

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de physiologie et biologie cellulaires - IPBC
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Laurie-Anne Payet

Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion. Relation avec la mucoviscidose

Directeur(s) de Thèse :
Thierry Ferreira, Clarisse Vandebrouck

Soutenue le 29 novembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	Thierry Bergès	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Mario Ollero	Professeur des Universités, Université Paris Est Créteil
Rapporteur	Pierre Morsomme	Professeur, Université catholique de Louvain, Belgique
Membre	Thierry Ferreira	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Clarisse Vandebrouck	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Pascal Trouvé	Ingénieur de recherche, Université de Brest

Pour citer cette thèse :

Laurie-Anne Payet. *Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion. Relation avec la mucoviscidose* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme national – Arrêté du 7 Août 2006)

Ecole doctorale Biosanté
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Laurie-Anne Payet

Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion. Relation avec la mucoviscidose

Directeurs de thèse : Dr Thierry Ferreira et Dr Clarisse Vandebrouck

Soutenue le 29 Novembre 2013
devant la Commission d'Examen

JURY

Pierre Morsomme	Professeur, Université catholique de Louvain, Belgique	Rapporteur
Mario Olléro	Professeur, Université Paris Est Créteil	Rapporteur
Pascal Trouvé	Ingénieur de Recherches, Université de Brest	Examineur
Thierry Bergès	Professeur, Université de Poitiers	Examineur
Clarisse Vandebrouck	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur
Thierry Ferreira	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur

Tout d'abord je tiens à remercier Mario Olléro, Pierre Morsomme, Pascal Trouvé et Thierry Bergès pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier Frédéric Becq, en tant que directeur du laboratoire mais aussi en tant que chef d'équipe, pour m'avoir permis de travailler au sein de l'équipe TIM du laboratoire STIM. Néanmoins, je n'oublierai jamais qu'il a, un jour, caché ma crêpe au nutella. Etant la dernière personne que j'aurais pu soupçonner pour cet acte criminel, mes camarades de bureau ont vu mes foudres s'abattre sur eux, alors que le vrai coupable riait de son méfait dans le bureau d'à côté...

Je tiens surtout à remercier mes co-directeurs de thèse Thierry Ferreira et Clarisse Vandebrouck, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Ils m'ont choisie, m'ont soutenue et m'ont portée durant ces trois dernières années. Ils ont été les parents de substitutions dont j'avais besoin pour grandir et apprendre le dur métier d'enseignant-chercheur. Ils m'ont offert le cadre dont tout doctorant rêve pendant sa thèse : m'encourageant lorsque j'étais sur la bonne voie, me rattrapant au vol lorsque je m'éloignais un peu trop de la trajectoire. Je n'aurais pas pu trouver de meilleurs chefs que vous deux, à la fois différents mais complémentaires. Merci à Thierry de m'avoir initiée au monde des lipides et merci à Clarisse de m'avoir initiée au monde de la muco. Merci à Thierry pour ces pauses clopes/réunion de travail, et merci à Clarisse pour ses « mais qu'est ce qui t'arrive encore ? ». Merci à Thierry pour ses chansons fredonnées en longueur de journée les lendemains de répétitions, et merci à Clarisse pour ses « sardines ». Merci à Thierry pour ses blagues quelque peu sarcastiques et merci à Clarisse pour son franc-parler. Merci pour ces soirées karaoké et ces danses que nous avons partagées tous les trois.

Je souhaiterais également remercier tous les membres de l'équipe TIM. Merci Caro pour tes conseils, ton inventivité (la Valérie Damidot du labo), ta bonne humeur, et ces chansons que tu commençais et que je finissais. Merci Sandra pour ton soutien, tes anecdotes hallucinantes, ta franchise, tes petites attentions culinaires et surtout... d'avoir élargi ma culture musicale avec l'intégrale de Francky Vincent. Merci Jenny pour tout : ton aide, ton efficacité, ton franc-parler, ton caractère bien trempé (qui m'a valu de belles engueulades), mais tu es si vraie et attentionnée qu'on ne peut pas t'en vouloir d'être aussi spontanée. Merci à Laura (Miss proute proute, et non pas princesse comme tu souhaiterais que je t'appelle ! Si c'est pas proute proute ça...) et Clément (je ne trouve

pas de qualificatif pour exprimer tout ce que tu es... J'hésite entre fourbe, farceur, voleur/casseur de poule en chocolat) de m'avoir supportée tant bien que mal pendant la rédaction de ma thèse. J'ai été très heureuse de partager mon bureau avec vous pendant ces deux dernières années, et les chansons pourries du vendredi me manqueront. Je vous souhaite bon courage pour votre troisième année... Merci à toi Romain pour ta simplicité, ton sens de l'humour, ta rigueur, ton professionnalisme. Ce fut un plaisir de travailler avec toi (même si j'ai un peu honte quand on compare l'état de nos paillasses...). Merci également à Jojo et Mathilde pour votre aide et vos conseils. Merci à Linette qui a initié le projet sur la mucoviscidose mais aussi pour sa bonne humeur, pour sa zen attitude et toutes ces discussions que nous avons partagées. Merci également à Mirka et Luen, grâce à qui j'ai pu améliorer (un peu) mon anglais.

Je souhaiterais remercier encore une fois Thierry Bergès, qui m'a accueillie de nombreuses fois dans son laboratoire pour mes manips sur les lipides et nos discussions toujours très enrichissantes. Je remercie également Matthieu Regnacq qui m'a donné l'opportunité d'animer les TP de génétique, que j'aurais adoré suivre pendant mon cursus universitaire.

Merci à Rania, à qui je n'avais pas le droit de parler tant que je n'avais pas signé mon contrat... pour nos fous rires et notre superbe duo sur cette magnifique chanson « Let it rain over me »... Merci à Babeth pour m'avoir fait découvrir la Bretagne, les bretons et la qualité de vie... et pour nos soirées jeux et ce magnifique cadeau qui ne me quitte pratiquement jamais.

Merci aux membres de l'équipe « cœur » avec qui j'ai partagé de bons moments : Jean-François le supporter du PSG qui compte parmi les quelques amateurs du pâté créole, Patrick qui m'a souvent éloignée de la salle BM parce que je riais (un peu) trop fort, Grégoire avec ses rêves douteux, Christophe qui s'oblige à « tirer la tronche » à chaque fois qu'il me voit, Aurélie qui m'a tenu compagnie pendant le mois d'Août lorsque je rédigeais ma thèse, pour nos discussions autour de la voie de sécrétion, pour ses délicieux gâteaux et son expérience de la maternité (j'en aurai beaucoup appris avant que ça ne m'arrive...), sans oublier Jocelyn, Aurélien, Christian, Stéphane et nos collègues de Tours.

Un grand merci à Thomas qui m'a beaucoup aidée tant sur le plan technique que sur le plan personnel et avec qui j'ai partagé énormément de fous rires. Merci à Jonathan pour son aide précieuse pour la qPCR et son humour sarcastique. Merci à Nadine, qui n'est pas si méchante qu'on peut le croire. Merci à Bruno et Nicolas dont le rire est encore pire que le mien... Merci à Carole et Christelle que j'ai souvent sollicitées, parfois au tout dernier moment, mais qui n'ont (presque) jamais râlé.

Merci à tous les doctorants que j'ai connus dans ce laboratoire, avec qui j'ai partagé de super moments et qui sont partis ou ont changé de voie : Do, Titou, Coco, Charlotte. Merci à tous les potes de Grenoble qui ne m'ont pas laissée tomber après mon exil à Poitiers. Merci également à mes tites madames de la Réunion, Adèle, Fany et Mamy, avec qui j'ai partagé les meilleures soirées karaoké de cette île magnifique, des joies, des peines, des sourires « colgate », des combats de sumos et tellement de smirnoff...

Je souhaiterais adresser un énorme merci à ma maman, mon modèle, mon moteur, sans qui je ne serai pas celle que je suis. Je souhaite également remercier mon petit papa, qui m'a fait confiance pendant mes premières années de fac et qui m'a permis de les vivre pleinement. Et merci à mes frères Laurent, Christophe et Benoît qui ont toujours été présents pour moi, même à distance, et m'ont toujours prise sous leurs ailes.

Le plus grand des mercis est pour mon doudou Erwann, qui, malgré les moments où j'ai pu être très pénible, voire horrible, est resté, m'a supportée, m'a préparé des bons petits plats et continue à m'aimer... Il n'y a pas d'homme plus fort et courageux...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLEAUX ET FIGURES.....	5
ABBREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	12
I - Les membranes cellulaires	13
A - Des lipides	13
1 - Les glycérophospholipides	14
1a - Différentes classes de phospholipides.....	15
1b - Diversité liée aux acides gras.....	15
1c - Impact du contenu en acides gras des phospholipides sur les propriétés des membranes.....	17
2 - Les sphingolipides	19
3 - Les stérols.....	21
4 - Répartition des différentes espèces lipidiques au sein de la cellule.....	21
5 - Les radeaux lipidiques	23
B - Des protéines	24
C - Des glucides.....	25
II - La voie de sécrétion.....	26
A - Du RE à l'appareil de Golgi	27
1 - Synthèse protéique et insertion dans la membrane du RE.....	27
2 - Repliement des protéines	28
3 - Contrôle qualité du RE	29
3a - L'UPR.....	30
3b - L'ERAD	33
4 - Transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi	34
B - De l'appareil de Golgi à la membrane plasmique	36
1 - Trafic au sein de l'appareil de Golgi	36
2 - Contrôle qualité de l'appareil de Golgi	37
3 - Transport vésiculaire vers la membrane plasmique	38

III - Importance des phospholipides dans la voie de sécrétion.....	39
A - L'homéostasie du RE	39
B - Formation des vésicules	40
C - Trafic des protéines membranaires.....	42
D - Stabilité des protéines	43
E - Activité des protéines	47
IV - Pathologies liées à la dérégulation de l'homéostasie lipidique : cas des AG.....	49
A - Le diabète de type 2	49
1 - Généralités	49
2 - L'obésité, un facteur de risque.....	49
3 - Rôle des AGS dans le développement du diabète de type 2	50
B - La mucoviscidose.....	51
1 - Origine de la maladie	51
1a - Le CFTR.....	52
1b - La mutation <i>F508del-CFTR</i>	53
2 - Des correcteurs pharmacologiques : une stratégie thérapeutique	55
3 - Une homéostasie lipidique perturbée	56
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	57
I - Comprendre l'implication des AGS sur la voie de sécrétion.....	58
II - Comprendre l'implication des AGS dans la mucoviscidose	60
MATERIEL ET METHODES.....	62
I - Matériel biologique.....	63
A - Levures	63
1 - Souches	63
2 - Cultures	64
3 - Estimation de la croissance des levures.....	66
B - Cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées	66
1 - Origine des prélèvements	66
2 - Obtention des cellules épithéliales bronchiques	67
C - Lignées cellulaires humaines	68
1 - Les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-	68
2 - Culture cellulaire	69
2a - Milieux de culture.....	69

2b - Entretien des lignées	69
2c - Congélation et décongélation des cellules.....	70
3 - Incubation des cellules avec des acides gras	71
3a - Préparation des acides gras	71
3b - Conditions de culture	71
3c - Récupération des cellules	71
D - Plasmides	72
II - Méthode de génétique : obtention de doubles mutants	73
III - Méthodes de biologie moléculaire	74
A - Extraction d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne	74
B - Transformation de levures	75
C - PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	75
1 - Extraction des ARN totaux	75
2 - RT-PCR.....	76
3 - qPCR	77
3a - Procédure expérimentale	77
3b - Analyse des résultats	78
3c - Validation des amorces.....	80
IV - Méthodes de biochimie	82
A - Mesure de l'activité β -galactosidase.....	82
B - Détection et quantification de l'apoptose	83
C - Western blot.....	84
1 - Extraction, dosage et préparation des échantillons protéiques	84
2 - Electrophorèse et transfert sur membrane	86
3 - Immunodétection	87
D - Etude des lipides	88
1 - Extraction des lipides totaux.....	88
2 - Purification des phospholipides sur colonne de silice	88
3 - Analyse en spectrométrie de masse	89
4 - Purification des PC par chromatographie sur couche mince	90
5 - Dosage des PC par détermination colorimétrique.....	91
6 - Expérience de flottaison	91
IV - Méthodes de microscopie.....	92
A - Microscopie confocale	92
B - Microscopie électronique à transmission	93

VI - Méthodes de mesure d'activité des canaux ioniques	93
A - Efflux d'iode	93
B - Mesure de l'activité calcique intracellulaire.....	95
VII - Méthodes statistiques	97
 RESULTATS	 98
 Chapitre I : Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion.....	 99
Résumé de la première publication.....	100
Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties	100
Les AGS altèrent la morphologie des vésicules de sécrétion.....	100
Les céramides/sphingolipides interviennent dans les étapes précoces de la voie de sécrétion.....	101
Les PL saturés sont des régulateurs clés de la formation des vésicules au niveau du TGN.....	104
 Chapitre II : Implication des acides gras saturés dans la mucoviscidose	 129
Résumé de la deuxième publication.....	130
Cystic fibrosis airway cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation.....	130
Du palmitate s'accumule dans les PC des cellules de patients CF, mais cette accumulation n'est pas directement corrélée à la mutation <i>F508del-CFTR</i>	130
L'augmentation du taux de saturation des PC induit un stress du RE et altère l'activité du <i>F508del-CFTR</i> corrigé.....	132
Résultats complémentaires de la deuxième publication.....	170
La comparaison des profils de PC des individus non-CF fumeurs et non-fumeurs renforce l'hypothèse de l'hypoxie comme facteur induisant l'augmentation du taux de saturation des PC chez les patients CF.	170
L'augmentation du taux de saturation des PC altère également l'activité calcique des cellules CF.	171
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	 175
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 184

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1 : Espèces phospholipidiques du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique	22
Tableau 2 : Composition lipidique des organites de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Tableau 3 : Souches de levures utilisées	64
Tableau 4 : Composition des milieux de culture utilisés pour la levure	65
Tableau 5 : Plasmides utilisés	72
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la qPCR.....	78
Tableau 7 : Composition des gels de polyacrylamide.....	86
Tableau 8 : Composition des tampons pour les gels de séparation et de concentration	86
Tableau 9 : Composition du tampon de transfert	87
Tableau 10 : Récapitulatif des anticorps utilisés	87
Figure 1 : Représentation schématique de la membrane plasmique	13
Figure 2 : Représentation schématique d'une bicouche lipidique	14
Figure 3 : Représentation schématique d'un phospholipide	14
Figure 4 : Structure des acides gras.....	16
Figure 5 : Structures des acides gras à 18 carbones obtenues par modélisation quantique	17
Figure 6 : Représentation schématique de la forme des phosphatidylcholine	18
Figure 7 : Structures chimiques de la sphingosine et de quelques uns de ses dérivés	19
Figure 8 : Les différents types de sphingolipides de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figure 9 : Structures chimiques du cholestérol et de l'ergostérol.....	21
Figure 10 : Modèle d'organisation des radeaux lipidiques de la membrane plasmique.....	23
Figure 11 : Schéma illustrant les différentes associations des protéines à la membrane	24
Figure 12 : La voie de sécrétion	26
Figure 13 : Mécanismes de translocation des protéines membranaires	28
Figure 14 : Le déclenchement de l'UPR chez la levure.....	31
Figure 15 : Les différentes voies de l'UPR chez les mammifères	32
Figure 16 : Dégradation d'une protéine par le protéasome.....	34
Figure 17 : Formation d'une vésicule COP II.....	35

Figure 18 : Schéma représentatif de l'appareil de Golgi	36
Figure 19 : Recrutement de la protéine ArfGAP1 par la vésicule en formation.....	42
Figure 20 : Polarisation de la bicouche lipidique.....	44
Figure 21 : L'hydrophobic mismatch	45
Figure 22 : Le stress de courbure	46
Figure 23 : Modèle moléculaire du CFTR	52
Figure 24 : Voies de sécrétion des protéines CFTR et F508del-CFTR	54
Figure 25 : Le modèle <i>hem1Δ</i>	59
Figure 26 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observée en microscopie électronique.....	63
Figure 27 : Dissection de bronches	67
Figure 28 : 16HBE14o ⁻ observées au microscope inversé.....	68
Figure 29 : Exemple d'élaboration d'un double mutant: cas de <i>hem1Δ end3Δ</i>	73
Figure 30 : Analyse des résultats de qPCR	79
Figure 31 : Dérivée d'une courbe de fusion obtenue pour un couple d'amorces.....	81
Figure 32 : Droite standard obtenue pour un couple d'amorces avec plusieurs concentrations d'ADNc.....	81
Figure 33 : Schéma récapitulatif du principe du test ELISA ^{PLUS} pour la détection de l'apoptose	83
Figure 34 : Purification de PC par TLC	91
Figure 35 : Représentation graphique des efflux d'iodure	95
Figure 36 : Structure chimique de la sonde Fluo-4-AM	95
Figure 37 : Mobilisation calcique globale par l'ATP.....	96
Figure 38 : Voie de biosynthèse des céramides/sphingolipides chez la levure.....	103
Figure 39 : Taux de saturation des PC des cellules de patients CF et non-CF.....	171
Figure 40 : Mobilisation calcique globale.....	172
Figure 41 : Déplétion des stocks calciques après incubation avec du palmitate.....	173
Figure 42 : Schéma récapitulatif des effets des AGS sur la voie de sécrétion.....	176
Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets du palmitate sur la voie de sécrétion de F508del-CFTR corrigé.....	181

ABBREVIATIONS

16HBE14o- Human Bronchial Epithelial cell, contenant le gène *CFTR* sauvage
4-PBA 4-phenyl butyrate

A

A23187 Ionophore calcique, activateur du Cl_{ca}
aa acide aminé
ABC ATP Binding Cassette
Ac Anticorps
ACK Acétate de potassium (milieu de sporulation)
ADN Acide DéoxyriboNucléique
ADNc Acide DéoxyriboNucléique complémentaire
AG Acide Gras
AGI Acide Gras Insaturé
AGMI Acide Gras Monoinsaturé
AGPI Acide Gras Polyinsaturé
AGS Acide Gras Saturé
ALA δ-aminolévulinate
ALG9 Asparagine-Linked Glycosylation 9
ALPS Amphipathic Lipid Packing Sensors
Amp Ampicilline
AMPc Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANOVA ANalysis Of VAriance
ArfGAP1 Arf GTPase Activating Protein 1
ARN Acide RiboNucléique
ARNm Acide RiboNucléique messenger
ATF6 Activating Transcription Factor 6
ATP Adénosine TriPhosphate

B

ba base azotée
BCA Acide bicinchoninique
BiP Binding Protein
BSA Bovine Serum Albumin

C

CF Cystic Fibrosis (mucoviscidose)

CFBE41o	Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial cell, homozygote pour la mutation <i>F508del-CFTR</i>
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CFTR _{inh} -172	CFTR _{inhibiteur} -172
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
Cl _{Ca}	Canal chlorure calcium-dépendant
Cl _{Swell}	Canal chlorure sensible au gonflement de la cellule
COP	Coat protein complex
CPX	8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
Ct	Nombre de cycles à effectuer pour atteindre un seuil de fluorescence fixé

D

DAG	DiAcylGlycérol
DHA	DocosaHexaenoic Acid (C22:6)
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM/HAM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/nutrient mixture F-12 Ham
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (dépourvu de Ca ²⁺ et de Mg ²⁺)
DT2	Diabète de Type 2

E

ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECL	Enhanced ChemiLuminescence™
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF2 α	eukaryotic Initiation Factor 2 α
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channels
EPA	EicosaPentaenoic Acid (C20:5)
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERG	Ergostérol

F

F508del-CFTR	CFTR mutant, avec la délétion de la phénylalanine en position 508
FA2H	Fatty Acid 2-Hydroxylase
Fsk	Forskoline
FUR4	Transporteur d'uracile

G

GAPDH	GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
-------	--

GDP	Guanosine DiPhosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
Grp78	Glucose related protein 78
Gst	Génistéine
GTP	Guanosine TriPhosphate

H

HAS	Haute Autorité de Santé
HBE	Human Bronchial Epithelial cell
HDSV	Heavy Density Secretory Vesicle
HIF1	Hypoxia Inducible Factor 1
HRP	HorseRadish Peroxidase
HS	Horse Serum
HSP	Heat Shock Protein
HXT4	Transporteur de glucose

I

IP ₃	Inositol triphosphate
IPC	Inositol PhosphoCéramide
IRE1	Inositol-REquiring 1

L

LA	Linoleic Acid (C18:2)
LB	Luria Bertani (milieu de culture pour bactéries)
L _d	Liquid disordered phase
LDSV	Light Density Secretory Vesicles
L _o	Liquid ordered phase

M

MEM	Milieu Essentiel Minimum
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MP	Membrane Plasmique
MS	Mass Spectrometry
MSD	Membrane Spanning Domain
MYR	Myriocine (inhibiteur de la voie de biosynthèse des sphingolipides)

N

NBD	Nucleotide Binding Domain
-----	---------------------------

Non-CF
nt Non atteint de mucoviscidose
Nucléotide

O

o-nitrophénol ortho-nitrophénol (jaune)
OLE Oléate
OMS Organisation Mondiale de la Santé
ONPG Ortho-nitrophényl- β -galactoside (incolore)
OPT2 Transporteur d'oligopeptides

P

PBS Phosphate-Buffered Saline
PC PhosphatidylCholine
PCR Polymerase Chain Reaction
PDI Protein Disulfide Isomerase
PE PhosphatidylEthanolamine
PERK Protein-kinase like Endoplasmic Reticulum Kinase
PG PhosphatidylGlycérol
PI PhosphatidylInositol
PKA Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC Protéine Kinase C
PL PhosphoLipide
PS PhosphatidylSérine
PTR2 Transporteur de peptides

Q

qPCR quantitative Polymerase Chain Reaction

R

R Domaine régulateur de CFTR
RE Réticulum Endoplasmique
REr Réticulum Endoplasmique rugueux
RFP Red Fluorescent Protein
RT-PCR Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SCD1 Stearyl-CoA Desaturase 1

SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate – PolyAcrylamide GEl
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPases
SRP	Signal-Recognition Particle
SVF	Sérum de Veau Fœtal

T

TBS-T	TBS-Tween 20
TGN	Trans-Golgi Network
TLC	Thin Layer Chromatography
TM	TransMembrane Domain
Tween 80	Source d'oléate

U

UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	Unfolded Protein Response Element

V

VSVG	Vesicular Stomatitis Virus G protein
VSVG-GFP	Vesicular Stomatitis Virus G protein-Green Florescent Protein

X

XBP1	X-Box-binding Protein 1
------	-------------------------

Y

YNB	Yeast Nitrogen Base (milieu minimum pour levures)
YPG	Yeast Peptone + Glucose (milieu complet pour levures avec glucose)
YPRaf	Yeast Peptone + Raffinose (milieu complet pour levures avec raffinose)

INTRODUCTION

I - Les membranes cellulaires

Les membranes sont un élément essentiel à la vie cellulaire. En effet, toute cellule est délimitée par une membrane plasmique, formant une barrière sélective en régulant les échanges entre le milieu intracellulaire ou cytoplasme, et l'environnement extracellulaire. De plus, dans les cellules eucaryotes, les membranes compartimentent le cytoplasme en plusieurs organites : noyau, réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi, mitochondries, lysosomes, vacuole... Les membranes sont composées en grande partie de lipides dans lesquels s'insèrent des protéines. Les principaux composants des membranes et plus particulièrement de la membrane plasmique sont schématisés dans la Figure 1. Dans ce chapitre dédié aux constituants des membranes, nous nous sommes plus spécifiquement concentrés sur les composants de nature lipidique.

