cancer.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct 15;7(11):7931-7.

Lin CC, Cheng TL, Tsai WH, Tsai HJ, Hu KH, Chang HC, Yeh CW, Chen YC, Liao CC, Chang WT. **Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy.** *Sci Rep.* 2012;2:785.

Lin T, Yang MS. **Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG(2) cells via PARP-1 activation and NAD(+) depletion.** *Toxicology.* 2008 Mar 12;245(1-2):147-53.

Lin Y, Chang G, Wang J, Jin W, Wang L, Li H, Ma L, Li Q, Pang T. **NHE1 mediates MDA-MB-231 cells invasion through the regulation of MT1-MMP.** *Exp Cell Res.* 2011 Aug 15;317(14):2031-40.

Lin Y, Wang J, Jin W, Wang L, Li H, Ma L, Li Q, Pang T. **NHE1 mediates migration and invasion of HeLa cells via regulating the expression and localization of MT1-MMP.** *Cell Biochem Funct.* 2012 Jan;30(1):41-6.

Lindsey S, Papoutsakis ET. **The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis.** *Stem Cell Rev.* 2012 Dec;8(4):1223-35.

List BM, Klatt P, Werner ER, Schmidt K, Mayer B. **Overexpression of neuronal nitric oxide synthase in insect cells reveals requirement of haem for tetrahydrobiopterin binding.** *Biochem J.* 1996 Apr 1;315 ( Pt 1):57-63.

Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. **Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155.** *Biochem J.* 2000 Jul 15;349(Pt 2):547-57.

Loh JK, Lin CC, Yang MC, Chou CH, Chen WS, Hong MC, Cho CL, Hsu CM, Cheng JT, Chou AK, Chang CH, Tseng CN, Wang CH, Lieu AS, Howng SL, Hong YR. **GSKIP- and GSK3-mediated anchoring strengthens cAMP/PKA/Drp1 axis signaling in the regulation of mitochondrial elongation.** *Biochim Biophys Acta.* 2015 Aug;1853(8):1796-807.

Long Q, Yang K, Yang Q. **Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology.** *Am J Cardiovasc Dis.* 2015 Mar 20;5(1):19-32.

López-Ríos F, Sánchez-Aragó M, García-García E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodríguez F, López-Encuentra A, Ballestín C, Cuezva JM. **Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas.** *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9013-7.

Ludwig FT, Schwab A, Stock C. **The Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> -exchanger (NHE1) generates pH nanodomains at focal adhesions.** *J Cell Physiol.* 2013 Jun;228(6):1351-8.

Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. **Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation.** *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Jan;38(1):163-74.

Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N. **Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak.** *Mol Cell.* 2004 Dec 3;16(5):819-30.

Malthièry Y, Savagner F. **Energy metabolism of the cancer cell: example of mitochondria-rich endocrine tumors.** *Ann Endocrinol (Paris).* 2006 Jun;67(3):205-13.

Mannella CA. **The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels.** *Trends Biochem Sci.* 1992 Aug;17(8):315-20.

Marlowe JL, Puga A. **Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis.** *J Cell Biochem.* 2005 Dec 15;96(6):1174-84.

Martínez-Reyes I, Cuezva JM. **The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival.** *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul;1837(7):1099-112.

Massion P, Preiser JC, Balligand V. **Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ?** *Nutrition clinique et métabolisme.* 2002 16, 248–252.

Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. **p53 regulates mitochondrial respiration.** *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1650-3.

Mattila JT, Thomas AC. **Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns.** *Front Immunol*. 2014 Oct 9;5:478. doi: 10.3389/fimmu.2014.00478.

Maya-Mendoza A, Ostrakova J, Kosar M, Hall A, Duskova P, Mistrik M, Merchut-Maya JM, Hodny Z, Bartkova J, Christensen C, Bartek J. **Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress.** *Mol Oncol*. 2015 Mar;9(3):601-16.

Mayati A, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Fardel O. **Aryl hydrocarbon receptor-independent up-regulation of intracellular calcium concentration by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human endothelial HMEC-1 cells.** *Environ Toxicol*. 2012 Sep;27(9):556-62.

Mayati A, Levoine N, Paris H, N'Diaye M, Courtois A, Uriac P, Lagadic-Gossmann D, Fardel O, Le Ferrec E. **Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a  $\beta$ 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells.** *J Biol Chem*. 2012 Feb 3;287(6):4041-52.

Mayer D, Klimek F, Rempel A, Bannasch P. **Hexokinase expression in liver preneoplasia and neoplasia.** *Biochem Soc Trans*. 1997 Feb;25(1):122-7.

Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. **Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms.** *Rev Environ Contam Toxicol*. 1995;143:79-165.

Means CK, Lygren B, Langeberg LK, Jain A, Dixon RE, Vega AL, Gold MG, Petrosyan S, Taylor SS, Murphy AN, Ha T, Santana LF, Tasken K, Scott JD. **An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 29;108(48):E1227-35.

Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. **Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites.** *Carcinogenesis*. 1999 Oct;20(10):1885-91.

Mendjargal A, Odkhuu E, Koide N, Nagata H, Kurokawa T, Nonami T, Yokochi T. **Pifithrin- $\alpha$ , a pharmacological inhibitor of p53, downregulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production via impairment of the MyD88-independent pathway.** *Int Immunopharmacol*. 2013 Apr;15(4):671-8.

Meng D, Lv DD, Zhuang X, Sun H, Fan L, Shi XL, Fang J. **Benzo[a]pyrene induces expression of matrix metalloproteinases and cell migration and invasion of vascular smooth muscle cells.** *Toxicol Lett*. 2009 Jan 10;184(1):44-9.

Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. **Exposure to carcinogenic PAHs in the environment.** *Environmental Science and Technology*. 1992; 26: 1278-1284.

- Michurina SV, Arkhipov SA, Kolesnikov SI. **Hepatocyte apoptosis in rats exposed to benzo(a)pyrene.** *Bull Exp Biol Med.* 2014 Nov;158(1):150-2.
- Mikawa T, LLeonart ME, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H. **Dysregulated glycolysis as an oncogenic event.** *Cell Mol Life Sci.* 2015 May;72(10):1881-92.
- Mikula I, Durocher S, Martasek P, Mutus B, Slama-Schwok A. **Isoform-specific differences in the nitrite reductase activity of nitric oxide synthases under hypoxia.** *Biochem J.* 2009 Mar 15;418(3):673-82.
- Miller KP, Ramos KS. **Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons.** *Drug Metab Rev.* 2001 Feb;33(1):1-35.
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, García JJ. **Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 30;102(35):12356-8.
- Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. **Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming.** *Cancer Cell.* 2012 Jul 10;22(1):66-79.
- Moncada S, Erusalimsky JD. **Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):214-20.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. **The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells?** *Biofactors.* 2009 Mar-Apr;35(2):209-25.
- Morrish F, Hockenbery D. **MYC and mitochondrial biogenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 May 1;4(5). pii: a014225.
- Mraiche F, Wagg CS, Lopaschuk GD, Fliegel L. **Elevated levels of activated NHE1 protect the myocardium and improve metabolism following ischemia/reperfusion injury.** *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Jan;50(1):157-64.
- Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. **A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle.** *Mol Cell.* 2001 May;7(5):1085-94.
- Mukhin YV, Garnovskaya MN, Ullian ME, Raymond JR. **ERK is regulated by sodium-proton exchanger in rat aortic vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1845-52.
- Nagashima S, Tokuyama T, Yonashiro R, Inatome R, Yanagi S. **Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases.** *J Biochem.* 2014 May;155(5):273-9.

Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M. **IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice.** *Biosci Rep.* 2013 Sep 17;33(5).

Nakamura T, Cieplak P, Cho DH, Godzik A, Lipton SA. **S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration.** *Mitochondrion.* 2010 Aug;10(5):573-8.

Neal MS, Zhu J, Foster WG. **Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers.** *Reprod Toxicol.* 2008 Jan;25(1):100-6.

Nemazanyy I, Espeillac C, Pende M, Panasyuk G. **Role of PI3K, mTOR and Akt2 signalling in hepatic tumorigenesis via the control of PKM2 expression.** *Biochem Soc Trans.* 2013 Aug;41(4):917-22.

Nguyen TN, Wang HJ, Zalzal S, Nanci A, Nabi IR. **Purification and characterization of beta-actin-rich tumor cell pseudopodia: role of glycolysis.** *Exp Cell Res.* 2000 Jul 10;258(1):171-83.

Nicolaou K, Masclet P, Mouvier G. **Sources and chemical reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere-a critical review.** *Sci total Environ,* 1984; 32: 103-132.

Nowak G, Bakajsova D. **Protein kinase C- $\alpha$  interaction with F0F1-ATPase promotes F0F1-ATPase activity and reduces energy deficits in injured renal cells.** *J Biol Chem.* 2015 Mar 13;290(11):7054-66.

Obeid S, Blatter N, Kranaster R, Schnur A, Diederichs K, Welte W, Marx A. **Replication through an abasic DNA lesion: structural basis for adenine selectivity.** *EMBO J.* 2010 May 19;29(10):1738-47.

Obre E, Rossignol R. **Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Feb;59:167-81.

Oh J, Kwak JH, Kwon DY, Kim AY, Oh DS, Je NK, Lee J, Jung YS. **Transformation of Mouse Liver Cells by Methylcholanthrene Leads to Phenotypic Changes Associated with Epithelial-mesenchymal Transition.** *Toxicol Res.* 2014 Dec;30(4):261-6.

Ohshima H, Bartsch H. **Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis.** *Mutat Res.* 1994 Mar 1;305(2):253-64.

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. **Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.** *Nature.* 2007 Mar 29;446(7135):562-6.

Opalińska M, Meisinger C. **Metabolic control via the mitochondrial protein import machinery.** *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Apr;33:42-8.