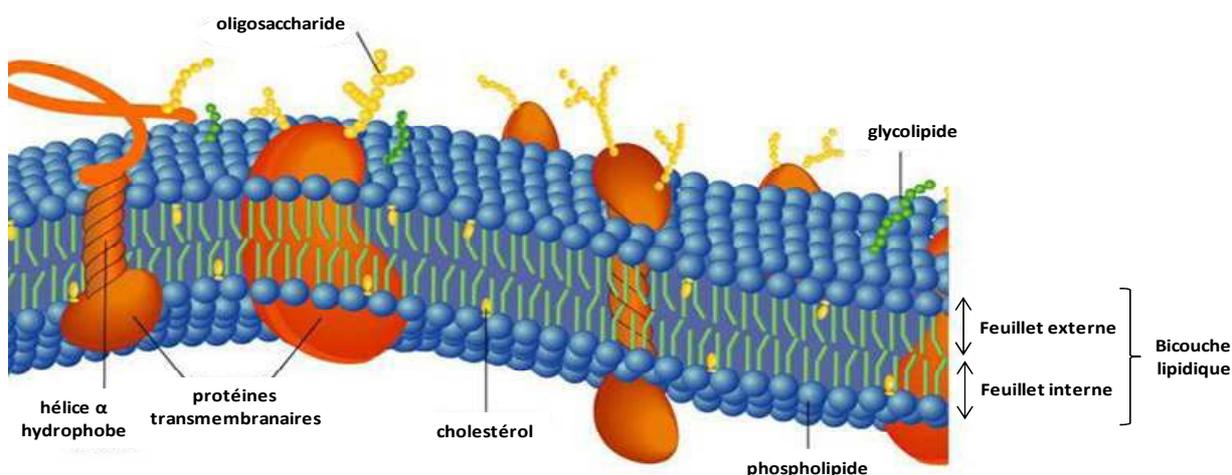


Figure 1 : Représentation schématique de la membrane plasmique

La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique (phospholipides et cholestérol) formant deux feuillets. Des protéines s'insèrent dans la membrane, leur domaine hydrophobe, généralement structuré en hélice α , traversant la bicouche. Des oligosaccharides conjugués à des protéines ou des lipides du feuillet externe composent également la membrane plasmique. Modifiée d'après le site www.wordpress.com.

A - Des lipides

Les lipides sont les composants majeurs des membranes. Parmi les lipides membranaires se trouvent les phospholipides, les sphingolipides et les stérols. Ces trois types de lipides sont amphiphiles et constituent le squelette des membranes, par la formation d'une

bicouche lipidique dans laquelle leur tête polaire hydrophile se trouve en contact avec le milieu aqueux et leur queue hydrophobe à l'intérieur de la membrane, créant ainsi un feuillet membranaire interne et un feuillet membranaire externe (Figure 2).

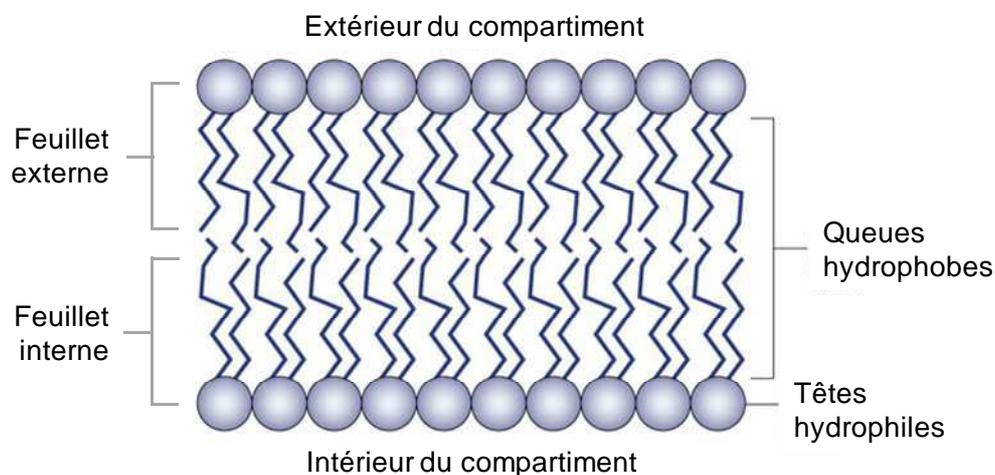


Figure 2 : Représentation schématique d'une bicouche lipidique
Modifiée d'après Joachim Pietzsch, Nature, 2004.

1 - Les glycérophospholipides

La bicouche lipidique est essentiellement constituée de glycérophospholipides (Figure 3), qui seront désignés dans ce manuscrit par le terme phospholipides (PL). Ces derniers se caractérisent par leur tête hydrophile contenant un résidu glycérol-3-phosphate estérifié par une molécule polaire, et par leur queue hydrophobe composée des chaînes aliphatiques de deux acides gras (AG). La synthèse des AG s'effectue dans le cytoplasme, alors que l'assemblage des éléments constituant les PL s'effectue dans le RE.

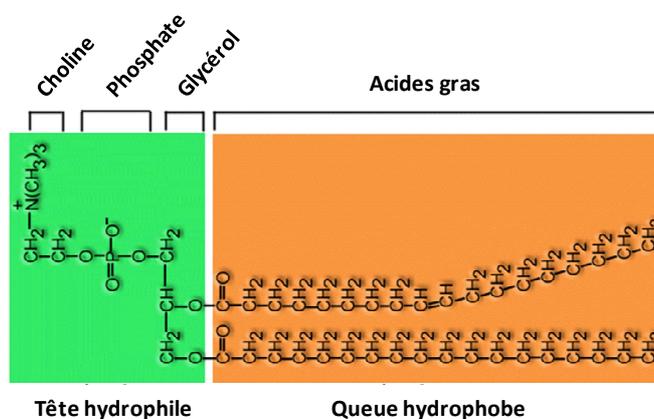


Figure 3 : Représentation schématique d'un phospholipide

La molécule polaire de la tête hydrophile représentée ici est une choline. Il s'agit donc d'une phosphatidylcholine.
Modifiée d'après le site <http://ustboniface.mb.ca>

1a - Différentes classes de phospholipides

La molécule polaire de la tête hydrophile détermine la classe du PL. Parmi celles-ci, les plus abondamment retrouvées dans les PL membranaires sont la choline et l'éthanolamine, donnant lieu à une phosphatidylcholine (PC) et une phosphatidyléthanolamine (PE), respectivement. Les autres molécules polaires sont l'inositol, la sérine et le glycérol, donnant lieu à un phosphatidylinositol (PI), une phosphatidylsérine (PS) et un phosphatidylglycérol (PG), respectivement. Les PC et PE se retrouvent aussi bien sur les feuillettes internes et externes des membranes, où elles jouent un rôle principalement structural, alors que les PI et PS sont localisés préférentiellement sur le feuillet interne de la membrane plasmique, où ils exercent, entre autre, un rôle de messenger. Par exemple, les PS, lorsqu'elles se retrouvent sur la face externe du feuillet membranaire, sont un indicateur de l'apoptose. Les PI, quant à eux, ont plusieurs fonctions. Ils sont clivés par la phospholipase C, après activation par l'ATP, en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3), deux messagers secondaires activant respectivement les canaux calciques de la membrane plasmique *via* l'activation de la protéine kinase C (PKC) et les canaux calciques du RE que sont les récepteurs à l' IP_3 (ces voies d'activation sont décrites plus en détails dans le chapitre Matériel et Méthodes, VI- B- Mesure de l'activité calcique intracellulaire). Chez la levure, les PI sont également les précurseurs des sphingolipides (décrits plus tard dans le manuscrit). Enfin, le PG, est très peu retrouvé dans les membranes. Chez l'homme, il est le précurseur du surfactant pulmonaire, et il est également retrouvé dans le liquide amniotique où il indique la maturité pulmonaire du fœtus.

1b - Diversité liée aux acides gras

Parmi les quatre classes de PL membranaires, un deuxième degré de complexité donne naissance à une très grande diversité des espèces de PL. Il s'agit des deux AG, pouvant être identiques ou différents, composant la queue hydrophobe des PL. Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique dont la longueur varie de 4 à 36 atomes de carbone toujours en nombre pair. Cependant, les AG incorporés dans les PL possèdent généralement entre 14 et 24 carbones. De plus, dans cette chaîne carbonée, peuvent apparaître une ou plusieurs doubles liaisons, appelées insaturations. On parle alors d'AG insaturés (AGI) ou polyinsaturés (AGPI) si le nombre de doubles liaisons est multiple.

Dans ce manuscrit, nous avons utilisé deux types de nomenclatures pour décrire les PL

en fonction de leur contenu en AG. Prenons l'exemple de l'espèce de PC contenant deux AGI, deux acides oléiques ou oléates, composés de 18 atomes de carbones et d'une insaturation. Cette espèce est notée PC(36:2), où 36 correspond au nombre total de carbones constituant la queue hydrophobe du PL considéré, ici un PC, et 2 correspond au nombre d'insaturations de la queue hydrophobe. Cette espèce de PC peut également être décrite de façon plus précise comme suit : PC(18:1/18:1), où les deux AG constituant le PC sont décrits individuellement par le nombre de carbones (18) et le nombre d'insaturations (1) les constituant.

Parmi les AGI, les doubles liaisons peuvent adopter deux types de configurations. Lorsque les hydrogènes portés par les carbones impliqués dans la double liaison se retrouvent du même côté de la double liaison, on parle d'AGI *cis* (Figure 4). Au contraire, lorsque ces hydrogènes sont de part et d'autre de la double liaison, on parle d'AGI *trans* (Figure 4).

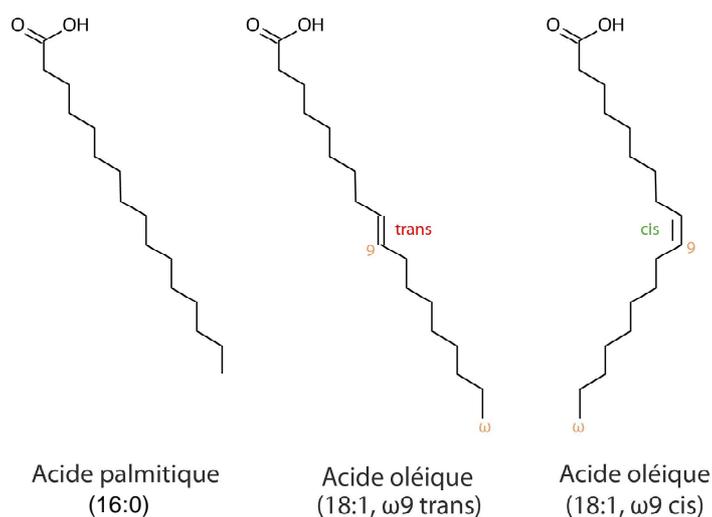


Figure 4 : Structure des acides gras

Les configurations *trans* et *cis* de l'acide gras insaturé (AGI) oléique (18:1) sont représentées sur ce schéma. La position de la double liaison est indiquée par ω9, ω désignant le dernier carbone de la chaîne aliphatique et 9 le carbone impliqué dans la double liaison numéroté à partir de ω. L'acide gras saturé (AGS) palmitique (16:0) est également donné en exemple. Modifiée d'après le site vegebon.wordpress.com.

En l'absence de double liaison, les AG sont dits saturés (AGS, Figure 4). Dans ce manuscrit, nous nous sommes particulièrement intéressés à une espèce de PC contenant deux AGS, deux acides palmitiques ou palmitates composés de 16 atomes de carbone, notée PC(32:0) ou PC(16:0/16:0).

1c - Impact du contenu en acides gras des phospholipides sur les propriétés des membranes

Les AG sont les constituants clés des PL car ils modulent les propriétés biophysiques des membranes qu'ils constituent. De récentes études menées au sein de notre laboratoire ont permis de mieux comprendre comment l'état saturé ou insaturé d'un AG influence sa propre flexibilité et sur celle des membranes (Deguil *et al.*, 2011). En effet, si l'on considère schématiquement les AG comme des ressorts, il est possible de déterminer deux conformères extrêmes pour ces AG en fonction de leur degré de compression : le conformère le plus étiré nommé β , et le conformère le plus compact nommé hélice-hélice. Grâce à la modélisation quantique, la distance (en Å) entre le premier et le dernier carbone de la chaîne des conformères d'un AG donné et l'enthalpie libre ($\delta G_{\text{folding}}$, en kcal/mol) nécessaire pour passer d'un conformère à l'autre, reflétant la flexibilité de l'AG considéré, peuvent être calculées (Figure 5).

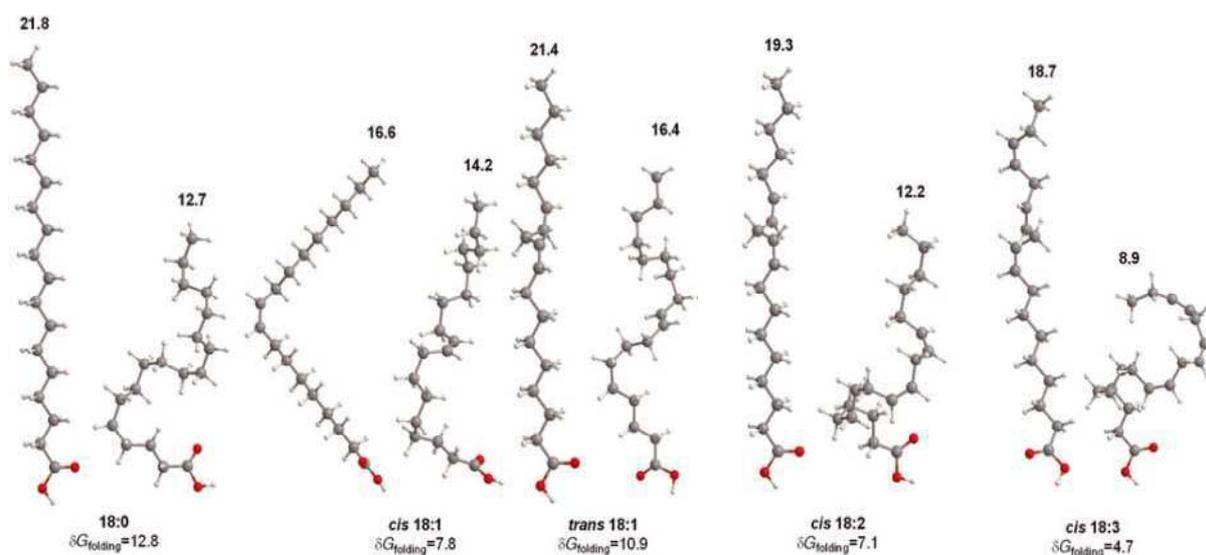


Figure 5 : Structures des acides gras à 18 carbones obtenues par modélisation quantique

Pour chaque acide gras considéré (18:0, 18:1 *cis*, 18:1 *trans*, 18:2 *cis* et 18:3 *cis*), les conformères β (à gauche) et hélice-hélice (à droite) sont représentés. L'énergie nécessaire pour passer d'un conformère à l'autre ($\delta G_{\text{folding}}$, en kcal/mol) ainsi que la longueur en Å de la chaîne carbonée (au dessus des structures) sont indiquées. Modifiée d'après (Deguil *et al.*, 2011).

Dans cette étude, il a été montré que les AGS, en particulier l'acide stéarique (C18:0) et les AGI *trans*, tel que l'acide oléique *trans* (C18:1), se comportaient de la même façon. En effet, les conformères β de ces derniers présentent les longueurs de chaînes carbonées les plus importantes (21,8 et 21,4 Å, respectivement) et des $\delta G_{\text{folding}}$ relativement élevés (12,8 et 10,9 kcal/mol, respectivement). Ceci suggère que ces AG saturé et insaturé *trans* sont rigides, car il

faut apporter une énergie élevée pour pouvoir les compresser, ce qui explique leur forme linéaire (Figure 5).

Parmi les AGI et AGPI *cis* à 18 atomes de carbone, si l'on considère les acides oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et linoléinique (C18:3), le $\delta G_{\text{folding}}$ (7,8 ; 7,1 et 4,7 kcal/mol, respectivement) décroît avec le nombre d'insaturations (Figure 5). Ceci montre que la flexibilité des AGI *cis* augmente avec le nombre d'insaturations de la chaîne carbonée. Cependant, parmi ces trois AGI *cis*, l'un d'entre eux se distingue. Il s'agit de l'AG monoinsaturé (AGMI) oléique (C18:1). En effet, le conformère β de l'acide oléique *cis* est le seul à présenter une structure coudée en raison de son unique double liaison en configuration *cis*. De plus, l'acide oléique *cis* présente la plus courte longueur de chaîne carbonée (plus exactement la distance entre le premier et le dernier carbone de la chaîne la plus courte), qui est d'ailleurs assez proche de celle de son conformère hélice-hélice (16,6 et 14,2 Å, respectivement). Enfin, le $\delta G_{\text{folding}}$ de l'acide oléique *cis* (7,8 kcal/mol) est plus faible que celui de l'acide oléique *trans* (10,9 kcal/mol) mais est plus élevé que celui des AGPI *cis* (7,1 et 4,7 kcal/mol, pour C18:2 et C18:3, respectivement). Ces caractéristiques font de l'acide oléique un AG plus flexible que les AGS, mais beaucoup moins que les AGPI *cis*. Néanmoins, grâce à sa forme coudée, il aura un impact différent sur la forme des PL. Tandis que les AGS, AGI *trans* et AGPI *cis* formeront des PL cylindriques, les AGI *cis* formeront des PL coniques (Figure 6).

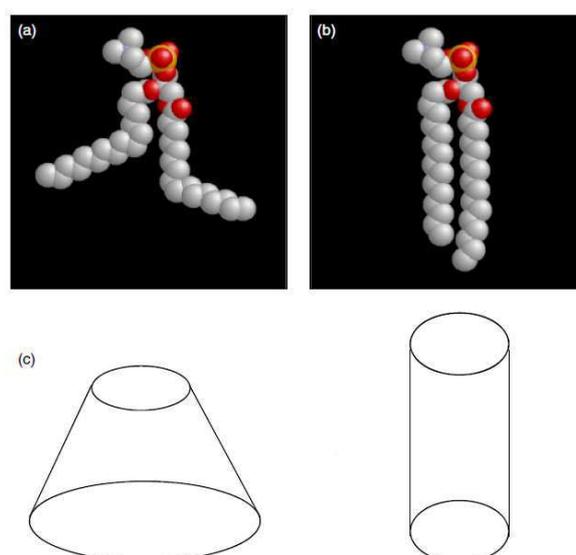


Figure 6 : Représentation schématique de la forme des phosphatidylcholine

Représentation dans l'espace d'une phosphatidylcholine (PC) comportant deux acides gras insaturés *cis* (a) ou deux acides gras saturés (b), donnant lieu, respectivement, à une PC conique ou cylindrique (c). Modifiée d'après (Pineau and Ferreira, 2010).