Osbourne DO, Soo VW, Konieczny I, Wood TK. **Polyphosphate, cyclic AMP, guanosine tetraphosphate, and c-di-GMP reduce in vitro Lon activity.** *Bioengineered*. 2014 Jul-Aug;5(4):264-8.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. **Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc.** *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):21797-800.

Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. **Cytochrome c: functions beyond respiration.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jul;9(7):532-42.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

Pan X, Wang X, Lei W, Min L, Yang Y, Wang X, Song J. **Nitric oxide suppresses transforming growth factor-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes.** *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1577-87.

Panchanathan R, Liu H, Choubey D. **Activation of p53 in Human and Murine Cells by DNA-Damaging Agents Differentially Regulates Aryl Hydrocarbon Receptor Levels.** *Int J Toxicol*. 2015 May-Jun;34(3):242-9.

Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. **Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics.** *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr;1837(4):408-17.

Parihar MS, Nazarewicz RR, Kincaid E, Bringold U, Ghafourifar P. **Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb 1;366(1):23-8.

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago JP, Velours J. **The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology.** *EMBO J*. 2002 Feb 1;21(3):221-30.

Payen VL, Brisson L, Dewhirst MW, Sonveaux P. **Common responses of tumors and wounds to hypoxia.** *Cancer J*. 2015 Mar-Apr;21(2):75-87.

Peak M, al-Habori M, Agius L. **Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalinization in mediating the effects of insulin.** *Biochem J*. 1992 Mar 15;282 ( Pt 3):797-805.

Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. **Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention.** *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 10;1555(1-3):14-20.

Pedersen SF, Darborg BV, Rentsch ML, Rasmussen M. **Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1.** *Arch Biochem Biophys*. 2007 Jun 15;462(2):195-201.

Pelkonen O, Nebert DW. **Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis.** *Pharmacol Rev.* 1982 Jun;34(2):189-222.

Perl A, Gergely P Jr, Nagy G, Koncz A, Banki K. **Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity.** *Trends Immunol.* 2004 Jul;25(7):360-7.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. **Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide.** *Biotechniques.* 2011 Feb;50(2):98-115.

Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. **Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways.** *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):504-7.

Phillips DH. **DNA adducts as markers of exposure and risk.** *Mutat Res.* 2005 Sep 4;577(1-2):284-92.

Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. **The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system.** *Hum Mol Genet.* 2005 Jun 1;14(11):1405-15.

Poppe M, Reimertz C, Düssmann H, Krohn AJ, Luetjens CM, Böckelmann D, Nieminen AL, Kögel D, Prehn JH. **Dissipation of potassium and proton gradients inhibits mitochondrial hyperpolarization and cytochrome c release during neural apoptosis.** *J Neurosci.* 2001 Jul 1;21(13):4551-63.

PULLMAN ME, MONROY GC. **A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase.** *J Biol Chem.* 1963 Nov;238:3762-9.

Putney LK, Barber DL. **Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1.** *BMC Genomics.* 2004 Jul 16;5(1):46.

Putney LK, Barber DL. **Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition.** *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):44645-9.

Qiu W, Wang X, Leibowitz B, Yang W, Zhang L, Yu J. **PUMA-mediated apoptosis drives chemical hepatocarcinogenesis in mice.** *Hepatology.* 2011 Oct;54(4):1249-58.

Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. **Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 4;103(14):5379-84.

Rády P, Arany I, Boján F, Kertai P. **Effect of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals on the activities of four glycolytic enzymes in mouse lung.** *Chem Biol Interact.* 1980 Aug;31(2):209-13.

Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillén MD, Schneider K, Weyand EH. **Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Int J Toxicol.* 2004;23(5):301-33.

Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M. **Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes.** *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2185-97.

Reshkin SJ, Greco MR, Cardone RA. **Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Feb 3;369(1638):20130100.

Reyes-Hernández OD, Mejía-García A, Sánchez-Ocampo EM, Castro-Muñozledo F, Hernández-Muñoz R, Elizondo G. **Aromatic hydrocarbons upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and induce changes in actin cytoskeleton. Role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR).** *Toxicology.* 2009 Dec 21;266(1-3):30-7.

Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. **Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis.** *J Cell Biol.* 2003 Jan 6;160(1):65-75.

Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. **Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation.** *Biochem J.* 2001 Oct 1;359(Pt 1):139-45.

Roberts DJ, Miyamoto S. **Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy.** *Cell Death Differ.* 2015 Feb;22(2):364.

Roberts DJ, Tan-Sah VP, Ding EY, Smith JM, Miyamoto S. **Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition.** *Mol Cell.* 2014 Feb 20;53(4):521-33.

Roberts DJ, Tan-Sah VP, Smith JM, Miyamoto S. **Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes.** *J Biol Chem.* 2013 Aug 16;288(33):23798-806.

Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. **Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species.** *Toxicology.* 2010 Oct 9;276(2):85-94.

Robey RB, Hay N. **Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria.** *Cell Cycle.* 2005 May;4(5):654-8.

Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, Kubik L, Palorini R, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Colacci A, Mondello C, Raju J, Woodrick J, Scovassi AI, Singh N, Vaccari M, Roy R, Forte S, Memeo L, Salem HK, Amedei A, Hamid RA, Williams GP, Lowe L, Meyer J, Martin FL, Bisson WH, Chiaradonna F, Ryan EP. **Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis?** *Carcinogenesis.* 2015 Jun;36 Suppl 1:S203-31.

Rodin SN, Rodin AS. **Origins and selection of p53 mutations in lung carcinogenesis.** *Semin Cancer Biol.* 2005 Apr;15(2):103-12.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R. **Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells.** *J Cell Physiol.* 2009 Dec;221(3):552-9.

Romero IL, Mukherjee A, Kenny HA, Litchfield LM, Lengyel E. **Molecular pathways: trafficking of metabolic resources in the tumor microenvironment.** *Clin Cancer Res.* 2015 Feb 15;21(4):680-6.

Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, Au A, Rai TS, Zheng L, Ridgway R, Adams PD, Anderson KI, Gottlieb E, Sansom OJ, Ryan KM. **p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development.** *Nature.* 2013 Dec 12;504(7479):296-300.

Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. **Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells.** *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):985-93.

Rouslin W. **Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: role of the inhibitor subunit.** *J Bioenerg Biomembr.* 1991 Dec;23(6):873-88.

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. **ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase.** *Nat Cell Biol.* 2013 Jul;15(7):741-50.

Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH. **AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury.** *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(4):495-503.

Salazar I, Pavani M, Aranda W, Maya JD, Morello A, Ferreira J. **Alterations of rat liver mitochondrial oxidative phosphorylation and calcium uptake by benzo[a]pyrene.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Jul 1;198(1):1-10.

Samadi AK, Bilslund A, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Bishayee A, Azmi AS, Lokeshwar BL, Grue B, Panis C0, Boosani CS, Poudyal D, Stafforini DM, Bhakta D, Niccolai E, Guha G, Vasantha Rupasinghe HP, Fujii H, Honoki K, Mehta K, Aquilano K, Lowe L, Hofseth LJ, Ricciardiello L, Ciriolo MR, Singh N, Whelan RL, Chaturvedi R, Ashraf SS, Shantha Kumara HM, Newsheem S, Mohammed SI, Keith WN, Helferich WG, Yang X. **A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation.** *Semin Cancer Biol.* 2015 May 5. pii: S1044-579X(15)00021-8.

Sánchez-Aragó M, Formentini L, Cuezva JM. **Mitochondria-mediated energy adaption in cancer: the H(+)-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors.** *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 20;19(3):285-98.

Sánchez-Aragó M, Formentini L, Martínez-Reyes I, García-Bermudez J, Santacatterina F, Sánchez-Cenizo L, Willers IM, Aldea M, Nájera L, Juarrán A, López EC, Clofent J, Navarro

C, Espinosa E, Cuezva JM. **Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers.** *Oncogenesis*. 2013 Apr 22;2:e46.

Sánchez-Aragó M, García-Bermúdez J, Martínez-Reyes I, Santacatterina F, Cuezva JM. **Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells.** *EMBO Rep*. 2013 Jul;14(7):638-44.

Sánchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, García-Huerta P, Sánchez-Aragó M, Cuezva JM. **Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype.** *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25308-13.

Santo-Domingo J, Demareux N. **Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH.** *J Gen Physiol*. 2012 Jun;139(6):415-23.

Sarti P, Forte E, Mastronicola D, Giuffrè A, Arese M. **Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications.** *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr;1817(4):610-9.

Saw CL, Wu Q, Kong AN. **Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathways.** *Chin Med*. 2010 Oct 27;5:37.

Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, Wilson DM 3rd, Bohr VA. **Protecting the mitochondrial powerhouse.** *Trends Cell Biol*. 2015 Mar;25(3):158-70.

Schelling JR, Abu Jawdeh BG. **Regulation of cell survival by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1.** *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Sep;295(3):F625-32.

Scherbakov AM, Stefanova LB, Sorokin DV, Semina SE, Berstein LM, Krasil'nikov MA. **Snail/beta-catenin signaling protects breast cancer cells from hypoxia attack.** *Exp Cell Res*. 2013 Dec 10;319(20):3150-9.

Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. **Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Sep;11(9):655-67.

Schults MA, Sanen K, Godschalk RW, Theys J, van Schooten FJ, Chiu RK. **Hypoxia diminishes the detoxification of the environmental mutagen benzo[a]pyrene.** *Mutagenesis*. 2014 Nov;29(6):481-7.

Schumacker PT. **SIRT3 controls cancer metabolic reprogramming by regulating ROS and HIF.** *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):299-300.

Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. **The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression.** *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2627-33.

Schwerzmann K, Pedersen PL. **Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex.** *Arch Biochem Biophys.* 1986 Oct;250(1):1-18.

Scicchitano DA. **Transcription past DNA adducts derived from polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Mutat Res.* 2005 Sep 4;577(1-2):146-54.