En conclusion de cette étude, les AGS et AGI *trans*, linéaires et peu flexibles, formeront des PL cylindriques (Figure 6b et c) qui auront tendance à rigidifier/ordonner les membranes. Alors que les AGPI *cis*, dont la flexibilité augmente avec le nombre d'insaturations de la chaîne, formeront également des PL cylindriques mais flexibles. Ils rendront donc les membranes très fluides. Les AGMI *cis*, de forme coudée et de longueur peu variable, formeront des PL coniques (Figure 6a et c) qui induisent des contraintes différentes au sein de la membrane. En effet, l'introduction de PL coniques dans une membrane la rend plus fluide en induisant un espacement entre les PL par l'écartement des têtes polaires. On parle de « loose lipid packing ». Cet effet des AGMI *cis* sur la forme des PL, et donc sur les propriétés biophysiques des membranes, joue un rôle important dans le stress de courbure et la formation des vésicules que nous décrirons plus tard dans ce manuscrit.

2 - Les sphingolipides

Les sphingolipides, dont la synthèse débute dans le RE et se poursuit dans l'appareil de Golgi, sont des lipides complexes entrant également dans la composition des membranes et dérivant de la sphingosine. L'ajout de différents substituants à la sphingosine permet la formation d'espèces lipidiques plus complexes (Figure 7).

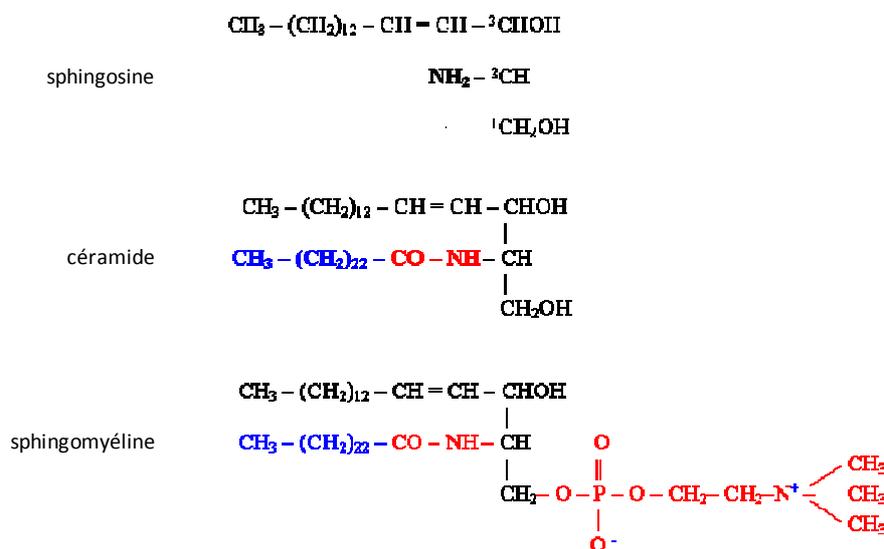


Figure 7 : Structures chimiques de la sphingosine et de quelques uns de ses dérivés

Un céramide diffère de la sphingosine par l'ajout d'un acide gras. La sphingomyéline résulte de l'ajout d'un phosphate et d'une choline à un céramide. Modifiée d'après le cours de Biochimie : structure des glucides et lipides de la Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie.

Par exemple, l'addition d'un AGS à très longue chaîne sur la fonction amine de la

sphingosine permet d'obtenir un céramide. Ce dernier, constituant mineur des membranes, joue plutôt un rôle de messager. En effet, un taux élevé de céramide dans la cellule engendre le déclenchement de l'apoptose (Dbaibo and Hannun, 1998). L'ajout d'un phosphate et d'une molécule polaire, telle que la choline, à ce céramide donnera un sphingophospholipide, ici la sphingomyéline, le sphingolipide le plus abondant dans les membranes des eucaryotes supérieurs (Figure 7).

Plus de trois cents types de sphingolipides sont retrouvés chez les eucaryotes supérieurs (Hannun and Bell, 1989). Chez la levure, il existe trois grandes familles de sphingolipides dérivant toutes du PI : l'inositolphosphorylceramide (IPC), le mannosyl-IPC (MIPC) et le mannosyldi-IPC (M(IP)₂C) (Figure 8), dont les variations dépendent de la chaîne d'AG et de leur niveau d'hydroxylation (Dickson, 1998).

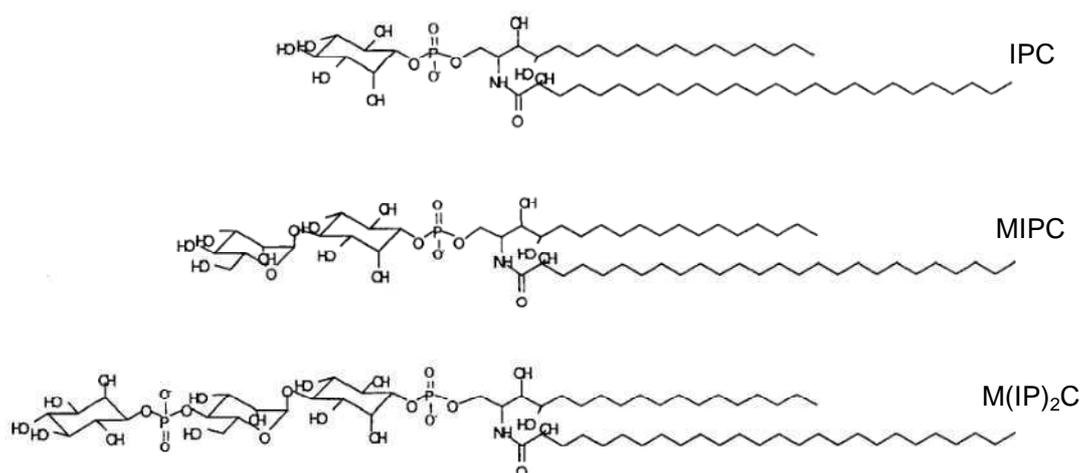


Figure 8 : Les différents types de sphingolipides de *Saccharomyces cerevisiae*

IPC : Inositolphosphorylceramide. MIPC : Mannosylinositolphosphorylceramide. M(IP)₂C : Mannosyldiinositolphosphorylceramide. Modifiée d'après (Hechtberger *et al.*, 1994).

Les sphingolipides se caractérisent par de très longues chaînes carbonées, le plus souvent saturées, et tendent à augmenter l'épaisseur des membranes (Sprong *et al.*, 2001). Au sein des bicouches, ils ont tendance à s'associer aux stérols pour former des microdomaines, également appelés radeaux lipidiques (décrits un peu plus tard dans le chapitre Introduction, I-A- 5- Les radeaux lipidiques).

3 - Les stérols

Une dernière classe de lipides entre dans la composition des membranes. Il s'agit des stérols. Ces derniers sont constitués d'un noyau stéroïde hydrophobe formé par 4 cycles carbonés, dont l'un des carbones porte un groupement hydroxyle qui constitue la tête polaire hydrophile du stérol. A ce noyau, s'ajoute une chaîne carbonée déterminant le type de stérol. Dans les cellules animales, le stérol membranaire majoritaire est le cholestérol. L'équivalent du cholestérol chez la levure est l'ergostérol (Figure 9).

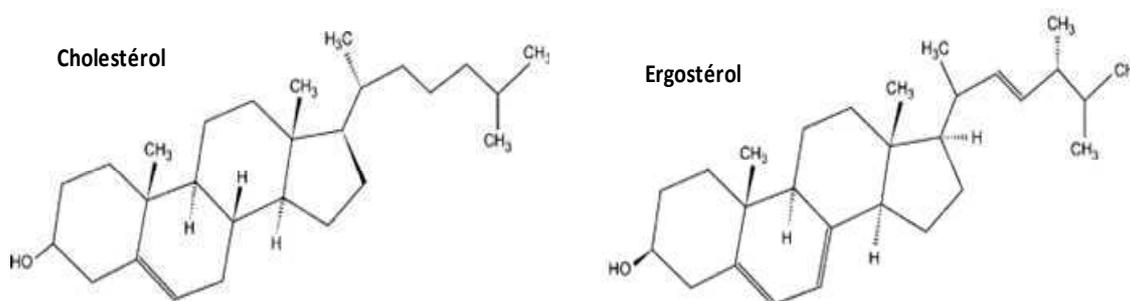


Figure 9 : Structures chimiques du cholestérol et de l'ergostérol

Modifiée d'après (Tierney *et al.*, 2005).

Les stérols, dont la synthèse s'effectue dans le RE, s'intercalent entre les PL et/ou sphingolipides, leur tête hydrophile étant orientée vers la surface des membranes. De par leur noyau hydrophobe, ils présentent une forte affinité pour les sphingolipides et les PL saturés, facilitant la formation de radeaux lipidiques. Ils modulent également les propriétés biophysiques des membranes en les rendant plus ordonnées.

4 - Répartition des différentes espèces lipidiques au sein de la cellule

Les différentes espèces lipidiques composant les membranes ne sont pas réparties de façon équivalente au sein de la cellule. Dans ce chapitre, nous décrirons brièvement le contenu lipidique des membranes du RE, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique, les principaux acteurs de la voie de sécrétion antérograde des protéines.

Selon l'organe considéré, sa composition en PL varie. En effet, les PC représentent à eux seuls la moitié des espèces de PL membranaires du RE, alors que les PS, peu retrouvées dans le RE, constituent les PL majoritaires de la membrane plasmique (Tableau 1, (Zinser *et al.*, 1991)).

	PC	PE	PI	PS
Microsomes	51,3	33,4	7,5	6,6
MP	16,8	20,3	17,7	33,6

Tableau 1 : Espèces phospholipidiques du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique

Les microsomes sont des fractions cellulaires contenant essentiellement des membranes du RE (réticulum endoplasmique) mais également des traces de membranes provenant de l'appareil de Golgi. MP : membrane plasmique. PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol et PS : phosphatidylsérine. Les résultats obtenus chez *Saccharomyces cerevisiae* sont exprimés en pourcentage de phospholipides totaux. Modifié d'après (Zinser *et al.*, 1991).

Si le RE est le siège de la synthèse du cholestérol/ergostérol, sa membrane en contient très peu. En revanche, la membrane plasmique est très riche en cholestérol/ergostérol mais également en PL saturés (Tableau 2) et en sphingolipides (Brown and London, 1998).

	Epaisseur de la membrane (nm)	ERG / PL (mol / mol)	PS saturés (% des PS)	PE saturés (% des PE)	PC saturés (% des PC)	PI saturés (% des PI)
Microsomes	7,5 ± 0,8 *	0,26 **	27,7 *	13,3 *	16,0 *	52,8 *
Golgi	7,3 ± 0,4 *	ND	36,1 *	20,4 *	15,5 *	49,6 *
MP	9,2 ± 0,4 *	3,31 **	40,0 *	29,6 *	17,1 *	58,8 *

Tableau 2 : Composition lipidique des organites de *Saccharomyces cerevisiae*

Les microsomes sont des fractions cellulaires contenant essentiellement des membranes du RE (réticulum endoplasmique) mais également des traces de membranes provenant de l'appareil de Golgi. MP : membrane plasmique ; ERG : ergostérol ; PL : phospholipides ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol et ND : non déterminé. * : d'après (Schneiter *et al.*, 1999). ** : d'après (Zinser *et al.*, 1991).

Les PC et PI saturés, majoritairement retrouvés au niveau du RE et de la membrane plasmique respectivement (Tableau 1), ne varient guère d'un compartiment à l'autre (Tableau 2). Cependant, les taux de cholestérol/ergostérol, de sphingolipides, de PS et PE saturés augmentent tout au long de la voie de sécrétion, c'est-à-dire du RE vers la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi (Tableau 2). Cette hétérogénéité de composition lipidique d'un organite à l'autre engendre des propriétés membranaires différentes en termes d'épaisseur et de fluidité (Tableau 2). Alors que les membranes du RE et de l'appareil de Golgi présentent une certaine fluidité nécessaire à l'insertion des protéines en cours de synthèse dans la membrane du RE et à leur transport vésiculaire (ces aspects seront développés plus tard dans le chapitre Introduction, II – La voie de sécrétion), la membrane

plasmique se trouve plus rigide et plus épaisse que ces dernières de par sa composition riche en stérols, sphingolipides et PL saturés.

Au sein d'une membrane, les lipides sont également répartis de façon asymétrique dans les deux feuillets de la bicouche. Néanmoins, il est possible pour ces lipides de passer d'un feuillet à l'autre grâce à des ATPases : les flippases et les floppases. En effet, les flippases permettent essentiellement le passage des PS, et dans une faible mesure celui des PE, du feuillet externe au feuillet interne de la bicouche (Hrafnsdottir *et al.*, 1997; Bishop and Bell, 1985). Les floppases, quant à elles, transportent les PC, les sphingolipides et le cholestérol dans le sens inverse (Clark, 2011). Ce mouvement latéral des lipides au sein d'une bicouche est qualifié de « flip-flop ».

5 - Les radeaux lipidiques

Dans les membranes fluides, des microdomaines lipidiques ordonnés/rigides se distinguent. Il s'agit des radeaux lipidiques (ou « rafts »). En effet, il existe différents niveaux d'organisation des espèces lipidiques au sein d'une bicouche donnant lieu à des phases ordonnées (phases L_o pour « Liquid ordered ») constituées par l'association des sphingolipides, du cholestérol/ergostérol et des PL à longues chaînes saturées. Ces derniers vont former des microdomaines/radeaux au sein d'une phase désordonnée (phase L_d pour « Liquid disordered », Figure 10).

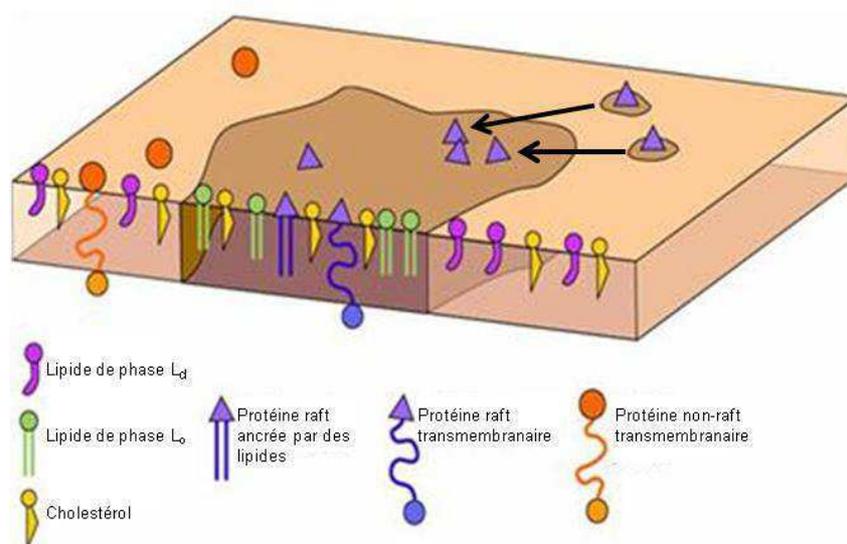


Figure 10 : Modèle d'organisation des radeaux lipidiques de la membrane plasmique

Au sein de la membrane plasmique, riche en cholestérol, les sphingolipides et les phospholipides à longues chaînes d'acides gras saturés ont une propension naturelle à se regrouper et former des structures très compactes appelées phases ordonnées (L_o , région marron foncé), ou encore radeaux lipidiques (« lipid rafts »). La migration de protéines (indiquée par les flèches) présentant une forte affinité pour ces domaines pourrait entraîner la coalescence de petits domaines dispersés pour former un radeau lipidique de taille plus importante (Brown and London, 2000). L_d : phase désordonnée. Modifiée d'après le cours « Cell and tissue Biology », University of Kansas Medical Center.

Les radeaux lipidiques constitueraient une plateforme modulant le trafic des protéines membranaires (Bagnat *et al.*, 2000) qui y sont intégrées de façon spécifique (Simons and Ikonen, 1997). Les rafts formeraient également des plateformes de signalisation en facilitant l'interaction de protéines impliquées dans la transduction du signal (Simons and Toomre, 2000). Cependant, il faut noter que l'existence des radeaux lipidiques est un sujet à controverse. En effet, si les phases L_o et L_d ont été démontrées dans des membranes modèles artificielles (Heberle *et al.*, 2005), le doute persiste en ce qui concerne les membranes cellulaires (Munro, 2003; Shaw, 2006).

B - Des protéines

Au sein des membranes, des protéines s'insèrent dans la bicouche lipidique, où elles jouent un rôle, entre autres, dans la communication (récepteurs), l'adhésion intercellulaires (desmosomes, jonctions communicantes), et dans le transport de solutés (canaux ioniques, transporteurs). Ces protéines, indispensables à la vie cellulaire, peuvent s'ancrer à la membrane de différentes façons. Elles peuvent traverser les deux feuilletts de la membrane : on parle alors de protéines transmembranaires, les domaines protéiques traversant la membrane pouvant être organisés sous forme d'hélice α ou de tonneau β (Figure 11a-c). Les protéines membranaires peuvent également être localisées sur l'un des feuilletts de la membrane : il s'agit de protéines extrinsèques (Figure 11d). Enfin, les protéines membranaires peuvent être ancrées à l'un des feuilletts de la membrane par l'association à un PL ou à un AG. On parle alors de protéines ancrées (Figure 11e).

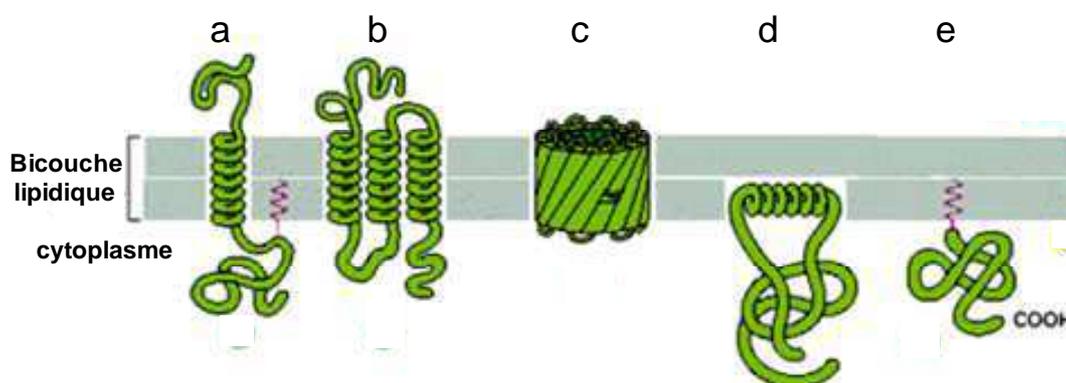


Figure 11 : Schéma illustrant les différentes associations des protéines à la membrane

Les protéines transmembranaires peuvent traverser la bicouche lipidique en un (a) ou plusieurs (b) segments de type hélice α ou de type tonneau β (c). Les protéines extrinsèques sont ancrées à un seul feuillet de la bicouche (d), alors que les protéines dites « ancrées » ne sont associées à la membrane que par un acide gras (e). Modifiée d'après le cours de mise à niveau en biologie cellulaire de l'Université de Poitiers.

C - Des glucides

La face externe de la membrane plasmique revêt un certain nombre de glucides liés de manière covalente aux lipides (glycolipides) ou à des protéines (glycoprotéines). Ces glucides de surface constituent le glycocalyx. Il joue un rôle de protection pour la cellule contre des agressions mécaniques, chimiques et enzymatiques, mais également dans les mécanismes d'identité et de reconnaissance intercellulaire. Par exemple, à la surface des globules rouges, le glycocalyx détermine le groupe sanguin d'un individu.

II - La voie de sécrétion

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux impacts des perturbations de l'homéostasie lipidique sur le trafic des protéines de la membrane plasmique de leur site de synthèse (le RE) à leur destination finale. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons plus spécifiquement sur la voie antérograde de sécrétion (exocytose) et nous porterons une attention toute particulière à l'implication des lipides dans les différentes étapes de cette voie. Les différentes étapes de la voie de sécrétion sont illustrées par la Figure 12.

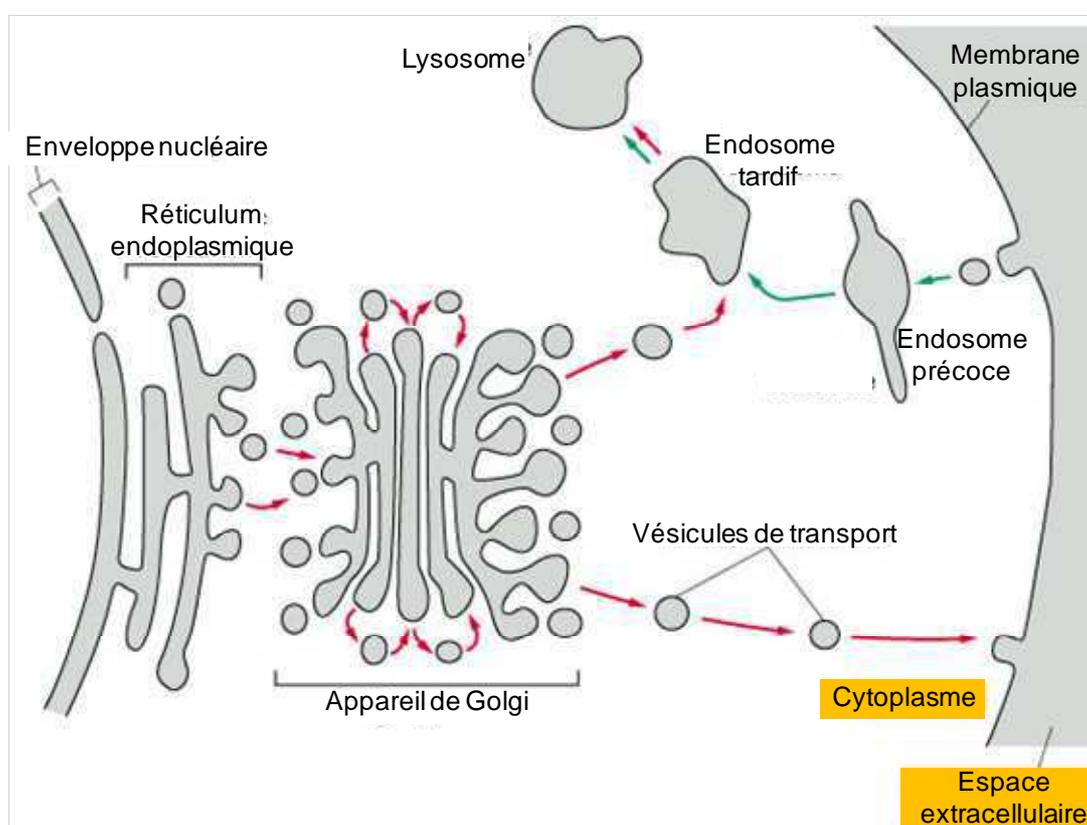


Figure 12 : La voie de sécrétion

Les protéines sécrétées ou de la membrane plasmique sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique avant d'être acheminées vers l'appareil de Golgi. A la sortie de ce compartiment, ces protéines sont : soit transportées directement à la membrane plasmique, soit dirigées vers un endosome tardif en attendant sa fusion avec un lysosome pour dégradation. Au bout d'un certain temps, les protéines membranaires sont internalisées dans un endosome précoce, à partir duquel elles pourront soit être recyclées à la membrane plasmique, soit être envoyées vers un endosome tardif. Le transport des protéines d'un compartiment à l'autre fait intervenir des systèmes vésiculaires. Modifiée d'après Garland Publishing, 1998.