Semenza GL. **Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate.** *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3835-7.

Sharma M, Astekar M, Soi S, Manjunatha BS, Shetty DC, Radhakrishnan R. **pH Gradient Reversal: An Emerging Hallmark of Cancers.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2015;10(3):244-58.

Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, Van Houten B, Mostoslavsky R, Bultman SJ, Baccarelli AA, Begley TJ, Sobol RW, Hirschey MD, Ideker T, Santos JH, Copeland WC, Tice RR, Balshaw DM, Tyson FL. **Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress.** *Environ Health Perspect.* 2014 Dec;122(12):1271-8.

Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, Wu MX. **Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1.** *J Biol Chem.* 2006 Jun 2;281(22):15304-11.

Shen L, Zhi L, Hu W, Wu MX. **IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation.** *Cell Death Differ.* 2009 Apr;16(4):603-12.

Shertzer HG, Genter MB, Shen D, Nebert DW, Chen Y, Dalton TP. **TCDD decreases ATP levels and increases reactive oxygen production through changes in mitochondrial F(0)F(1)-ATP synthase and ubiquinone.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Dec 15;217(3):363-74.

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. **Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1.** *Cancer Sci.* 2004 Jan;95(1):1-6.

Shimada T. **Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006 Aug;21(4):257-76.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. **Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors.** *Oncogene.* 1996 Jul 4;13(1):21-9.

Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A. **Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide.** *Nature.* 1974 Nov 22;252(5481):326-8.

Soga T. **Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming.** *Cancer Sci.* 2013 Mar;104(3):275-81.

Solhaug A, Refsnes M, Holme JA. **Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 cells.** *J Cell Biochem.* 2004 Dec 15;93(6):1143-54.

Solhaug A, Refsnes M, Låg M, Schwarze PE, Husøy T, Holme JA. **Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells.** *Carcinogenesis.* 2004 May;25(5):809-19.

Song MK, Kim YJ, Song M, Choi HS, Park YK, Ryu JC. **Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction.** *Cancer Sci.* 2011 Sep;102(9):1636-44.

Song MK, Park YK, Ryu JC. **Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Nov 15;273(1):130-9.

Song R, Song H, Liang Y, Yin D, Zhang H, Zheng T, Wang J, Lu Z, Song X, Pei T, Qin Y, Li Y, Xie C, Sun B, Shi H, Li S, Meng X, Yang G, Pan S, Zhu J, Qi S, Jiang H, Zhang Z, Liu L. **Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF- $\kappa$ B drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis.** *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1659-73.

Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, Doehmer J. **Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26;91(9):3559-63.

Stampfer MR, Bartholomew JC, Smith HS, Bartley JC. **Metabolism of benzo[a]pyrene by human mammary epithelial cells: toxicity and DNA adduct formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6251-5.

Stansbury KH, Flesher JW, Gupta RC. **Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from benzo[a]pyrene in vivo.** *Chem Res Toxicol.* 1994 Mar-Apr;7(2):254-9.

Stiles BL. **PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Nov 30;61(14):1276-82.

Stock C, Schwab A. **Protons make tumor cells move like clockwork.** *Pflugers Arch.* 2009 Sep;458(5):981-92.

Stolpmann K, Brinkmann J, Salzmann S, Genkinger D, Fritsche E, Hutzler C, Wajant H, Luch A, Henkler F. **Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis.** *Cell Death Dis.* 2012 Sep 6;3:e388.

Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W. **Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane.** *EMBO J.* 2008 Apr 9;27(7):1154-60.

Strickland PT, Groopman JD. **Biomarkers for assessing environmental exposure to carcinogens in the diet.** *Am J Clin Nutr.* 1995 Mar;61(3 Suppl):710S-720S.

Stuehr D, Pou S, Rosen GM. **Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.** *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14533-6.

Sun MH, Han XC, Jia MK, Jiang WD, Wang M, Zhang H, Han G, Jiang Y. **Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol.* 2005 Oct 14;11(38):5931-7.

Sun Y, Liu J, Qian F, Xu Q. **Nitric oxide inhibits T cell adhesion and migration by down-regulation of beta1-integrin expression in immunologically liver-injured mice.** *Int Immunopharmacol.* 2006 Apr;6(4):616-26.

Svobodová J, Kabátková M, Šmerdová L, Brenerová P, Dvořák Z, Machala M, Vondráček J. **The aryl hydrocarbon receptor-dependent disruption of contact inhibition in rat liver WB-F344 epithelial cells is linked with induction of survivin, but not with inhibition of apoptosis.** *Toxicology.* 2015 Jul 3;333:37-44.

Switzer CH, Glynn SA, Cheng RY, Ridnour LA, Green JE, Ambs S, Wink DA. **S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer.** *Mol Cancer Res.* 2012 Sep;10(9):1203-15.

Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. **Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments.** *Environ Health Perspect.* 1994 Mar;102(3):302-4.

Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. **Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors.** *Genes Dev.* 2011 Apr 15;25(8):795-800.

Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ. **BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival.** *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25865-9.

Tang J, Di J, Cao H, Bai J, Zheng J. **p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy.** *Cancer Lett.* 2015 Jul 28;363(2):101-7

Tappenden DM, Lynn SG, Crawford RB, Lee K, Vengellur A, Kaminski NE, Thomas RS, LaPres JJ. **The aryl hydrocarbon receptor interacts with ATP5 $\alpha$ 1, a subunit of the ATP synthase complex, and modulates mitochondrial function.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011 Aug 1;254(3):299-310.

Tekli X, Huc L, Sergent O, Dendelé B, Dimanche-Boitrel MT, Holme JA, Lagadic-Gossmann D. **NHE-1 relocation outside cholesterol-rich membrane microdomains is associated with its benzo[a]pyrene-related apoptotic function.** *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(5-6):657-66.

Tekli X, Rissel M, Huc L, Catheline D, Sergent O, Rioux V, Legrand P, Holme JA, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D. **Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Feb 15;243(1):68-76.

Tekli X, Rivedal E, Gorria M, Landvik NE, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Baffet G, Holme JA, Lagadic-Gossmann D. **The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Jan 15;242(2):231-40.

Telang S, Lane AN, Nelson KK, Arumugam S, Chesney J. **The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism.** *Mol Cancer.* 2007 Dec 1;6:77.

Tennant DA, Frezza C, MacKenzie ED, Nguyen QD, Zheng L, Selak MA, Roberts DL, Dive C, Watson DG, Aboagye EO, Gottlieb E. **Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death.** *Oncogene.* 2009 Nov 12;28(45):4009-21.

Teranishi M, Toyooka T, Ohura T, Masuda S, Ibuki Y. **Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity.** *Chem Biol Interact.* 2010 Apr 15;185(1):4-11.

Twig G, Hyde B, Shirihai OS. **Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view.** *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1777(9):1092-7.

Twig G, Shirihai OS. **The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy.** *Antioxid Redox Signal.* 2011 May 15;14(10):1939-51.

Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong SC, Yamashina K, Hiramatsu A, Kodama H, Takahashi S, Chayama K. **Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 21;13(3):414-20.

Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. **Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity.** *Biochim Biophys Acta.* 2006 Mar;1757(3):166-72.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029-33.

Villa-Abrille MC, Cingolani E, Cingolani HE, Alvarez BV. **Silencing of cardiac mitochondrial NHE1 prevents mitochondrial permeability transition pore opening.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Apr;300(4):H1237-51.

Villanueva C, Giulivi C. **Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease.** *Free Radic Biol Med.* 2010 Aug 1;49(3):307-16.

Virdee K, Parone PA, Tolkovsky AM. **Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival.** *Curr Biol.* 2000 Sep 21;10(18):1151-4.

Vousden KH, Ryan KM. **p53 and metabolism.** *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):691-700.

Vyssokikh MY, Brdiczka D. **The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis.** *Acta Biochim Pol.* 2003;50(2):389-404.

Wakabayashi S, Ikeda T, Noël J, Schmitt B, Orłowski J, Pouyssegur J, Shigekawa M. **Cytoplasmic domain of the ubiquitous Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 can confer Ca<sup>2+</sup> responsiveness to the apical isoform NHE3.** *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26460-5.

Walker JE. **The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown.** *Biochem Soc Trans.* 2013 Feb 1;41(1):1-16.

Wang K, Brems JJ, Gamelli RL, Holterman AX. **iNOS/NO signaling regulates apoptosis induced by glycochenodeoxycholate in hepatocytes.** *Cell Signal.* 2011 Oct;23(10):1677-85.

Wang Q, Chen W, Xu X, Li B, He W, Padilla MT, Jang JH, Nyunoya T, Amin S, Wang X, Lin Y. **RIP1 potentiates BPDE-induced transformation in human bronchial epithelial cells through catalase-mediated suppression of excessive reactive oxygen species.** *Carcinogenesis.* 2013 Sep;34(9):2119-28.

Wang W, Wu F, Fang F, Tao Y, Yang L. **Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo.** *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6804-12.

Warburg O, Wind F, Negelein E. **The metabolism of tumors in the body.** *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519-30.

Warburg O. **On the origin of cancer cells.** *Science.* 1956 Feb 24;123(3191):309-14.

Ward PS, Thompson CB. **Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate.** *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):297-308.

Weber A, Boger R, Vick B, Urbanik T, Haybaeck J, Zoller S, Teufel A, Krammer PH, Opferman JT, Galle PR, Schuchmann M, Heikenwalder M, Schulze-Bergkamen H. **Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice.** *Hepatology.* 2010 Apr;51(4):1226-36.

Weber J. **Structural biology: Toward the ATP synthase mechanism.** *Nat Chem Biol.* 2010 Nov;6(11):794-5.

Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. **Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8788-93.

Wester PW, Muller JJ, Slob W, Mohn GR, Dortant PM, Kroese ED. **Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats.** *Food Chem Toxicol.* 2012 Mar;50(3-4):927-35.

- Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ertel A, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Birbe RC, Howell A, Pavlides S, Gandara R, Pestell RG, Sotgia F, Philp NJ, Lisanti MP. **Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts.** *Cell Cycle*. 2011 Jun 1;10(11):1772-83.
- White E. **Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer.** *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr 26;12(6):401-10.
- Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. **The multifaceted roles of nitric oxide in cancer.** *Carcinogenesis*. 1998 May;19(5):711-21.
- Wu KL, Khan S, Lakhe-Reddy S, Jarad G, Mukherjee A, Obejero-Paz CA, Konieczkowski M, Sedor JR, Schelling JR. **The NHE1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival.** *J Biol Chem*. 2004 Jun 18;279(25):26280-6.
- Wu MX, Ustyugova IV, Han L, Akilov OE. **Immediate early response gene X-1, a potential prognostic biomarker in cancers.** *Expert Opin Ther Targets*. 2013 May;17(5):593-606.
- Wu YT, Wu SB, Wei YH. **Roles of sirtuins in the regulation of antioxidant defense and bioenergetic function of mitochondria under oxidative stress.** *Free Radic Res*. 2014 Sep;48(9):1070-84.
- Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X. **Mitochondria-mediated apoptosis in mammals.** *Protein Cell*. 2014 Oct;5(10):737-49.
- Xu T, Zhao J, Hu P, Dong Z, Li J, Zhang H, Yin D, Zhao Q. **Pentachlorophenol exposure causes Warburg-like effects in zebrafish embryos at gastrulation stage.** *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Jun 1;277(2):183-91.
- Yadav N, Chandra D. **Mitochondrial and postmitochondrial survival signaling in cancer.** *Mitochondrion*. 2014 May;16:18-25.
- Yamada E, Ishiguro N, Miyaishi O, Takeuchi A, Nakashima I, Iwata H, Isobe K. **Differential display analysis of murine collagen-induced arthritis: cloning of the cDNA-encoding murine ATPase inhibitor.** *Immunology*. 1997 Dec;92(4):571-6.
- Yang H, Brosel S, Acin-Perez R, Slavkovich V, Nishino I, Khan R, Goldberg IJ, Graziano J, Manfredi G, Schon EA. **Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in Sco2.** *Hum Mol Genet*. 2010 Jan 1;19(1):170-80.
- Yeung SJ, Pan J, Lee MH. **Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer.** *Cell Mol Life Sci*. 2008 Dec;65(24):3981-99.
- Yin T, Lu L, Xiong Z, Wei S, Cui D. **ATPase inhibitory factor 1 is a prognostic marker and contributes to proliferation and invasion of human gastric cancer cells.** *Biomed Pharmacother*. 2015 Mar;70:90-6.

Yoshino I, Kometani T, Shoji F, Osoegawa A, Ohba T, Kouso H, Takenaka T, Yohena T, Maehara Y. **Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells.** *Cancer*. 2007 Jul 15;110(2):369-74.

Young LH, Li J, Baron SJ, Russell RR. **AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart.** *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Apr;15(3):110-8.

Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A. **JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD.** *Mol Cell*. 2004 Feb 13;13(3):329-40.

Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. **Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies.** *Prog Retin Eye Res*. 2011 Mar;30(2):81-114.

Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR. **How Saccharomyces responds to nutrients.** *Annu Rev Genet*. 2008;42:27-81.

Zech B, Köhl R, von Knethen A, Brüne B. **Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases.** *Biochem J*. 2003 May 1;371(Pt 3):1055-64.

Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ, Hu W, Feng Z. **Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect.** *Nat Commun*. 2013;4:2935.

Zhao F, Severson P, Pacheco S, Futscher BW, Klimecki WT. **Arsenic exposure induces the Warburg effect in cultured human cells.** *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Aug 15;271(1):72-7.

Zwaans BM, Lombard DB. **Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming.** *Dis Model Mech*. 2014 Sep;7(9):1023-32.



# **ANNEXES**



## Liste des formations

2013-2014 : **Comité d'organisation axe SCAN** (signalisation et cancer) Biosit

Juin 2014 : Mobilité INSERM UMR-S 1124, Université Paris Descartes : **Oxydation des substrats par radioactivité/Initiation xCelligence** (mesure d'impédance) (2semaines)

16 au 19 Octobre 2013 : **Techniques d'investigation appliquées au diagnostic des pathologies mitochondriales** "atelier Meetochondrie" GDR3159, Institut Cochin, Paris

- ✓ Respiration cellulaire : analyse de la chaîne respiratoire par oxygraphie
- ✓ Dosage spectrométrique des activités des complexes de la chaîne respiratoire
- ✓ Quantification des délétions et déplétions de l'ADN mitochondrial
- ✓ Analyse histologique de la chaîne respiratoire

Juin 2013 : **Visite des entreprises Hemarina et Manros Therapeutics** (formation VAS)