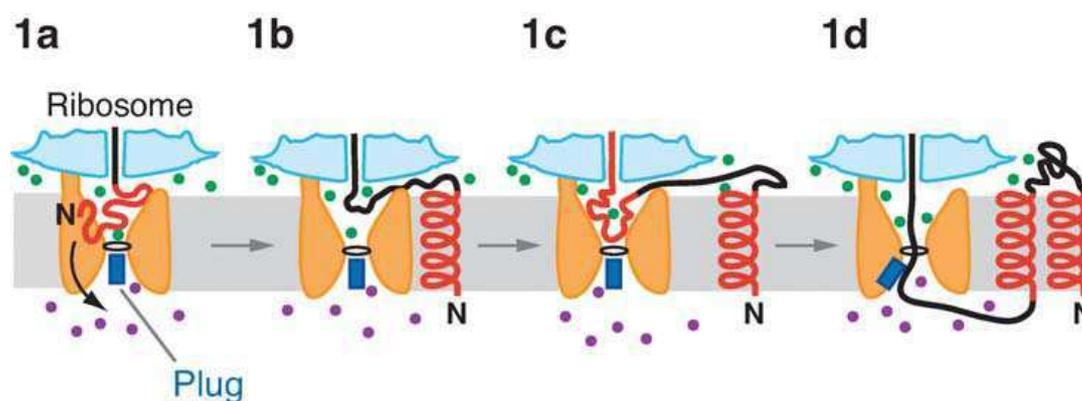
A - Du RE à l'appareil de Golgi

1 - Synthèse protéique et insertion dans la membrane du RE

La synthèse des protéines chez les eucaryotes se fait en trois étapes. Elle débute dans le noyau par la transcription du gène, porté par l'ADN (acide désoxyribonucléique) et codant pour la protéine à synthétiser, en ARNm (acide ribonucléique messager) immature ou transcrit primaire. Ce dernier va alors subir une maturation qui consiste en l'ajout d'une coiffe à son extrémité 5'-phosphate, d'une queue polyadénylée à son extrémité 3'-OH et en l'épissage des introns, les parties non codantes du gène transcrit. Une fois cette maturation accomplie, les ARNm matures peuvent sortir du noyau où ils seront pris en charge par les ribosomes présents à la surface du RE rugueux (REr), afin d'être traduits en protéines.

Les protéines membranaires s'insèrent dans la bicouche lipidique dès le RE. Ce phénomène, appelé translocation, se fait de façon cotraductionnelle. En effet, la présence d'une séquence signal hydrophobe sur la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et sa reconnaissance par une particule ribonucléoprotéique, le SRP (Signal-Recognition Particle) va former un complexe ribosome-chaîne naissante-SRP. Ce complexe va alors migrer vers la membrane du RE et s'y fixer *via* le récepteur SRP. Cette liaison permet l'interaction entre le ribosome et le complexe Sec61, qui assure le passage du segment protéique néosynthétisé dans la membrane du RE, au sein du tunnel de translocation ou translocon, formé par le complexe Sec61 (Rapoport, 2008). Les domaines cytosoliques de la protéine en cours de synthèse restent dans le cytoplasme au niveau de la jonction ribosome-tunnel, et les domaines luminaux se retrouvent dans la lumière du RE. Les segments hydrophobes néosynthétisés vont alors se déplacer par une diffusion latérale du translocon à la membrane du RE, après l'ouverture du complexe de translocation (Van den Berg *et al.*, 2004). Suivant la localisation cytosolique ou luminale des extrémités N- et C-terminales du premier segment transmembranaire (TM) synthétisé, l'insertion de la protéine ne se déroule pas de la même façon (Rapoport *et al.*, 2004). Ces deux processus sont décrits dans la Figure 13.

Translocation de l'extrémité N-terminale du 1^{er} segment transmembranaire



Translocation de l'extrémité C-terminale du 1^{er} segment transmembranaire

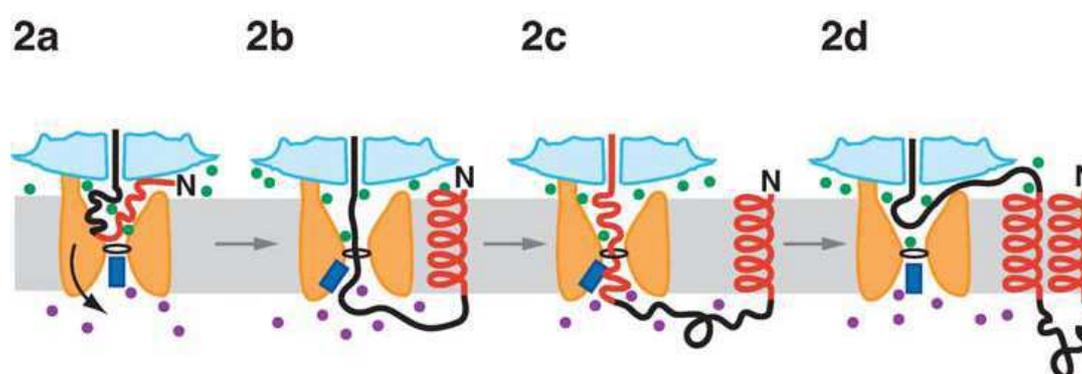


Figure 13 : Mécanismes de translocation des protéines membranaires

(1a et 1b) Une fois le premier segment transmembranaire (TM, rouge) d'une protéine membranaire synthétisé par le ribosome, son extrémité N-terminale peut passer du feuillet externe au feuillet interne de la membrane du RE à travers le canal de translocation suite à un léger déplacement du bouchon (plug) pour se retrouver dans la lumière du RE. Le TM peut alors se positionner dans la bicouche lipidique grâce à ses propriétés hydrophobes. (1c et 1d) Le segment hydrophile suivant (noir) se place dans le cytoplasme dans l'espace libre entre le ribosome et le translocon. Le TM suivant s'insère dans le canal, formant une boucle qui va déstabiliser la conformation « fermée » du canal, pousser le bouchon et ouvrir le canal, ce qui permet au second TM de se glisser dans la membrane du RE. De façon concomitante, le segment hydrophile suivant pénètre et traverse le canal pour se retrouver dans la lumière du RE.

(2a et 2b) Dans le cas où le premier TM serait trop court ou son extrémité N-terminale est chargée positivement ou repliée, le premier segment hydrophile (l'extrémité N-terminale) reste dans le cytoplasme. Le premier TM pénètre le canal sous forme de boucle et déstabilise la conformation « fermée » du canal. La traduction du segment hydrophile suivant se poursuit. L'extrémité C-terminale du premier TM passe alors du feuillet externe au feuillet interne de la membrane du RE, ce qui permet son insertion dans la bicouche du RE et la translocation du segment hydrophile dans la lumière du RE. (2c) L'extrémité N-terminale du TM suivant pénètre le canal et (2d) une fois sa synthèse achevée, ce TM s'insère dans la bicouche du RE, rétablissant la conformation « fermée » du canal (Osborne *et al.*, 2005).

2 - Repliement des protéines

Une fois intégrées dans la membrane du RE, les protéines vont subir des modifications post-traductionnelles dans cet organelle, afin d'acquérir la structure tertiaire qui leur permettra de sortir du RE et d'exercer leur fonction lorsqu'elles auront rejoint leur destination finale. Cette maturation, permettant le repliement des protéines, est effectuée par des protéines

chaperonnes localisées essentiellement dans la lumière du RE, mais également dans le cytoplasme (repliement des protéines transmembranaires).

Il existe trois groupes majeurs de chaperonnes :

- Les chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Proteins), parmi lesquelles on peut citer la plus abondante, la protéine BiP (Binding Protein) également appelée Grp78 (Glucose related protein 78), dont l'homologue chez la levure est Kar2p. Cette protéine est également l'élément central du contrôle qualité du RE (décrit dans le chapitre suivant).
- Les chaperonnes de type lectine, autre groupe très abondant du RE, telles que la calnexine et la calréticuline. Ces deux lectines jouent également un rôle dans le contrôle qualité du RE par la prise en charge des protéines N-glycosylées (Zhang *et al.*, 1997) en se fixant de manière spécifique sur des résidus glucose ou mannose.
- Les chaperonnes de la famille des PDI (Protein Disulfide Isomerase), telles que ERp57, en charge de la formation des ponts disulfures (Sevier and Kaiser, 2002) et également impliquées dans le contrôle qualité (Ellgaard *et al.*, 1999).

Le rôle de ces chaperonnes et de leur co-chaperonnes dans le repliement des protéines est un sujet complexe et très documenté que nous avons choisi de ne pas aborder dans ce manuscrit (pour revues (Fewell *et al.*, 2001; Trombetta and Parodi, 2003; Saibil, 2008; Wandinger *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013)).

3 - Contrôle qualité du RE

Les protéines membranaires ne peuvent quitter le RE pour l'appareil de Golgi que si leur repliement est correct. Or, l'efficacité de repliement varie d'une protéine à l'autre. En effet, seuls 20% des protéines CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) synthétisées sont correctement repliées, alors que 90% des protéines virales VSVG (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein) le sont (Aridor, 2007). Les protéines mal repliées ont tendance à s'agréger, ce qui perturbe la voie de sécrétion. Pour pallier à ces dysfonctionnements, il existe un contrôle qualité au sein du RE, dans lequel deux mécanismes complémentaires sont mis en œuvre : l'UPR (Unfolded Protein Response) prévient la surcharge des protéines mal repliées en corrigeant leur repliement, et l'ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) élimine les protéines ne pouvant être repliées correctement suite à un échec de l'UPR.

3a - L'UPR

L'UPR joue un rôle préventif dans le contrôle qualité du RE face à l'accumulation de protéines structurellement non-conformes, en corrigeant leur repliement et en limitant la synthèse protéique. D'autres facteurs, connus pour induire un stress du RE, activent cette réponse : la concentration calcique intraluminale, les problèmes de glycosylation, une carence en nutriment, l'infection par un pathogène ou encore le changement du potentiel redox du RE (Schroder, 2008).

L'UPR a été décrite pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en 1992, suite à la découverte de séquences *cis*-régulatrices (nommées plus tard UPR Elements, UPRE) sur le promoteur du gène codant pour la protéine chaperonne Kar2p. Les gènes *IRE1* et *HAC1*, indispensables à l'UPR, ont été identifiés en 1993 (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993) et 1996 (Cox and Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996), respectivement.

En condition normale, Ire1p, protéine transmembranaire dont le domaine cytoplasmique possède une fonction endonucléase, est liée à Kar2p (dont l'homologue humain est BiP), localisée dans la lumière du RE. Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, l'interaction entre ces deux protéines s'interrompt permettant à Kar2p d'exercer sa fonction de chaperonne, mais aussi la formation de dimères d'Ire1p, leur autophosphorylation et l'activation de leur domaine endonucléase. Les dimères Ire1p activés vont alors cliver l'ARNm de *HAC1*, codant pour un facteur de transcription, le rendant fonctionnel et permettant la synthèse de Hac1p. Ce facteur de transcription va alors pouvoir se fixer sur les UPRE de ses gènes cibles, parmi lesquels se trouvent des gènes codant pour des chaperonnes et notamment Kar2p, des gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération de la membrane du RE ou encore des gènes impliqués dans l'ERAD (Shen *et al.*, 2004). Ces étapes se déroulant chez la levure sont représentées dans la Figure 14.

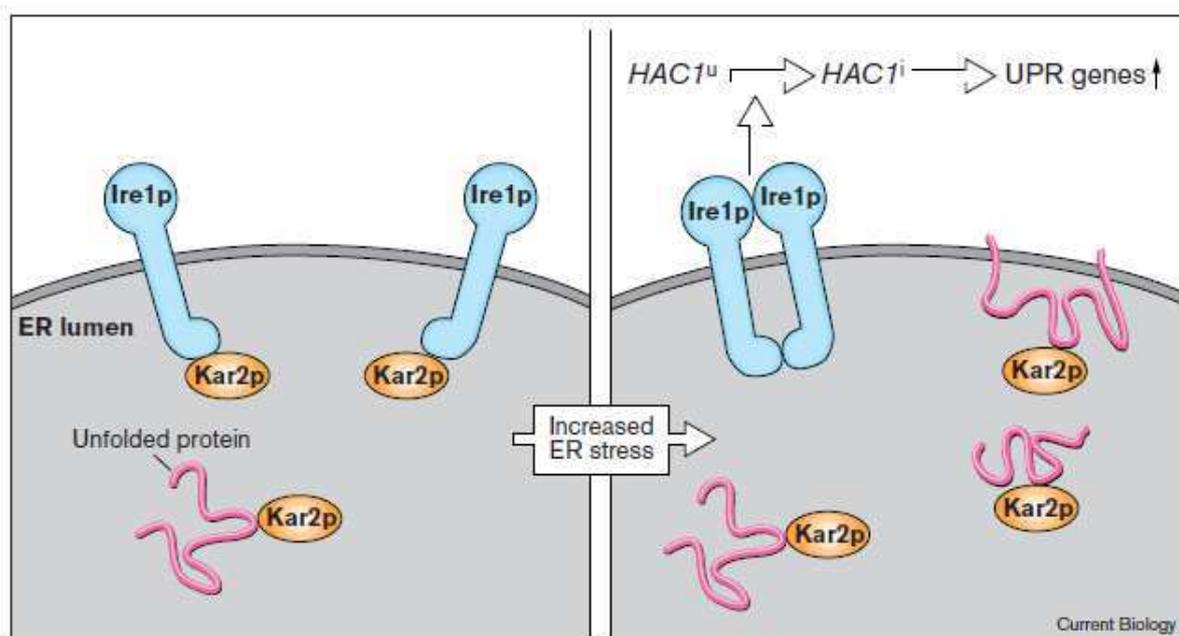


Figure 14 : Le déclenchement de l'UPR chez la levure

En condition normale, Kar2p est liée à Ire1p. En cas d'accumulation de protéines mal repliées (Unfolded protein) induisant un stress du RE, Kar2p se détache d'Ire1p pour aller se fixer aux protéines mal repliées. Ire1p se dimérise, s'autophosphoryle et clive l'ARNm *HAC1* (*HAC1^u*), le rendant fonctionnel (*HAC1ⁱ*) et permettant la synthèse du facteur de transcription Hac1p qui va alors activer l'expression des gènes de l'UPR dont certains vont aider au repliement des protéines ou limiter la synthèse protéique, et d'autres vont activer la dégradation protéique (Hampton, 2000).

L'UPR est beaucoup plus complexe chez les mammifères (Figure 15). Ces derniers possèdent deux homologues de la protéine Ire1p : IRE1 α et IRE1 β . Tout comme chez la levure, en présence de protéines mal repliées, IRE1 (inositol-requiring 1) se dissocie de BiP (immunoglobulin-binding protein, homologue fonctionnel de Kar2p), se dimérise, s'autophosphoryle, ce qui active son domaine endonucléase et permet le clivage de l'ARNm *XBPI* (X-box-binding protein, homologue fonctionnel de Hac1p). La protéine synthétisée à partir de cet ARNm épissé va alors pouvoir se fixer sur les UPRE localisés sur le promoteur de ses gènes cibles. A la différence de ce qui se passe chez la levure, l'ARNm non épissé *XBPI* est également traduit en une protéine moins stable que celle obtenue à partir de l'ARNm épissé, et ayant une activité de régulation négative des gènes impliqués dans l'UPR (Yoshida *et al.*, 2006). Il a été démontré en 2009 que ces ARNm non épissés sont responsables de l'arrêt de l'UPR, une fois le stress maîtrisé (Yoshida *et al.*, 2009).

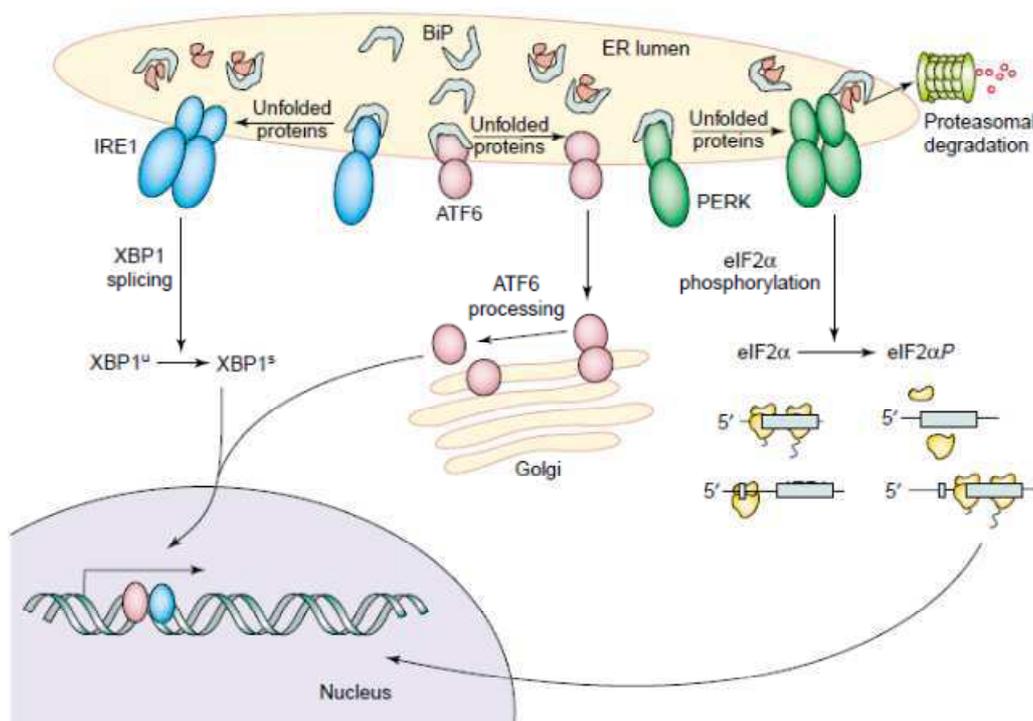


Figure 15 : Les différentes voies de l'UPR chez les mammifères

En condition normale, la protéine chaperonne BiP est liée aux trois protéines impliquées dans l'UPR : IRE1, ATF6 et PERK. En cas d'accumulation de protéines mal repliées (Unfolded proteins), BiP se dissocie de ces trois protéines pour aller se lier aux protéines mal repliées. Ceci a plusieurs conséquences : 1/ ATF6 migre jusqu'à l'appareil de Golgi où elle est clivée, libérant son segment cytoplasmique (ATF6 processing) qui va migrer jusqu'au noyau (Nucleus) pour activer la transcription des gènes de l'UPR dont *XBPI* ; 2/ en parallèle, IRE1 va se dimériser, s'autophosphoryler et cliver l'ARNm *XBPI* (XBPI splicing), le rendant fonctionnel et permettant la synthèse du facteur de transcription XBP1 impliqué dans la régulation positive des gènes impliqués dans l'UPR ; 3/ enfin, PERK va également se dimériser, s'autophosphoryler puis phosphoryler le facteur eIF2 α , impliqué dans la régulation négative globale de la traduction (Kaufman, 2004).

Chez les mammifères, l'UPR se caractérise par deux autres voies de régulation : l'une dirigée par ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et l'autre par PERK (Protein-kinase like Endoplasmic Reticulum Kinase). ATF6 est une protéine du RE, synthétisée de façon constitutive mais sous forme inactive, possédant un domaine transmembranaire dont la partie luminale est liée à BiP en condition normale et est sensible au stress du RE. En cas d'accumulation de protéines mal repliées, BiP se dissocie d'ATF6 (Shen *et al.*, 2002). Celle-ci est transportée du RE vers l'appareil de Golgi où elle est clivée par deux protéases résidentes, ce qui libère sa partie cytosolique nommée ATF6f. Cette dernière se dirige alors vers le noyau pour activer l'expression de gènes impliqués dans l'UPR, dont les gènes codant pour les chaperonnes BiP et PDI qui vont aider au bon repliement des protéines.

PERK présente beaucoup de similitudes par rapport à IRE1, tant au niveau structural que fonctionnel. Tout comme IRE1, PERK est une protéine transmembranaire du RE

présentant un domaine luminal lié à BiP en condition normale, et sensible au stress. Elle est capable de se dimériser et de s'activer par autophosphorylation. Ce qui la différencie d'IRE1 est sa capacité à phosphoryler une autre protéine : la sous unité α du facteur d'initiation de traduction 2, eIF2 α (eucaryotic initiation factor 2 α). La phosphorylation d'eIF2 α induit son inactivation partielle, qui a pour conséquence une diminution globale du taux de protéines synthétisées, susceptibles de s'accumuler dans le RE déjà saturé (Harding *et al.*, 1999).

3b - L'ERAD

Il arrive que l'UPR ne puisse pas canaliser totalement l'accumulation de protéines mal repliées. S'enclenche alors l'ERAD, un processus commun aux levures et à l'homme, permettant de dégrader une partie de ces protéines par un complexe protéique appelé protéasome. Cette dégradation est effectuée selon un mécanisme dépendant de l'ubiquitine, un peptide de 76 acides aminés (aa) très conservé chez les eucaryotes (avec plus de 96% d'homologie entre la levure et l'homme) qui, lorsqu'il est porté par une protéine, est reconnu comme un signal de dégradation.

L'ERAD débute par la reconnaissance de la protéine mal repliée au sein du RE et sa rétro-translocation dans le cytoplasme *via* le translocon Sec61p. Une fois dans le cytoplasme, ou du moins en partie, une première molécule d'ubiquitine va être ajoutée de façon covalente par une ubiquitine ligase, sur un résidu lysine du domaine C-terminal de la protéine cible. D'autres ubiquitines vont être rajoutées les unes à la suite des autres par des liaisons covalentes entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine libre et le résidu lysine 48 de l'ubiquitine précédente. Il faut au moins quatre ubiquitines pour que la protéine puisse être dégradée par le protéasome. Les complexes Cdc48 (chez la levure) et p97 (chez l'homme) catalysent la dislocation de la protéine, autrement dit son extraction complète de la membrane du RE. La protéine de conformation non native et étiquetée à son extrémité C-terminale par une queue ubiquitine va alors être acheminée vers le protéasome, situé dans le cytoplasme, pour y être dégradée (Figure 16).

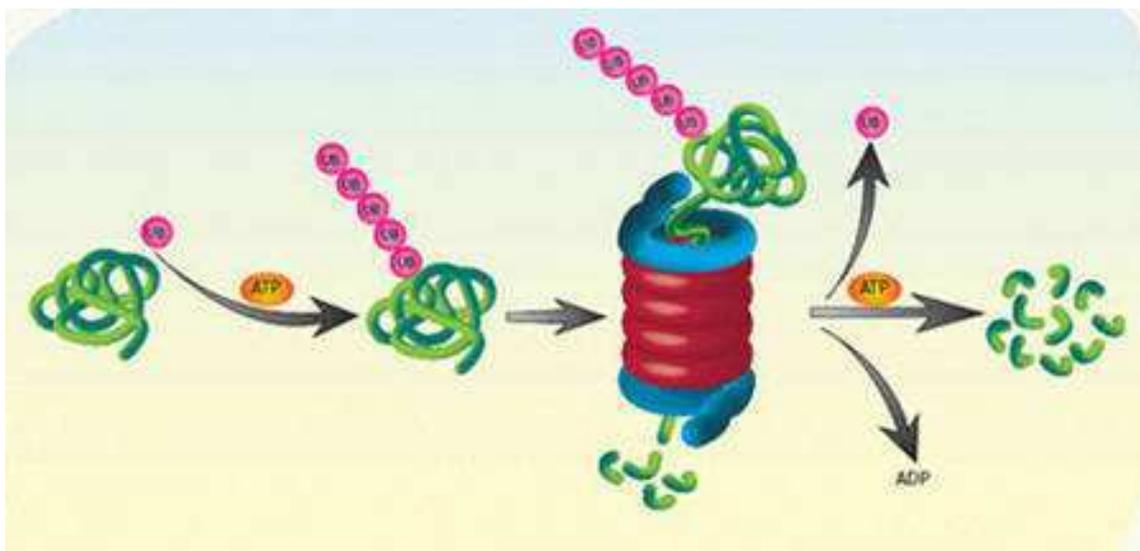


Figure 16 : Dégradation d'une protéine par le protéasome

La protéine à dégrader (en vert) est tout d'abord étiquetée par l'ajout d'une queue ubiquitine (en rose). La protéine ubiquitinylée peut alors être dégradée par le protéasome, un complexe multiprotéique utilisant l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate, en orange) en ADP (adénosine diphosphate) comme source d'énergie. D'après Weizmann Institute of Science.

4 - Transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi

Une fois les protéines membranaires correctement repliées, celles-ci sont acheminées vers l'appareil de Golgi *via* des vésicules formées par le bourgeonnement de la membrane du RE et recouvertes d'un manteau protéique spécifique de type COP II (Coat Protein complex, (Sato and Nakano, 2007)).

La vésiculation se déroule en trois étapes : la formation du manteau COP II, le bourgeonnement et enfin, la perte du manteau. Le manteau constitue la charpente de la vésicule en formation. Il se compose d'une couche protéique complexe et d'un récepteur sur lequel la protéine à transporter ou protéine cargo va se lier. Cette liaison se fait *via* une séquence protéique spécifique située sur la protéine cargo appelée « peptide de destination » et va entraîner la concentration du complexe protéine cargo-récepteur du manteau dans une zone spécifique de la membrane appelée « site de sortie ». Dans le cas d'une protéine soluble, l'ancrage de la protéine à la vésicule en formation est différent. Le « peptide de destination » de la protéine soluble se lie à un adaptateur qui se fixera à son tour au récepteur du manteau.

L'étape suivante, la formation d'une vésicule à partir de ce « site de sortie » par bourgeonnement, est amorcée par de petites molécules liant le GTP (guanosine triphosphate) de la famille des Arf/Sar et Rab. Situées sur la face cytosolique du manteau, après fixation

d'un GTP, elles recrutent des récepteurs (composants du manteau et spécifiques des protéines cargo), des enzymes modifiant les lipides (phospholipases, PI kinases), des protéines motrices et des golgines (protéines d'arrimage à l'appareil de Golgi). Ces protéines vont, à leur tour, recruter d'autres partenaires dont des protéines de fusion (telles que les SNARE). La vésicule se forme alors par fission, au cours de laquelle le bourgeon se sépare de la membrane du RE. Ces étapes ont été très étudiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et sont illustrées dans la Figure 17.

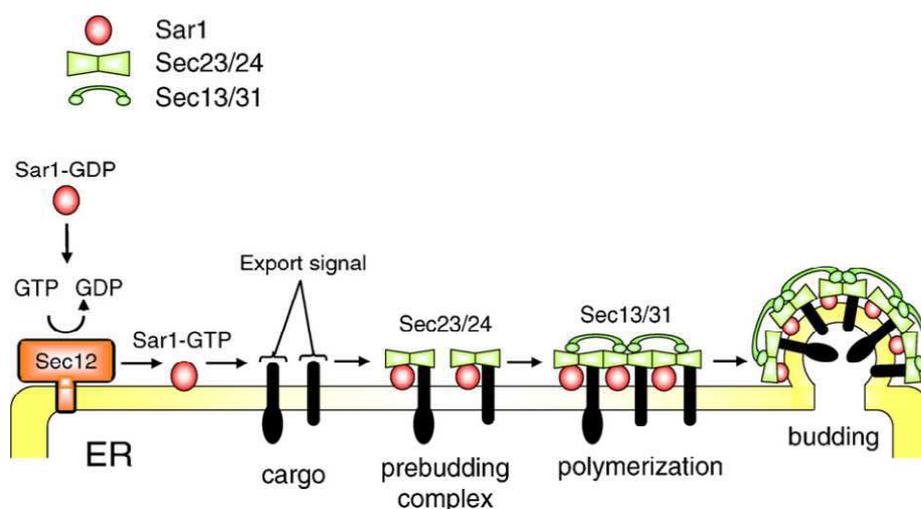


Figure 17 : Formation d'une vésicule COP II

La formation d'une vésicule COP II est initiée par l'échange d'un GDP contre un GTP sur la protéine Sar1, catalysée par un facteur d'échange transmembranaire Sec12. La protéine Sar1-GTP activée se lie à la membrane du RE et recrute les protéines Sec23/24. Le complexe Sar1-GTP-Sec23/24 va reconnaître et se lier au « peptide de destination » (export signal) d'une protéine cargo (prebudding complex). Plusieurs complexes Sar1-GTP-Sec23/24-cargo sont alors regroupés grâce aux protéines Sec13/31 (polymerization), donnant naissance à un bourgeon (budding) recouvert d'un manteau COP II et contenant des protéines cargo (Sato and Nakano, 2007).

Une fois la vésicule formée, l'hydrolyse du GTP en GDP (guanosine diphosphate) va entraîner la perte de son manteau COP II, dont les composants pourront être recyclés pour la formation d'une nouvelle vésicule. Enfin, les protéines cargo vont être transportées vers l'appareil de Golgi et y pénétrer par la fusion de la membrane de la vésicule avec la membrane acceptrice de l'appareil de Golgi. Cette étape de fusion fait essentiellement intervenir les protéines SNARE, associées aux protéines d'arrimage. Tout comme les protéines du manteau, une fois la fusion effectuées, les protéines SNARE vont pouvoir être recyclées pour une nouvelle fusion.

B - De l'appareil de Golgi à la membrane plasmique

L'appareil de Golgi est un organe polarisé, constitué d'un empilement de saccules membranaires aplatis, également appelés citernes. Les protéines cargo provenant du RE pénètrent l'appareil de Golgi par sa face *cis* puis migrent de saccule en saccule jusqu'à sa face *trans*, d'où elles pourront sortir et rejoindre leur destination finale (Figure 18). Le passage des protéines membranaires dans l'appareil de Golgi va permettre d'achever leur maturation par de nouvelles modifications post-traductionnelles : clivage de précurseurs polypeptidiques, glycosylation, sulfatation et phosphorylation.

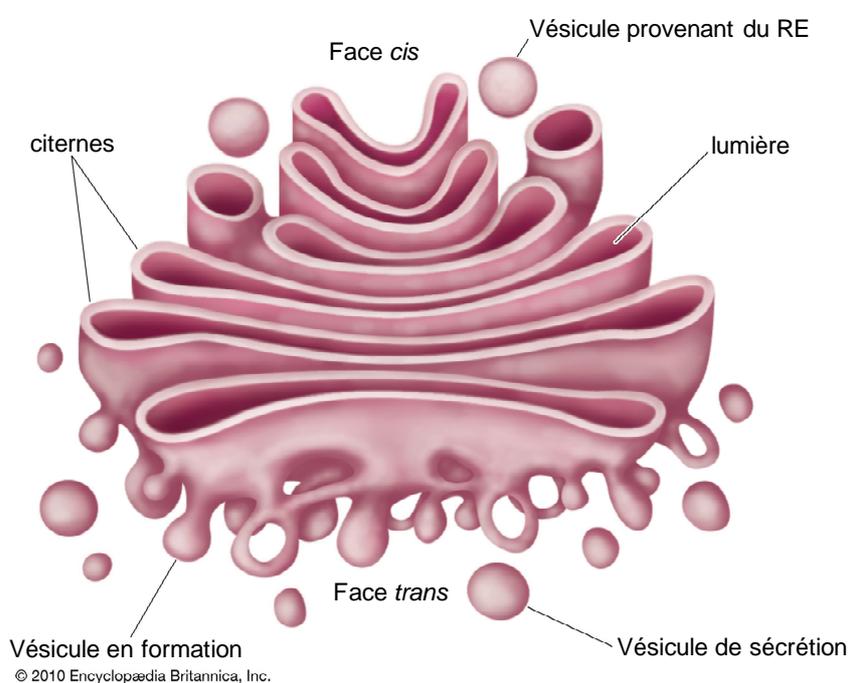


Figure 18 : Schéma représentatif de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est un organe polarisé. Sa face *cis* réceptionne les vésicules transportant les protéines cargos provenant du réticulum endoplasmique (RE), et sa face *trans*, constituant le réseau trans golgien (TGN), achemine les protéines cargos, après leur passage de citerne en citerne, vers leur destination finale par un système de vésicules. Source : Encyclopædia Britannica, 2010.

1 - Trafic au sein de l'appareil de Golgi

La communauté scientifique est partagée quant aux modalités de transport des protéines cargo au sein de l'appareil de Golgi. Deux écoles se distinguent : la première défendant le modèle du transport vésiculaire, et la seconde défendant le modèle de la progression des citernes. Dans le premier modèle, les différentes citernes sont des entités

stables. Le transport des protéines cargo se fait *via* des vésicules « navettes » recouvertes du manteau COP I, dont les fonctions et la formation sont similaires à celles du manteau COP II mais au sein de l'appareil de Golgi (décrit dans l'Introduction, I- A- 4- Transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi). Dans le second modèle, les vésicules provenant du RE fusionnent avec la membrane de la première citerne de la face *cis* de l'appareil de Golgi. Les protéines resteraient au sein de la membrane de la citerne. Cette dernière progresserait dans son intégralité vers la face *trans* de l'appareil de Golgi, recyclant, au fur et à mesure de sa progression, les enzymes par un mécanisme rétrograde faisant intervenir la machinerie COP I. Un modèle intermédiaire a été proposé selon lequel des « ponts » seraient créés entre les différentes citernes de manière transitoire, permettant la continuité de leur contenu luminal (Mironov *et al.*, 2005).

Au niveau de la face *trans* de l'appareil de Golgi, les protéines rejoignent un réseau bien organisé, formé d'un continuum de vésicules : le réseau *trans* Golgien ou TGN (*Trans-Golgi network*). Le TGN constitue la gare de tri de la cellule puisqu'à partir de ce réseau, les protéines pourront être dirigées vers des destinations multiples (membrane plasmique, endosomes, RE...).

2 - Contrôle qualité de l'appareil de Golgi

Il peut arriver que des protéines mal repliées échappent au contrôle qualité du RE. En effet, l'un des effets du déclenchement de l'UPR est la régulation positive des gènes impliqués dans le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. Ceci permet de libérer le RE d'une surcharge protéique mais permet également à certaines protéines structurellement non conformes de progresser dans la voie de sécrétion. Cependant, ces protéines de conformation non native peuvent être prises en charge de façon alternative par le contrôle qualité de l'appareil de Golgi. Ce dernier s'organise en deux mécanismes. Le premier consiste en un transport rétrograde des protéines vers le RE, faisant intervenir la machinerie COP I, où elles seront prises en charge et dégradées par la voie ERAD (Vashist *et al.*, 2001). Le second mécanisme consiste en l'envoi des protéines mal repliées vers la voie endosomale, d'où elles pourront être adressées à des lysosomes (ou à la vacuole chez la levure) pour y être dégradées.

3 - Transport vésiculaire vers la membrane plasmique

Une fois arrivées dans le TGN, les protéines peuvent être envoyées à la membrane plasmique selon deux modes de sécrétion. Si elles sont sécrétées de manière constitutive, les vésicules transportant ces protéines à la membrane se dirigent directement vers la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent et délivrent la protéine cargo. Si leur sécrétion est régulée par des signaux spécifiques, les protéines vont devoir être dirigées vers un endosome, au sein duquel elles seront stockées jusqu'à ce qu'elles soient sollicitées. Les vésicules se chargeant de l'envoi vers l'endosome sont, quant à elles, recouvertes d'un manteau de type clathrine.

Ces deux types de vésicules de sécrétion formés à partir du TGN ont été beaucoup étudiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et se distinguent d'une part par le type de protéines cargo qu'elles contiennent, et d'autre part par leur densité. On parle alors de vésicules de sécrétion de faible densité ou LDSV (light-density secretory vesicles), ou de vésicules de sécrétion de forte densité ou HDSV (heavy-density secretory vesicles) (Harsay and Bretscher, 1995; Gurunathan *et al.*, 2002; Harsay and Schekman, 2002).

Les LDSV transportent des protéines cargo destinées à la membrane plasmique, telles que l'ATPase majoritaire de la membrane plasmique de levure Pma1p ainsi que des protéines de la paroi cellulaire (Harsay and Bretscher, 1995). Les protéines cargo de ce type de vésicule, et en particulier Pma1p, peuvent être utilisées comme cible pour une immunoisolation des LDSV (Klemm *et al.*, 2009). L'isolement et l'analyse de ces dernières a permis de caractériser leur contenu lipidique riche en ergostérol et sphingolipides (Surma *et al.*, 2011), un contenu caractéristique des radeaux lipidiques.

Les HDSV, quant à elles, transportent les enzymes périplasmiques (localisées entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique) de type invertase ou phosphatase acide (Harsay and Bretscher, 1995). La génération de ce type de vésicule de sécrétion fait intervenir un manteau de type clathrine (Gurunathan *et al.*, 2002). Cependant, le contenu lipidique des HDSV n'est pas connu à ce jour. En effet, aucune protéine cargo n'a pu être identifiée comme étant une cible pour l'immunoisolement des HDSV (Surma *et al.*, 2011).

III - Importance des phospholipides dans la voie de sécrétion

Comme nous venons de le détailler, les protéines membranaires doivent cheminer le long de la voie de sécrétion, passant d'organite en organite, afin d'acquérir la structure native leur permettant d'exercer leur fonction une fois leur destination finale atteinte. Ces différents organites possèdent leur composition lipidique propre, qui leur confère des propriétés biophysiques adaptées à leur fonction dans la voie de sécrétion. En effet, alors que le RE présente une membrane relativement peu ordonnée, la membrane plasmique quant à elle, riche en cholestérol/ergostérol, sphingolipides et en PL saturés, arbore une structure plus ordonnée. Nous verrons dans ce nouveau chapitre qu'une altération du contenu phospholipidique des membranes engendre des perturbations tout au long de la voie de sécrétion.

A - L'homéostasie du RE

Des perturbations de l'homéostasie lipidique peuvent avoir des répercussions sur l'intégrité des organites, notamment celle du RE, et altérer leur fonctionnement. En effet, les protéines membranaires s'insèrent de façon cotraductionnelle dans la membrane du RE, où elles sont prises en charge par des chaperonnes qui aident à leur bon repliement. Lorsque ce repliement échoue et que des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, l'UPR se met en place afin de rétablir l'homéostasie de ce compartiment.

Une étude menée par notre équipe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a permis de démontrer qu'une accumulation d'AGS dans la cellule perturbe l'homéostasie du RE (Pineau *et al.*, 2009). La souche utilisée, *hem1Δ* (décrite plus en détail dans le chapitre Objectifs de l'étude, I- Comprendre l'implication des AGS sur la voie de sécrétion), présente une mutation permettant d'accumuler des AGS dans la cellule. L'étude de la souche a permis de montrer que l'accumulation d'AGS, qu'ils soient endogènes ou exogènes, induisait l'UPR par l'augmentation du taux de saturation des PL rendant la membrane du RE moins fluide. Il a également été montré que l'ajout d'ergostérol, l'équivalent du cholestérol chez la levure, agissait de façon synergique avec les AGS dans l'induction de l'UPR. Dans cette même étude, l'utilisation d'une chaperonne chimique prévenant l'agrégation de protéines mal repliées

(Kubota *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2007), le 4-PBA (4-phenyl butyrate) a permis d'abolir complètement l'UPR induite par l'accumulation d'AGS, indiquant que le stress du RE induit par les AGS s'accompagnait d'une accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Enfin, il a également été montré dans cette étude que si ce stress du RE était maintenu, il pouvait conduire à la mort des cellules. Cependant, l'équipe a également montré que l'ajout d'oléate (C18:1) permettait de contrer les effets des AGS sur l'UPR et la mort cellulaire, permettant de restaurer l'homéostasie du RE et la croissance normale des levures (Pineau *et al.*, 2009). Une large collection d'AG a par la suite été testée et a montré que seuls les AGMI et AGPI *cis* avaient cet effet correcteur sur l'UPR, l'AG le plus efficace étant l'oléate (Deguil *et al.*, 2011).

Ce phénomène de lipotoxicité liée aux AGS a également été décrit chez les mammifères, dans les cellules β (Karaskov *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008; Diakogiannaki *et al.*, 2008). L'exposition de ces cellules aux AGS, et en particulier au palmitate (C16:0), induit les 3 voies de signalisation de l'UPR (IRE1, ATF6 et PERK décrites dans le chapitre Introduction, II- A- 3a- L'UPR) et conduit à l'apoptose des cellules β (Karaskov *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008). Néanmoins, ce stress du RE induit par le palmitate peut être corrigé, tout comme chez la levure par l'ajout d'AGI tels que l'oléate (C18:1) (Cunha *et al.*, 2008) ou le palmitoléate (C16:1) (Diakogiannaki *et al.*, 2008).

B - Formation des vésicules

Les vésicules, permettant le transport des protéines membranaires d'organite en organite jusqu'à la membrane plasmique, sont constituées d'une bicouche lipidique. Le contenu en AG des PL constituant la bicouche est essentiel puisqu'il détermine la forme du PL (conique ou cylindrique, Figure 6) et module les propriétés biophysiques des membranes (décrit dans le chapitre Introduction, I- A- 1c- Impact du contenu en AG des PL sur les propriétés biophysiques des membranes). Ainsi, les AGS auront tendance à rigidifier/ordonner les membranes alors que les AGI *cis* auront tendance à les fluidifier/désordonner.