Mai 2013 : **Introduction to Scientific Publishing by Elsevier** (formation VAS)

Décembre 2012 : Mobilité INRA ToxAlim, Toulouse : utilisation **Seahorse XF24** (2semaines)

## Liste des congrès/communications

### 2014

- ✓ 1er congrès international "Society of Cancer Metabolism" & 5ème congrès international "Society for Proton Dynamics in Cancer, Smolenice, Slovaquie: **sélectionné pour communication orale** "Benzo[a]pyrene promotes ATP inhibitor Factor 1-mediated metabolic reprogramming leading to survival and migration in F258 cells"
- ✓ 4<sup>ème</sup> Journée Recherche de la Faculté de Pharmacie de Rennes : **Poster/Présentation flash** "Benzo[a]pyrene promotes ATP inhibitor Factor 1-mediated metabolic reprogramming leading to survival"  
**Obtention Prix Jeune Chercheur de la Fondation Rennes 1**
- ✓ 2<sup>ème</sup> Journée des jeunes chercheurs de l'IRSET, Rennes : **sélectionné pour communication orale** "Benzo[a]pyrene is promoting survival by switching metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis in F258 cells"

## 2013

- ✓ 3<sup>ème</sup> Journée Recherche de la Faculté de Pharmacie de Rennes : **Poster** "Impact of benzo[a]pyrene on mitochondrial function: what role in the carcinogenic effects of this environmental contaminant?"
- ✓ Journées Francophones de Nutrition, Bordeaux : **sélectionné pour communication orale** "Impact of benzo[a]pyrene on mitochondrial function: what role in the carcinogenic effects of this environmental contaminant?"
- ✓ Cell Symposia "Mitochondria from signaling to disease", Lisbonne

## 2012

- ✓ 2<sup>ème</sup> Journée Recherche de la Faculté de Pharmacie de Rennes : **Poster** "Involvement of oxidative stress in hepatocytes cell death induced by benzo[a]pyrene co-exposure".
- ✓ Cell Death in Cancer, Saint-Malo : **Poster** "Involvement of oxidative stress in hepatocytes cell death induced by benzo[a]pyrene co-exposure".
- ✓ European Doctoral College on Environment and Health, Rennes : **Poster/Présentation** "Involvement of oxidative stress in hepatocytes cell death induced by benzo[a]pyrene co-exposure".
- ✓ Cancer Cell Metabolism: Beyond Warburg, Toulouse

## Liste des publications

**Hardonnière K**, Fernier M, Gallais I, Mograbi B, Saunier E, Podechard N, Le Ferrec E, Bénit P, Rustin P, Grova N, Appenzeller B, Burel A, Chevanne M, Sergent O, Huc L, Bortoli S, Lagadic-Gossmann D. Role for the ATPase inhibitory factor 1 in the environmental carcinogen-induced Warburg phenotype. (About to be submitted!).

**Hardonnière K**, Saunier E, Lemarié A, Fernier M, Gallais I, Héliès C, Mograbi B, Antonio S, Bénit P, Rustin P, Janin M, Hobarou F, Ottolenghi C, Benelli C, Sergent O, Huc L, Bortoli S, Lagadic-Gossmann D. AhR- and NHE1-related metabolic reprogramming determines the cell survival induced by the environmental carcinogen benzo[a]pyrene. (About to be submitted!).

**Hardonnière K**, Huc L, Podechard N, Fernier M, Tekpli X, Gallais I, Sergent O, Lagadic-Gossmann D. Benzo[a]pyrene-induced nitric oxide production acts as a survival signal targeting mitochondrial membrane potential. *Toxicol In Vitro*. 2015 Oct;29(7):1597-608.

Collin A, **Hardonnière K**, Chevanne M, Vuillemin J, Podechard N, Burel A, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D, Sergent O. Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and

ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes.

Free Radic Biol Med. 2014 Jul;72:11-22.

Dendelé B., Tekpli X., **Hardonnière K.**, Holme J.A., Debure L., Catheline D., Arlt V.M., Nagy E., Phillips D.H., Ovrebo S., Mollerup S., Poët M., Chevanne M., Rioux V., Dimanche-Boitrel M.T.,\_Sergent O., Lagadic-Gossmann D. Protective action of n-3 fatty acids on benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the plasma membrane remodeling-dependent NHE1 pathway. Chem Biol Interact 2014, 207:41-51.

**K. Hardonniere**, L. Huc, M.-T. Dimanche-Boitrel, O. Sergent, D. Lagadic-Gossmann. O47 Impact du benzo[a]pyrène sur la fonction mitochondriale: quel rôle dans les effets cancérigènes de ce contaminant alimentaire? Nutrition Clinique et Métabolisme/Cahiers de Nutrition et de Diététique-48 (Suppl.1) : S47 (Abstract Congrès JFN 2013).

## **ANNEXE 2**

VU :

VU :

**Le Directeur de Thèse  
Doctorale**

(Nom et Prénom)

**Le Responsable de l'École**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINÉAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**

(Nom et Prénom)