Deux mécanismes sont essentiels pour la formation des vésicules et font intervenir deux types de protéines. Le premier de ces mécanismes est le recrutement des protéines Arf/Sar du manteau, qui induisent la courbure de la membrane pour former un bourgeon. Ces

protéines, une fois activées (voir Introduction, chapitre II- B- 3- Transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi), exposent une hélice amphipathique dont la face hydrophobe s'insère entre les chaînes carbonées des PL, et la face polaire interagit avec la tête polaire des PL. L'insertion de nombreuses protéines Arf/Sar sur le feuillet externe de la membrane, induit un écartement entre les têtes polaires des PL et donc l'expansion de la surface du feuillet externe, alors que celle du feuillet interne ne change pas. Pour compenser cette asymétrie, le feuillet interne se bombe, créant ainsi une courbure de la membrane (Lee *et al.*, 2005). Les protéines Arf/Sar vont alors recruter les autres protéines constitutives du manteau et nécessaires à la formation de la vésicule. Cependant, une fois la vésicule formée, celle-ci doit se défaire de son manteau, qui est un obstacle à sa fusion avec la membrane du compartiment cible. Les protéines Arf/Sar doivent donc être désactivées. Cette désactivation constitue la seconde étape importante de la formation des vésicules. Dans le cas de vésicules de type COP I (formées au niveau de l'appareil de Golgi de la même façon que les vésicules COP II dans le RE : voir Introduction, II- A- 4- Transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi), la désactivation de Arf s'effectue par le recrutement de la protéine ArfGAP1 (Arf GTPase Activating Protein 1), qui va hydrolyser le GTP porté par Arf en GDP (Tanigawa *et al.*, 1993). ArfGAP1, contrairement à Arf qui induit une courbure de membrane, est un senseur de la courbure membranaire. En effet, Joelle Bigay et ses collaborateurs ont montré dans une étude *in vitro* publiée en 2003, que la dépolymérisation du manteau COP I par ArfGAP1 était très rapide lorsqu'il recouvrait des liposomes dont le diamètre était proche de celui des vésicules (≈ 60 nm) et que la réaction était beaucoup plus lente lorsque les liposomes étaient plus grands (Bigay *et al.*, 2003). Ainsi, l'efficacité d'ArfGAP1, nécessaire dans la finalisation du processus de vésiculation, dépend de la courbure de la membrane.

La découverte de deux motifs ALPS (Amphipathic Lipid Packing Sensors) sur la protéine ArfGAP1 a permis de comprendre comment cette protéine reconnaissait la courbure des membranes (Bigay *et al.*, 2005; Mesmin *et al.*, 2007). En effet, ces motifs ALPS présentent une hélice amphipathique, non structurée en milieu aqueux et interagissant avec les membranes courbées par la formation d'une hélice (Figure 19). Contrairement aux hélices amphipathiques des Arf/Sar, cette hélice n'induit pas de courbure de la membrane mais la détecte. L'interaction des motifs ALPS dépend alors uniquement de l'insertion de sa face hydrophobe entre les lipides. Cette interaction ne devient forte que si la courbure induit un espacement suffisant entre les têtes polaires des PL (Drin *et al.*, 2009). Autrement dit, plus que la courbure de la membrane *per se*, un « loose lipid packing » est le paramètre

déterminant pour le recrutement d'ArfGAP1. Celui-ci peut être obtenu, soit en augmentant la courbure de façon « mécanique » (par exemple, par le recrutement de Arf/Sar), soit en introduisant des lipides coniques dans la bicouche (voir chapitre Introduction, I- A- 1c- Impact du contenu en AG des PL sur les propriétés biophysiques des membranes).

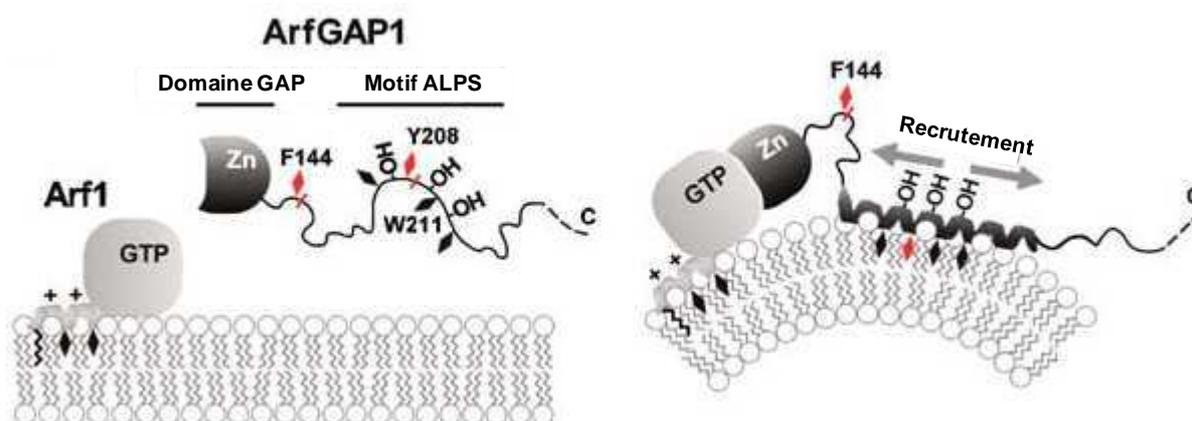


Figure 19 : Recrutement de la protéine ArfGAP1 par la vésicule en formation

La protéine ArfGAP1 ne peut se fixer sur une membrane non courbée (image de gauche). Le recrutement et l'activation de Arf1 va induire la courbure de la membrane. Lorsque celle-ci est suffisante, ou lorsqu'il y a « loose lipid packing », les résidus hydrophobes du motif ALPS de ArfGAP1 pourront se structurer en hélice et s'insérer dans la membrane de la vésicule en formation (image de droite). Modifiée d'après (Bigay *et al.*, 2005).

C - Trafic des protéines membranaires

Une homéostasie lipidique perturbée peut impacter le trafic des protéines membranaires. Au sein de notre laboratoire, les effets des AGS sur ce trafic ont été étudiés chez la souche *hem1Δ* de levure (décrite plus en détail dans le chapitre Objectifs de l'étude, I- Comprendre les effets des AGS sur la voie de sécrétion), permettant d'accumuler des AGS, avec, pour protéine modèle, la perméase à uracile Fur4p. Cette étude a montré que Fur4p, en conditions d'accumulation d'AGS, n'était pas localisée à la membrane plasmique (Pineau *et al.*, 2008). Ce défaut de localisation membranaire résulte de l'envoi de Fur4p à la vacuole, directement après sa sortie de l'appareil de Golgi, sans passer par la membrane plasmique. L'accumulation d'AGS empêche donc Fur4p de passer le contrôle qualité de l'appareil de Golgi. Néanmoins, l'utilisation de l'oléate (C18:1) permet de contrecarrer les effets des AGS sur le trafic de Fur4p et de restaurer son acheminement à la membrane plasmique (Pineau *et al.*, 2008). Dans cette même étude, le trafic de Pma1p, une autre protéine membranaire modèle, n'a pas été perturbé par l'accumulation d'AGS dans la souche *hem1Δ*. Ceci suggère que toutes les protéines membranaires ne sont pas touchées de la même façon par

l'accumulation d'AGS et que l'envoi de Fur4p à la vacuole ne résulte pas d'un blocage complet de la voie de sécrétion par les AGS.

L'impact des AGS sur le trafic des protéines a également été étudié dans la lignée cellulaire MIN6, issue de cellules β de souris, par Preston et ses collaborateurs en 2009. Ces cellules ont été transfectées avec la protéine de fusion thermosensible VSVG-GFP (VSVG-Green Florescent Protein) puis incubées avec du palmitate afin d'étudier le transport de VSVG-GFP du RE à l'appareil de Golgi (Preston *et al.*, 2009). En effet, à 40 °C, la protéine VSVG-GFP est retenue dans le RE, alors qu'à 32 °C, elle peut s'en échapper et cheminer dans la voie de sécrétion. Cette étude a montré que le palmitate réduisait considérablement le trafic de VSVG-GFP du RE vers l'appareil de Golgi. Ce défaut de trafic vers l'appareil de Golgi entraîne la rétention de protéines dans le RE, induisant une surcharge protéique dans ce compartiment. Ces protéines, qui ne sont pas forcément mal repliées mais ralenties dans leur trafic vers l'appareil de Golgi, participent au déclenchement de l'UPR et au stress du RE induit par le palmitate.

Les radeaux lipidiques jouent également un rôle important dans le trafic des protéines. Ces derniers, riches en sphingolipides et en cholestérol, sont localisés majoritairement à la membrane plasmique, mais ont également été identifiés dans le RE (Browman *et al.*, 2006) où ils interviennent dans l'entrée de protéines cargos dans la voie de sécrétion (Bagnat *et al.*, 2000). En effet, il a été montré que la déplétion du cholestérol bloque le trafic des protéines cargos du RE vers l'appareil de Golgi (Campana *et al.*, 2006). Cette déplétion, observée dans les cellules β après exposition au palmitate (qui sera décrit plus tard dans ce manuscrit, dans le chapitre Introduction, IV- A- 3- Rôle des AGS dans le développement du diabète de type 2), contribue également à la surcharge protéique du RE et au déclenchement de l'UPR (Boslem *et al.*, 2013).

D - Stabilité des protéines

Une membrane est formée de deux régions : une région hydrophobe, constituée des chaînes aliphatiques des PL d'environ 30 Å, et une région d'interface avec l'environnement hydrophile constituée des têtes polaires des PL associées à des molécules d'eau, d'environ 15 Å. Il existe donc un gradient de polarité du centre vers les extrémités de la membrane, la zone la plus apolaire et hydrophobe se trouvant en son centre (Figure 20).

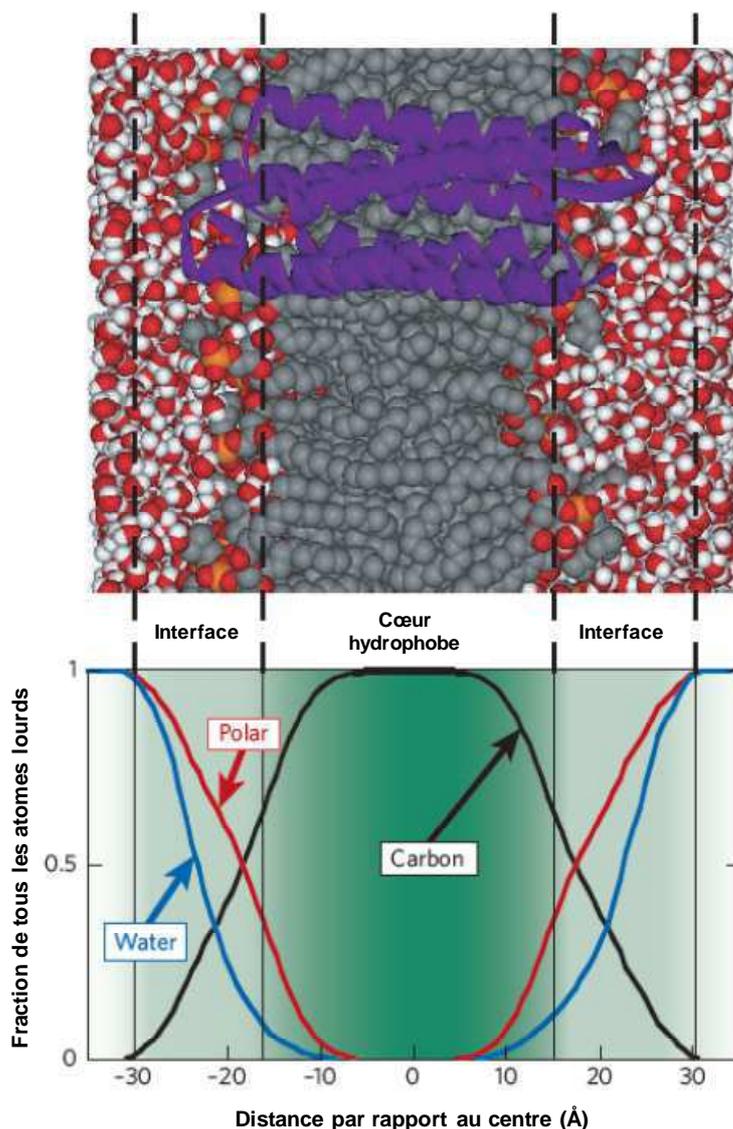


Figure 20 : Polarisation de la bicouche lipidique

La modélisation d'une protéine transmembranaire (la bactériorhodopsine) est représentée sur le panneau supérieur, au sein d'une bicouche lipidique composée de phosphatidylcholines (PC) comportant des acides gras monoinsaturés à 16 et 18 atomes de carbone. Les différentes zones de la bicouche sont représentées dans le diagramme du panneau inférieur. Les chaînes d'acides gras (à partir du carbone 2) constituent le cœur hydrophobe de la bicouche. L'interface, dont la ligne correspond aux fonctions carbonyles des acides gras, est constituée du squelette glycérol-choline (ligne rouge) de la tête polaire des PC interagissant avec des molécules d'eau (ligne bleue), qui donne lieu à une phase polaire très structurée. Modifiée d'après (Bowie, 2005).

Un paramètre déterminant pour le repliement des protéines découle de cette hydrophobicité. Il s'agit de l'« hydrophobic mismatch » (Figure 21) (Killian, 1998; Bowie, 2005). Si le segment transmembranaire hydrophobe de la protéine est plus long que la bicouche lipidique n'est épaisse, celui-ci va entrer en contact avec les molécules d'eau environnantes (Figure 21, panneau de gauche). De même, si le segment transmembranaire est plus court que l'épaisseur de la bicouche, ce sont les chaînes aliphatiques de la bicouche qui

se retrouveront au contact des molécules d'eau (Figure 21, panneau de droite). Dans les deux cas, le contact des domaines hydrophobes avec un environnement aqueux crée une situation thermodynamiquement instable devant être compensée soit par une déformation de la membrane pour adopter l'épaisseur du segment transmembranaire, soit par un réajustement du repliement de la protéine pour adopter l'épaisseur de la membrane.

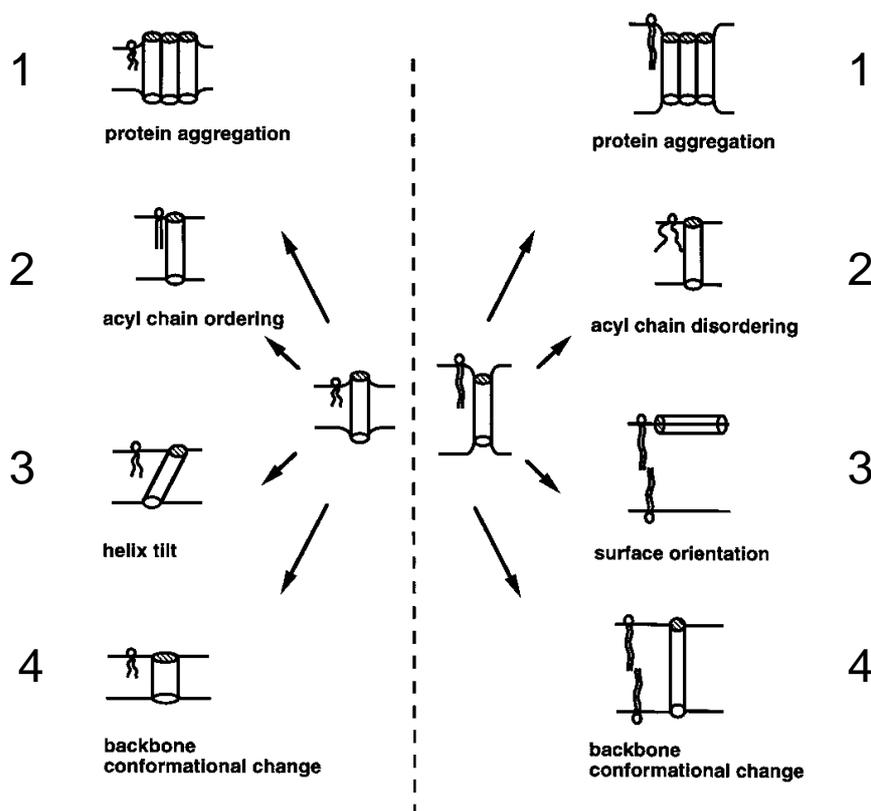


Figure 21 : L'hydrophobic mismatch

Lorsqu'un segment transmembranaire (TM) d'une protéine est plus long que l'épaisseur de la bicouche (panneau de gauche), l'exposition du TM à l'environnement aqueux peut être évité par plusieurs mécanismes : la protéine peut s'agréger pour diminuer la zone de contact avec l'eau (1), changer son orientation dans la membrane (3), ou encore modifier son squelette carboné de façon à l'adapter à l'épaisseur de la membrane (4). Une membrane plus ordonnée peut également réduire cette différence de taille (2). Dans le cas où la membrane est plus épaisse que le TM (panneau de droite), les chaînes des AG se retrouvent en contact avec l'eau environnante. Les mêmes mécanismes décrits précédemment peuvent être mis en place tels que l'agrégation (1), la réorganisation du squelette carboné (4) ou encore la fluidification de la membrane pour en diminuer l'épaisseur (2). Si le TM est amphiphile, il peut basculer à la surface de la membrane, sa face polaire exposée à l'eau environnante et sa face hydrophobe en contact avec la partie la plus externe des AG (3) (Killian, 1998).

Dans le cas des protéines possédant un domaine transmembranaire en tonneau β (Figure 11), c'est la bicouche lipidique qui s'adapterait principalement en étirant ou en compactant les lipides les plus proches de la protéine (O'Keeffe *et al.*, 2000), les lipides impliqués étant surtout de forme conique (Hong and Tamm, 2004), de par leur tendance à

former des zones de courbure (Figure 21-2, panneau de droite). Dans le cas où le segment transmembranaire serait une hélice α (Figure 11), deux mécanismes ont été proposés : dans la première hypothèse, l'hélice α s'étirerait ou se compacterait par la rotation de ses chaînes latérales autour de la liaison C α -C β (liant la chaîne latérale au cytosquelette polypeptidique, Figure 21-4, panneaux de gauche et de droite). Ainsi, la rotation d'un résidu tyrosine autour de cet axe permettrait de faire varier la longueur de l'hélice α de 3 Å (Mall *et al.*, 2000). Dans la seconde hypothèse, l'hélice α bascule dans sa totalité, dans le cas d'une bicouche moins épaisse que le segment transmembranaire (Figure 21-3, panneau de gauche). Enfin, l'oligomérisation des segments transmembranaire a également été proposée comme mécanisme compensatoire de l'« hydrophobic mismatch », en réduisant la surface exposée des protéines (Figure 21-1, panneaux de gauche et de droite) (Killian, 1998; Botelho *et al.*, 2006).

La composition lipidique influence également un autre paramètre jouant sur la stabilité des protéines membranaires : le stress de courbure (Figure 22, (Gruner, 1985; Hui and Sen, 1989; Tate *et al.*, 1991)). Pour la formation d'une bicouche, les lipides doivent avoir une forme cylindrique, le rayon de leur tête polaire étant sensiblement égal à celui de leur queue hydrophobe. Cependant, pour certains PL, leur queue hydrophobe a tendance à s'évaser leur conférant une forme conique. C'est le cas de la PE, dont la tête polaire est de petite taille, et des PL comportant au moins un AGI *cis* (voir chapitre Introduction, I- A- 1c- Impact du contenu en AG des PL sur les propriétés des membranes).

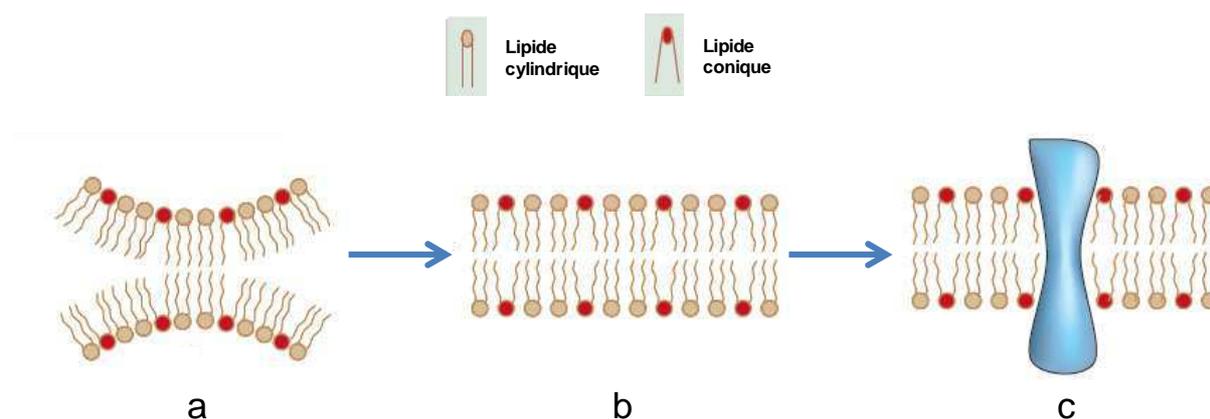


Figure 22 : Le stress de courbure

Dans un mélange de PL cylindriques et coniques, les deux feuilletts de la membrane ont tendance à s'éloigner l'un de l'autre (a). La force permettant de rétablir une bicouche classique est nommée stress de courbure (b). Ce stress va appliquer une pression latérale sur les domaines transmembranaires des protéines intégrées qui sera d'autant plus forte que le taux de PL coniques sera important (c). Modifiée d'après (Bowie, 2005).

De façon générale, la présence de PL de type conique dans une membrane a tendance à écarter les deux feuillets lipidiques l'un de l'autre (Figure 22a). Afin de maintenir la structure en bicouche, une force est mise en place donnant lieu à une bicouche « frustrée » (Figure 22b) par le stress de courbure qui augmente le compactage des chaînes aliphatiques des PL. Ce stress va appliquer une pression latérale au niveau des domaines transmembranaires des protéines présentes dans la membrane, qui augmentera avec le taux de PL coniques (Figure 22c). Ce phénomène n'améliore pas l'efficacité du repliement des protéines au sein de la bicouche (en termes de taux et de vitesse de repliement). En revanche, il augmente la stabilité des protéines dans cette dernière (Allen *et al.*, 2004; van den Brink-van der Laan *et al.*, 2004).

E - Activité des protéines

L'environnement lipidique immédiat d'une protéine influence son activité. Parmi ces lipides, il faut distinguer les lipides annulaires, formant un « anneau » autour de la protéine, l'isolant de l'ensemble de la bicouche (Lee, 2003) et les lipides non-annulaires qui interagissent de manière très spécifique avec les protéines membranaires et sont généralement essentiels à leur activité.

Les lipides annulaires forment une sorte de barrière/frontière entre la protéine membranaire et les autres lipides de la membrane. Ils sont notamment impliqués dans l'adaptation à l'« hydrophobic mismatch » (voir chapitre précédent), paramètre critique pour l'activité des protéines possédant plusieurs segments transmembranaires, qui nécessite une certaine épaisseur de la bicouche. L'activité optimale des protéines membranaires, pour la majorité des protéines étudiées, est obtenue avec des bicouches composées de PL contenant des AG à 18 carbones (C18), reflétant la longueur moyenne des AG retrouvée dans les membranes biologiques (Lee, 2004). Les variations de l'épaisseur de la bicouche induisent une baisse de l'activité des protéines membranaires, mais n'affectent pas toutes les protéines de la même façon. Par exemple, ces variations peuvent entraîner des modifications du niveau de phosphorylation de la protéine et altérer sa capacité à changer de conformation durant son cycle catalytique (Starling *et al.*, 1995; Starling *et al.*, 1994). Ces variations de l'épaisseur de la bicouche peuvent également jouer sur l'affinité de la protéine membranaire pour son substrat (Pilot *et al.*, 2001).

Les lipides non-annulaires sont généralement essentiels à l'activité des protéines membranaires et sont considérés comme des cofacteurs. Leur association aux protéines, soit entre les hélices α des domaines transmembranaires, soit aux interfaces protéine-protéine dans les complexes multiprotéiques (Lee, 2004), est telle qu'ils peuvent être co-purifiés avec celles-ci et apparaître sur les structures à haute résolution obtenues par cristallographie aux rayons X (Lee, 2003). Parmi ces lipides non annulaires, on peut citer le cholestérol et les PG (phosphatidylglycérol). Prenons l'exemple de l'implication du cholestérol dans l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. L'activité maximale de cette protéine est obtenue dans des membranes composées de PL à AG contenant 22 atomes de carbones (notés C22) en absence de cholestérol, et C18 en présence de cholestérol, ce dernier induisant un épaissement de la bicouche (Cornelius *et al.*, 2001). Cependant, l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase est considérablement plus importante lorsqu'elle est insérée dans une membrane composée de PC(18:1/18:1) en présence de cholestérol, que dans une membrane composée de PC(22:1/22:1) en absence de cholestérol. Ceci démontre l'importance du cholestérol pour l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, indépendamment de l'épaisseur de la membrane.

IV - Pathologies liées à la dérégulation de l'homéostasie lipidique : cas des AG

A - Le diabète de type 2

1 - Généralités

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique caractérisée par un trouble du métabolisme du glucose. Cette maladie touche près de 347 millions de personnes dans le monde, dont près de 3 millions en France, généralement âgées de plus de 40 ans.

Le glucose est utilisé par l'organisme comme source d'énergie. Les cellules peuvent assimiler le glucose grâce à une hormone produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, l'insuline. Chez les individus atteints de DT2, les cellules deviennent peu à peu résistantes à l'insuline. Elles n'assimilent plus le glucose et celui-ci s'accumule dans le sang, conduisant à une hyperglycémie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L de sang. En réponse à cette hyperglycémie due à l'insulinorésistance des cellules consommatrices de glucose, les cellules β vont augmenter leur sécrétion d'insuline afin de rétablir une glycémie normale. Cette augmentation de l'activité sécrétrice va peu à peu épuiser les cellules β , entraînant la diminution de la production d'insuline, puis une hyperglycémie et, à terme, l'installation du DT2.

2 - L'obésité, un facteur de risque

L'obésité est l'un des facteurs de risque majeurs de développement de DT2. En effet, 80% des individus diabétiques présentent une surcharge pondérale. Il a été proposé depuis plusieurs années qu'une alimentation riche en AGS favoriserait le développement du DT2 (Paolisso *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 2004). Même si l'étiologie du DT2 reste encore évasive, la communauté scientifique admet tout de même que l'accumulation de lipides dans les tissus non adipeux, tels que les muscles squelettiques, le foie et les cellules β pancréatiques, contribue au dysfonctionnement de ces organes (Kahn *et al.*, 2006). Chez les individus obèses, les acides gras apportés par l'alimentation, majoritairement saturés lorsqu'ils proviennent d'une source animale, vont être préférentiellement utilisés comme

source d'énergie par les cellules musculaires. Le glucose n'étant plus consommé, une hyperglycémie va s'installer, entraînant la suractivité des cellules β . Celles-ci s'épuisent, perdent leur capacité à détecter le glucose et deviennent donc insulino-résistantes, ce qui engendre une diminution de la sécrétion d'insuline. A plus long terme, les cellules β finissent par mourir par apoptose, réduisant ainsi la masse de cellules β et rendant impossible le maintien d'une glycémie normale en raison d'une quantité insuffisante d'insuline sécrétée (Weir and Bonner-Weir, 2004).

3 - Rôle des AGS dans le développement du diabète de type 2

Les mécanismes reliant l'excès d'AGS et la mort des cellules β ont beaucoup été étudiés durant ces dix dernières années. En 2004, Ozcan et ses collaborateurs ont montré que l'obésité induisait un stress du RE dans les cellules hépatiques et adipeuses (Ozcan *et al.*, 2004). Les cellules β , du fait de leur activité intense de synthèse et de sécrétion d'insuline, sont très sensibles au stress du RE (Araki *et al.*, 2003; Harding and Ron, 2002). C'est pourquoi Karaskov et son équipe se sont intéressés aux effets d'une exposition chronique des cellules β aux AG. Cette étude a montré que le traitement chronique des cellules β par de fortes concentrations d'oléate (C18:1, AGI) ou de palmitate (C16:0, AGS) induisait l'apoptose de ces cellules, mais que seul le palmitate induisait le déclenchement de l'UPR *via* l'activation des voies PERK et IRE1 (voir Introduction, II- A- 3a- L'UPR), traduisant un stress du RE (Karaskov *et al.*, 2006). Quelques années plus tard, Cunha et ses collaborateurs ont montré que le stress du RE induit par les AGS dans les cellules β s'accompagnait d'une déplétion des stocks calciques du RE, et que la voie ATF6 était également induite dans les cellules β exposées au palmitate, mais que seules les voies IRE1 et PERK étaient impliquées dans le déclenchement de l'apoptose (Cunha *et al.*, 2008). Néanmoins, cette lipotoxicité liée au palmitate, peut être corrigée par des AGMI tels que le palmitoléate (C16:1) (Diakogiannaki *et al.*, 2008) ou l'oléate (C18:1) (Dhayaal and Morgan, 2011), qui régulent de façon antagoniste la voie PERK en diminuant la phosphorylation du facteur eIF2 α (Diakogiannaki *et al.*, 2008).

S'il est reconnu que les AGS sont les initiateurs de la mort par apoptose des cellules β médiée par un stress du RE, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore peu compris. Une étude récente, menée par Boslem et ses collaborateurs, a montré que le prétraitement des

cellules β avec du palmitate altère la composition et la distribution des radeaux lipidiques du RE (Boslem *et al.*, 2013). En effet, l'incubation des cellules β avec du palmitate entraîne une augmentation des céramides ainsi qu'une diminution du cholestérol et des espèces insaturées de sphingomyéline dans le RE, induisant un blocage du trafic vésiculaire du RE vers l'appareil de Golgi (Campana *et al.*, 2006) et l'accumulation des protéines cargos dans le RE (Preston *et al.*, 2009; Veret *et al.*, 2011). Cette étude a également montré un taux de formation de vésicules réduit après l'ajout du palmitate, contribuant également à la surcharge protéique à l'origine du stress du RE et au déclenchement de l'apoptose des cellules β (Boslem *et al.*, 2013).

B - La mucoviscidose

1 - Origine de la maladie

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive, touchant essentiellement les populations d'origine caucasienne. En Europe, son incidence se situe entre 1/8000 et 1/10000 individus. La mucoviscidose affecte les tissus épithéliaux de nombreux organes tels que les poumons, le pancréas, le foie, l'intestin grêle et l'appareil reproducteur par la production massive d'un mucus visqueux obstruant les différents canaux/conduits de ces organes (Welsh and Smith, 1995). Les glandes sudoripares des patients atteints de mucoviscidose, que nous qualifierons dans ce manuscrit de patients CF (pour Cystic Fibrosis, traduction anglaise de fibrose kystique, nom donné à la mucoviscidose lors de sa découverte), sont également touchées et sécrètent une sueur anormalement riche en ions chlorure (Gibson and Cooke, 1959). Le dosage des ions chlorure dans la sueur dans les premiers jours de vie du nourrisson constitue d'ailleurs l'un des tests permettant de diagnostiquer la maladie. Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), le test est positif pour une concentration supérieure à 60 mmol/L, la concentration normale étant inférieure à 40 mmol/L.

Des mutations du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), identifié en 1989 (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989) et codant pour un canal chlorure localisé à la membrane plasmique, sont responsables de cette maladie. Plus de 1900 mutations de ce gène ont été listées à ce jour et sont disponibles dans une banque de données en ligne (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). Celles-ci sont répertoriées en sept classes selon les effets de la mutation sur la protéine CFTR. La mutation la plus commune, retrouvée

sur au moins un allèle chez près de 90% des individus atteints de mucoviscidose, est une mutation de classe II perturbant la maturation de la protéine. Il s'agit de la délétion de la phénylalanine située à la position 508 de la chaîne polypeptidique et donnant lieu au mutant F508del-CFTR.

1a - Le CFTR

Le CFTR est une glycoprotéine composée de 1480 aa pour un poids moléculaire de 170 kDa. Bien que sa structure n'ait pas encore été élucidée à ce jour, la comparaison de sa séquence polypeptidique à celle d'autres protéines membranaires de structure connue a permis de le classer parmi les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) par analogie structurale (Ames *et al.*, 1990; Hyde *et al.*, 1990). En effet, comme tout membre de la famille ABC, CFTR possède deux domaines transmembranaires (MSD, pour Membrane Spanning Domain) formant le pore hydrophile du canal, et deux domaines cytoplasmiques de liaison à l'ATP (NBD, pour Nucleotide Binding Domain) dont les cycles de fixation et d'hydrolyse de l'ATP contrôlent l'ouverture et la fermeture du pore (Baukowitz *et al.*, 1994; Gunderson and Kopito, 1994; Hwang *et al.*, 1994) (Figure 23).

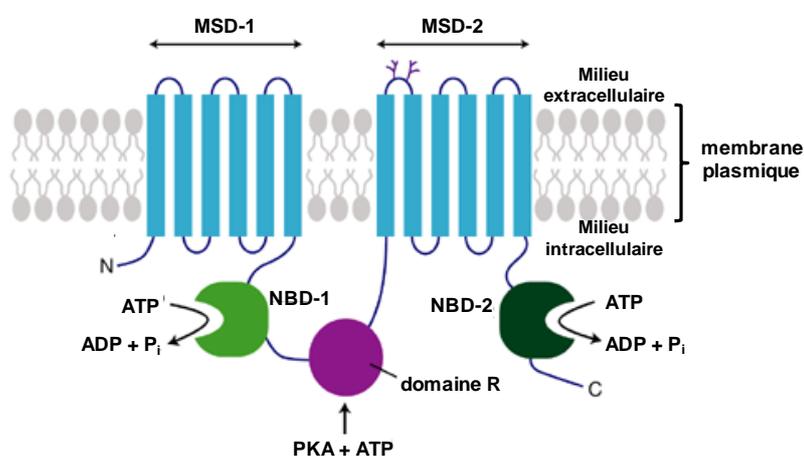


Figure 23 : Modèle moléculaire du CFTR

Le CFTR est composé de deux motifs répétés comprenant un domaine à six segments transmembranaires (MSD) structurés en hélices α et un domaine de liaison à l'ATP (NBD), séparés par un domaine régulateur (R). Les MSD forment le pore du canal. Lorsque R n'est pas phosphorylé, celui-ci interagit avec les NBD, masquant leur site de fixation de l'ATP. La phosphorylation de R par les protéines kinases PKA et PKC interrompt son interaction avec les NBD. Ces derniers peuvent alors fixer et hydrolyser l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP par NBD-1 a pour conséquence l'ouverture du canal, alors que l'hydrolyse par NBD-2 provoque sa fermeture (Carson *et al.*, 1995). Modifiée d'après Donald J. Davidson et Julia R. Dorin, Expert reviews in Molecular Medicine © 2001, Cambridge University Press.

Cependant, CFTR se distingue des autres transporteurs ABC, car il est le seul canal ionique de la famille mais également le seul à posséder un domaine régulateur (R) intracytoplasmique (Sheppard and Welsh, 1999), dont l'état de phosphorylation, modulé principalement par les protéines kinases PKA (Protéine Kinase AMPc-dépendante) et PKC, participe également à la régulation des cycles d'ouverture/fermeture du canal (pour revue (Sheppard and Welsh, 1999; Gadsby and Nairn, 1999)). La déphosphorylation des NBD et donc l'inactivation de CFTR est effectuée par des protéines phosphatases (Luo *et al.*, 1998).

Le CFTR est exprimé à la face apicale des cellules épithéliales (Denning *et al.*, 1992a), où il module la sécrétion des ions chlorures mais participe également à la régulation de nombreux autres canaux ioniques (pour revue (Riordan, 2008)). Parmi ces canaux, CFTR régule négativement l'activité des canaux sodiques ENaC (Epithelial Na⁺ Channels) impliqués dans l'hydratation du mucus recouvrant les tissus épithéliaux (Mall *et al.*, 1998; Mall *et al.*, 1999).

D'un point de vue pharmacologique, de nombreuses molécules permettent de moduler l'activité de CFTR (pour revue (Schultz *et al.*, 1999b)). Parmi celles-ci, on peut citer la forskoline (Fsk) et la génistéine (Gst), très couramment employées dans les laboratoires de recherches pour activer CFTR. La Fsk agit indirectement sur l'activité de CFTR en stimulant la PKA par la voie de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) (Breuer *et al.*, 1992), alors que la Gst agit directement sur CFTR (Illek *et al.*, 1995). Parmi les inhibiteurs spécifiques de CFTR, on peut citer l'inhibiteur 172 (CFTR_{inh}-172, (Ma *et al.*, 2002))

1b - La mutation F508del-CFTR

La mutation la plus fréquente responsable de la mucoviscidose, *F508del-CFTR*, entraîne un défaut de maturation post-traductionnelle de la protéine correspondante (Cheng *et al.*, 1990). Celle-ci, ne passant pas le contrôle qualité du RE, est envoyée vers la voie ERAD où elle est dégradée par le protéasome (Figure 24, (Gelman *et al.*, 2002)). Cette rétention dans le RE pourrait conduire à un stress du RE et l'induction de l'UPR. Cependant, la question de l'UPR dans la mucoviscidose est un sujet controversé que nous discuterons plus tard dans ce manuscrit.

F508del-CFTR n'étant pas acheminé à la membrane plasmique (Denning *et al.*, 1992b), il ne peut pas jouer son rôle dans l'hydratation du mucus, rendant ce dernier épais et visqueux. Au niveau pulmonaire, l'augmentation de la viscosité du mucus conduit à une obstruction chronique des bronches (Worlitzsch *et al.*, 2002) et rend inefficace la clairance mucociliaire, favorisant l'apparition d'infections bactériennes chroniques associées à une inflammation et responsables de la morbidité de la maladie (Doring, 1996). Au niveau du pancréas, les canaux pancréatiques sont également obstrués, réduisant l'excrétion des enzymes pancréatiques, entre autres les lipases et la trypsine, dans la lumière de l'intestin. Ceci a pour conséquence une mauvaise absorption des graisses, des protéines et des vitamines liposolubles, entraînant une diarrhée chronique grasseuse, une croissance insuffisante, un retard pubertaire, une anémie et des troubles carenciels (pour revue (Pencharz and Durie, 2000)). A plus long terme, les cellules β sont détruites, la sécrétion d'insuline réduite et se développe un diabète lié à la mucoviscidose, ou CFRD (pour Cystic Fibrosis Related Diabetes), qui, avec l'allongement de la durée de vie des patients CF, est la cause la plus commune de comorbidité (Moran *et al.*, 2009).

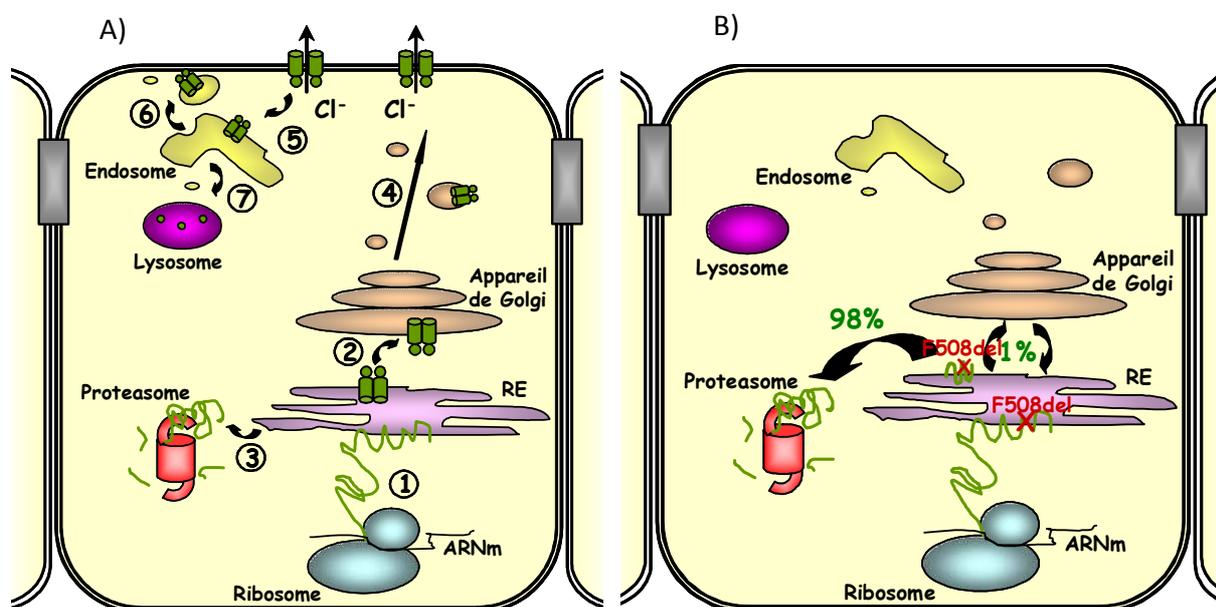


Figure 24 : Voies de sécrétion des protéines CFTR et F508del-CFTR

A) La protéine CFTR, après sa synthèse et son repliement dans le RE (1) doit passer le contrôle qualité de ce compartiment. Si son repliement est correct, elle est envoyée vers l'appareil de Golgi (2), sinon elle est dirigée vers le protéasome pour y être dégradée (3). Une fois sa maturation achevée au sein de l'appareil de Golgi, elle est transportée *via* un système vésiculaire vers la membrane plasmique (4), d'où elle sera rapidement internalisée (5) dans des vésicules endosomales en attendant son recyclage (6) ou sa dégradation dans le lysosome (7). B) La protéine F508del-CFTR, quant à elle, ne passe pas le contrôle qualité du RE. Elle est directement envoyée vers le protéasome pour dégradation. Modifiée d'après Caroline Norez de l'Université de Poitiers.

2 - Des correcteurs pharmacologiques : une stratégie thérapeutique

Il a été montré que le F508del-CFTR, malgré son défaut de maturation le retenant dans le RE, restait un canal fonctionnel (Pasyk and Foskett, 1995). Cette observation a alors orienté les recherches vers la correction du trafic de F508del-CFTR jusqu'à la membrane plasmique. Ainsi, plusieurs molécules jouant le rôle de chaperonnes pharmacologiques ou de modulateurs de l'homéostasie protéique pendant le repliement de F508del-CFTR dans le RE ont été découvertes grâce au criblage de banques de molécules. L'utilisation de ces molécules a permis de montrer que le F508del-CFTR, une fois conduit à la membrane plasmique, était moins stable (Heda *et al.*, 2001) et moins actif que la protéine CFTR (Schultz *et al.*, 1999a), mais qu'il était néanmoins fonctionnel.

Parmi les molécules correctrices du F508del-CFTR, on peut citer le 4-PBA (Rubenstein *et al.*, 1997), le CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, (Jacobson *et al.*, 1995; Andersson and Roomans, 2000)), le VX-809 (Van Goor *et al.*, 2011) et le miglustat (Norez *et al.*, 2006). Concernant les mécanismes d'action de ces correcteurs, 4-PBA et miglustat ont pour cibles des chaperonnes moléculaires du RE, en l'occurrence Hsp70 et la calnexine, respectivement (Rubenstein *et al.*, 1997; Norez *et al.*, 2006). Ils présentent donc la propriété d'inhiber l'interaction de ces chaperonnes avec F508del-CFTR, lui permettant d'échapper au contrôle qualité du RE. VX-809, quant à lui, interagit directement avec F508del-CFTR pendant sa biogenèse et son repliement au sein du RE, lui permettant également d'échapper à son adressage vers le protéasome pour dégradation (Van Goor *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action du CPX, quant à lui, est controversé. Selon certaines équipes, il interagirait avec le NBD1 de F508del-CFTR (Cohen *et al.*, 1997), alors que d'autres émettent l'hypothèse selon laquelle CPX modulerait l'activité chlorure du F508del-CFTR par des modifications du pH intracellulaire (Kunzelmann *et al.*, 1998; Casavola *et al.*, 1995).

Ces quatre molécules ont été testées en essai clinique (Rubenstein and Zeitlin, 1998; McCarty *et al.*, 2002; Clancy *et al.*, 2012; Leonard *et al.*, 2012). Cependant, elles sont apparues moins efficaces chez les patients que dans les tests *in vitro*. Si le 4-PBA a montré une légère amélioration de l'activité CFTR au niveau de l'épithélium nasal et le VX-809 une diminution de la concentration en ions chlorure de la sueur, aucune de ces molécules n'a eu d'effet au niveau pulmonaire. Malgré le faible taux de réussite de ces correcteurs en essai clinique, les chercheurs n'abandonnent pas l'idée de soigner la maladie par ces molécules. L'hypothèse actuelle serait d'améliorer le traitement des patients CF par la combinaison de

deux molécules, probablement un correcteur et un potentiateur dont les effets seraient synergiques (Welsh, 2010; Pedemonte and Galietta, 2012; Hanrahan *et al.*, 2013; Farinha *et al.*, 2013).

3 - Une homéostasie lipidique perturbée

Bien avant la découverte du gène *CFTR*, la mucoviscidose avait été associée à des troubles de l'homéostasie lipidique et en particulier des AGPI. En effet, dès 1962, la maladie était caractérisée par de faibles taux d'acide linoléique (LA, C18:2, (Kuo *et al.*, 1962; Underwood *et al.*, 1972)) et d'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, (Underwood *et al.*, 1972; Freedman *et al.*, 2004)) dans les tissus et le plasma des patients CF. Ces anomalies lipidiques, retrouvées uniquement chez les patients CF souffrant d'une insuffisance pancréatique (Hubbard *et al.*, 1977), ont fait l'objet de plusieurs essais thérapeutiques de supplémentation en AG. Les résultats de ces supplémentations n'étant pas cohérents d'une étude à l'autre, le sujet reste controversé (De Vizia *et al.*, 2003; Lloyd-Still *et al.*, 2006; McKarney *et al.*, 2007; Coste *et al.*, 2007; Durieu *et al.*, 2007). Plus récemment, une analyse lipidomique du plasma des patients CF a montré une diminution systématique de quatre espèces de PC contenant des AGPI (36:3, 36:5, 38:5 et 38:6) dans les formes graves de la maladie par rapport aux formes modérées (Guerrera *et al.*, 2009). Il a d'ailleurs été proposé que la signature lipidique du plasma des patients CF pouvait, non seulement être corrélée à la sévérité de la maladie, mais également constituer un potentiel pronostic sur le développement de la pathologie (Ollero *et al.*, 2011).

La mucoviscidose est également associée à une accumulation de cholestérol dans les poumons et la trachée des patients CF ainsi que dans le plasma (White *et al.*, 2007). Le contenu en céramides est également altéré dans cette maladie, même si la communauté scientifique ne s'accorde pas à propos des variations du taux de céramides. En effet, Teichgraber et ses collaborateurs ont montré une augmentation du taux de céramides qui modulerait l'inflammation, la mort cellulaire et la susceptibilité des patients CF à l'infection (Teichgraber *et al.*, 2008). Guilbault et son équipe, quant à eux, associent une carence en céramides aux déséquilibres en AGPI retrouvés chez les patients CF (Guilbault *et al.*, 2009).

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Notre objectif lors de ces trois années de thèse était double. Dans un premier temps, nous avons étudié, dans un modèle simple, les mécanismes moléculaires et cellulaires de la lipotoxicité liée aux AGS et en particulier leurs impacts sur la voie de sécrétion. Puis, dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'influence du contenu lipidique membranaire sur la voie de sécrétion des cellules CF.

I - Comprendre l'implication des AGS sur la voie de sécrétion

L'évolution des pays développés a contribué à la modification des ressources alimentaires, de plus en plus riches en AGS et en AGI *trans* (décrits dans la partie Introduction, I- 1b- Diversité liée aux acides gras). Or, ces types d'AG ont des effets délétères sur la santé en favorisant le développement de maladies cardiovasculaires, de l'obésité et du diabète de type 2. Les AG sont les composants de lipides plus complexes, les céramides/sphingolipides et les phospholipides, faisant partie intégrante des membranes cellulaires. Le contenu en AG de ces espèces lipidiques module les propriétés biophysiques des membranes et par conséquent, des processus clés de la voie de sécrétion. Au niveau post-traductionnel, les AGS altèrent le repliement des protéines et leur trafic du RE à l'appareil de Golgi, provoquant une surcharge protéique dans le RE et induisant l'UPR, qui, si elle est prolongée, conduit à l'apoptose des cellules (Pineau *et al.*, 2009; Preston *et al.*, 2009; Boslem *et al.*, 2013).

Dans une première étude qui a fait l'objet d'une première publication, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires et cellulaires des AGS sur la voie de sécrétion. Pour cela, nous avons travaillé sur un modèle cellulaire eucaryote simple, la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*. L'invalidation du gène *HEM1* dans la levure, souche nommée *hem1Δ*, permet d'accumuler des AGS dans cet organisme. En effet, Hem1p, l'enzyme codée par ce gène, catalyse la synthèse du δ -aminolévulinate (ALA), un intermédiaire de la synthèse de l'hème, lui-même un cofacteur d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ergostérol (ERG) et dans la désaturation des AGS en AGI (Figure 25).

Cultivée en absence d'ALA, cette souche n'est pas capable de synthétiser l'ERG et de désaturer les AGS. Elle subit donc une double carence en ERG et AGI, et par conséquent une

accumulation d'AGS (Ferreira *et al.*, 2004) si cultivée dans un milieu standard YPG (décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, I- A- 2- Cultures). Afin d'éliminer les effets possibles d'une carence en ergostérol et de n'observer que les effets des AGS, le milieu peut être supplémenté en ERG. Les AGS et l'ERG agissent de façon synergique sur l'induction du stress du RE (Pineau *et al.*, 2009), et ces effets peuvent être corrigés par l'ajout d'oléate (OLE) dans le milieu de culture, utilisé comme source d'AGI. Ainsi, la culture de la souche *hem1Δ* en présence d'ALA ou d'ERG+OLE permet de pallier les effets de la mutation.

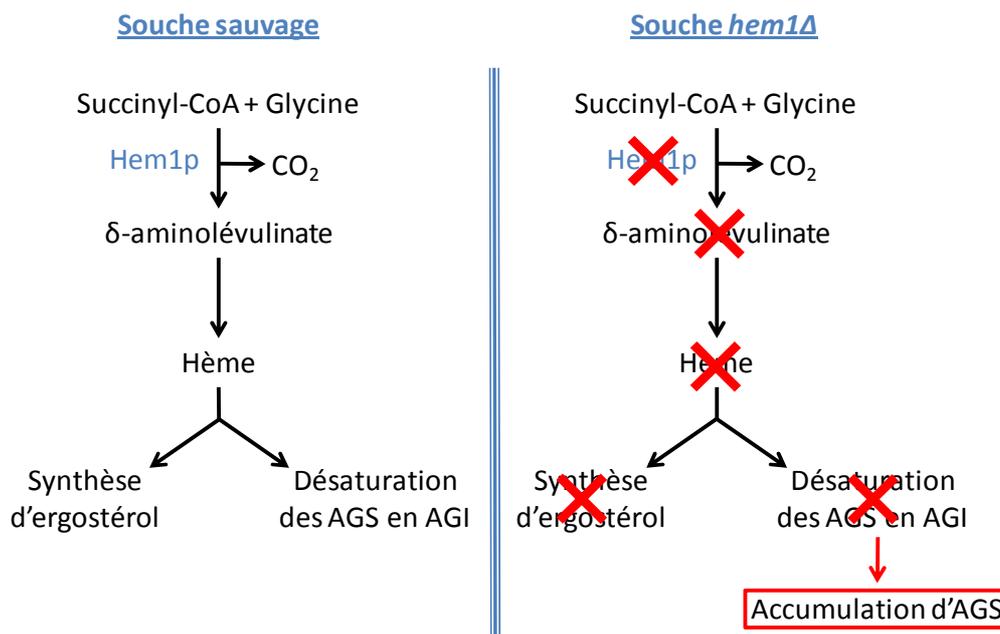


Figure 25 : Le modèle *hem1Δ*

Hem1p catalyse la synthèse du δ-aminolévulinate, nécessaire pour la production de l'hème indispensable pour la formation de l'ergostérol et la désaturation des AGS en AGI. Dans la souche *hem1Δ*, le δ-aminolévulinate n'est plus synthétisé, bloquant ainsi la production de l'hème et induisant une accumulation d'AGS.

L'accumulation d'AGS induit l'accumulation de céramides. Il a été montré qu'un taux élevé de céramides induisait l'apoptose (Dbaibo and Hannun, 1998) et que l'augmentation du taux de saturation des PL perturbait la fluidité des membranes (Deguil *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent mal connus. Dans cette souche *hem1Δ*, nous avons tout d'abord déterminé les contributions relatives des céramides/sphingolipides et des PL dans la lipotoxicité liée aux AGS. Pour cela, nous avons bloqué la voie de biosynthèse des céramides/sphingolipides grâce à la myriocine, qui inhibe de façon spécifique la première étape de biosynthèse des céramides/sphingolipides à partir du palmitoyl-CoA (décrit plus en détail dans la partie Résultats, Résumé du premier article). Ceci

nous a permis de discriminer les étapes de la voie de sécrétion dans lesquelles les céramides/sphingolipides étaient impliqués.

Les vésicules étant un élément central de la voie de sécrétion, de par leur implication dans le trafic des protéines d'organite en organite jusqu'à leur destination finale, nous nous sommes également intéressés à leur formation dans des conditions d'accumulation d'AGS : leur structure, leur nombre et le mécanisme de vésiculation.

II - Comprendre l'implication des AGS dans la mucoviscidose

La mucoviscidose (décrite dans la partie Introduction IV- B- La mucoviscidose) est une maladie génétique dont la mutation la plus fréquente, *F508del-CFTR*, a pour conséquence une altération de la voie de sécrétion de la protéine correspondante. Toutefois, il est possible de corriger le trafic de *F508del-CFTR* par des agents pharmacologiques (Andersson and Roomans, 2000; Norez *et al.*, 2006; Van Goor *et al.*, 2011). Certaines de ces molécules correctrices ont d'ailleurs été testées en essai clinique mais n'ont pas apporté d'améliorations importantes chez les patients traités. Le deuxième objectif de cette thèse a donc été de comprendre la raison pour laquelle ces molécules pharmacologiques, très efficaces *in vitro*, n'ont pas rencontré le succès attendu en essai clinique. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle un facteur important de la voie de sécrétion, retrouvé chez les patients CF, n'aurait pas été pris en compte lorsque les tests *in vitro* ont été effectués. Ce facteur pourrait être le contenu phospholipidique des cellules épithéliales des patients CF.

Si la mucoviscidose a très tôt été associée à une diminution des AGPI dans les cellules, le plasma (Kuo *et al.*, 1962; Underwood *et al.*, 1972; Freedman *et al.*, 2004) et dans les PC du plasma des patients CF (Guerrera *et al.*, 2009), peu de données concernant les AG intégrés dans les PL membranaires des cellules CF sont retrouvées dans la littérature. Or, nous savons que les AGS altèrent la voie de sécrétion dans son ensemble et pourraient de ce fait perturber dans la correction du trafic de *F508del-CFTR* à la membrane plasmique. Dans une deuxième étude qui a fait l'objet d'un second article, nous avons dans un premier temps caractérisé le contenu en AG des phospholipides membranaires, en particulier des PC, des cellules épithéliales de bronches issues de prélèvements de poumon de patients CF et non-CF

(voir Matériel et Méthodes, I- B- Cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées). Puis, dans un second temps, nous avons étudié l'influence de ce profil phospholipidique sur la fonctionnalité du F508del-CFTR corrigé par des agents pharmacologiques dans les lignées cellulaires correspondantes (voir Matériel et Méthodes, I- C- Lignées cellulaires).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - Matériel biologique

Dans ce travail de recherche, plusieurs types cellulaires ont été utilisés. Nous avons commencé à travailler sur un modèle cellulaire eucaryote simple, la levure, avant de poursuivre notre étude sur un autre modèle nous permettant d'approcher au plus près les conditions physiologiques, les cellules humaines fraîchement dissociées issues de prélèvements de patients. Ces dernières, n'étant disponibles que ponctuellement, nous avons également travaillé sur des cellules humaines immortalisées ou lignées cellulaires.

A - Levures

Le premier type cellulaire étudié est la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 26). Organisme unicellulaire eucaryote, la levure présente les avantages d'une croissance rapide et d'une faible exigence nutritionnelle. Ces caractéristiques permettent de cultiver, d'étudier et d'utiliser la levure aussi facilement que des microorganismes procaryotes. Son utilisation en tant que modèle unicellulaire simple est d'autant plus précieuse pour explorer la biogenèse des protéines membranaires. Contrairement aux bactéries, elle comporte une voie de sécrétion dans laquelle sont retrouvées les principales modifications post traductionnelles nécessaires à la maturation des protéines des organismes eucaryotes supérieurs.

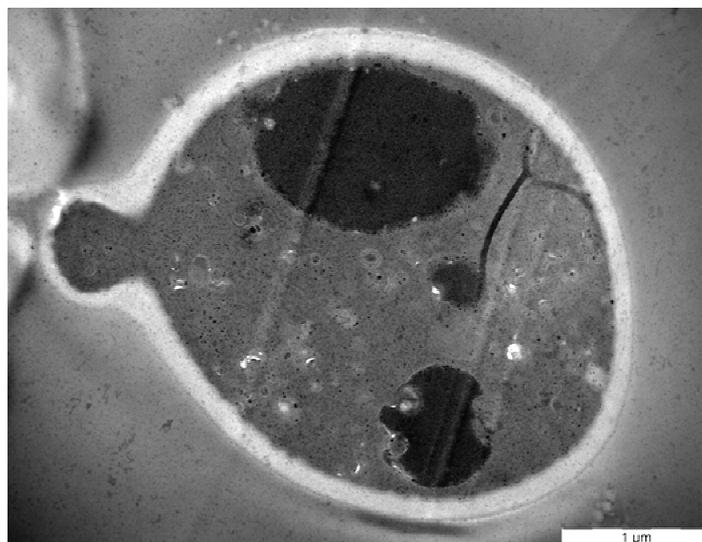


Figure 26 : *Saccharomyces cerevisiae* observée en microscopie électronique

1 - Souches

Parmi les souches *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dans cette étude, certaines proviennent de la banque Euroscarf, l'une d'entre elles nous a été fournie, et les autres ont été

obtenues par croisement génétique au sein de notre laboratoire (méthode décrite dans la partie « Méthode de génétique : obtention de doubles mutants »). Ces souches sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Souche	ORF déléte	Génotype	Origine
Y10000		<i>(MAT)a trp1 his3 ura3 leu2 met15</i>	BY4742 (Euroscarf)
<u>hem1Δ a</u>	YDR232W	<i>(MAT)a trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	(Pineau <i>et al.</i>, 2009)
<u>hem1Δ a</u>	YDR232W	<i>(MAT)a trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	(Pineau <i>et al.</i>, 2009)
<i>scs7Δ</i>	YMR272C	<i>(MAT)a his3 leu2 lys2 ura3 scs7::kanMX4</i>	Y10858 (Euroscarf)
<u>sec6Δ^{ts}</u>	YIL068C	<i>(MAT)a leu2 trp1 ura3 sec6 (ts)</i>	TFY15, (Ferreira <i>et al.</i>, 2002)
<u>hem1Δ</u> <u>end3Δ</u>		<i>(MAT)a his3 leu2 ura3 hem1::LEU2 end3::kanMX4</i>	(Pineau <i>et al.</i>, 2008)
<u>hem1Δ</u> <u>sec6Δ^{ts}</u>		<i>(MAT)a trp1 his3 ura3 hem1::LEU2 sec6-4 (ts)</i>	Cette étude, descendant de <i>hem1Δ a x</i> TFY15
<i>SPI- SEC7RFP</i>		<i>(MAT)a can1 his3 ura3 leu2 ade8 trp1::TRP1::TPII-SEC7-RFP</i>	(Robinson <i>et al.</i> , 2006)
<u>hem1Δ</u> <u>SEC7RFP</u>		<i>(MAT)a his3 ura3 ade8 hem1::kanMX4 trp1::TRP1::TPII-SEC7- RFP</i>	Cette étude, descendant de <i>SPI-SEC7RFP</i> <i>a x Y23591</i> (Euroscarf)

Tableau 3 : Souches de levures utilisées

Les souches soulignées et écrites en gras dans ce tableau ont été obtenues au sein de notre laboratoire.

2 - Cultures

Les levures sont généralement cultivées à 27 °C, en milieu liquide et sous agitation ou sur un milieu solide. La thermosensibilité des mutants s'évalue à 37 °C. Toutes les manipulations se font en conditions stériles, grâce à un bec Bunsen.

Différents milieux ont été utilisés : des milieux complets YPG (« Yeast Peptone » +

Glucose) et YPRaf (YP + Raffinose), un milieu minimum YNB (« Yeast Nitrogen Base ») supplémenté au besoin avec des acides aminés (aa) et/ou des bases azotées (ba), et un milieu de sporulation ACK (Acétate de Potassium). Leur composition est donnée dans le tableau suivant :

Milieu	Utilisation	Composition
YPG « Yeast Peptone » Glucose	Milieu complet avec du glucose comme source de carbone.	- Peptone pepsique de viande BIOKAR 10 g/L - Extrait autolytique de levure BIOKAR 10 g/L - Glucose 20 g/L (pour du milieu solide, Agar BIOKAR 2% (m/v))
YPRaf « Yeast Peptone » Raffinose	Milieu complet avec du raffinose comme source de carbone.	- Peptone pepsique de viande BIOKAR 10 g/L - Extrait autolytique de levure BIOKAR 10 g/L - Raffinose 20 g/L
YNB « Yeast Nitrogen Base »	Milieu minimum pour la sélection des clones d'intérêt.	- « Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids and ammonium sulfate » DIFCO 1,7 g/L - Sulfate d'ammonium 5 g/L - Glucose 10 g/L - Si besoin, les aa et ba sont ajoutés à une concentration finale de 50 µg/mL (pour du milieu solide, Agar BIOKAR 2% (m/v))
ACK Acétate de Potassium	Milieu de sporulation pour l'obtention d'individus haploïdes.	- Acétate de potassium 10 g/L - Agar BIOKAR 2% (m/v)

Tableau 4 : Composition des milieux de culture utilisés pour la levure

La souche *hem1Δ*, étant incapable de synthétiser le δ-aminolévulinate (ALA), ce dernier est ajouté, lorsque cela est indiqué, à une concentration finale de 80 µg/mL (SIGMA).

L'ergostérol (ERG), dont la solution mère est préparée dans du tergitol/éthanol (1:1, v/v, SIGMA®/Fisher) à 4 mg/mL, est ajouté à une concentration finale de 80 µg/mL. Le tween 80 (mono-oléate polyoxyéthylène 20 monohydrosorbitol, Acros Organics), utilisé par les cellules comme source d'oléate, est ajouté à 1% (v/v).

La myriocine (MYR, SIGMA), employée comme inhibiteur de la voie de biosynthèse des sphingolipides, est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 mM et utilisée à une concentration finale de 100 nM, 1 µM ou 10 µM. Le G418™ (Acros Organics), utilisé

pour sélectionner les souches portant le gène de résistance à la généticine *kanMX4*, est ajouté à une concentration finale de 200 µg/mL.

Les souches transformées par le plasmide pFl38gf-GFP (les plasmides utilisés sont décrits dans la partie I- D- Plasmides) sont cultivées en YPRaf, avec du raffinose comme source de carbone. En effet, dans ce plasmide, le gène de fusion *FUR4-GFP* est sous le contrôle du promoteur GAL10 qui est réprimé par le glucose. L'induction de la synthèse de cette protéine se fait par l'ajout de galactose à une concentration finale de 40 g/L, pendant 12 h maximum.

Les milieux complets YPG et YPRaf ainsi que le milieu de sporulation ACK sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min, et le milieu minimum YNB à 110 °C pendant 15 min. Toutes les solutions aqueuses (aa, ba, ALA et G418) ainsi que la myriocine sont stérilisées grâce à un filtre de 0,45 µm. Ces dernières, tout comme l'ergostérol et le tween 80, utilisés pour compléter les milieux, sont ajoutés après l'autoclavage des milieux.

3 - Estimation de la croissance des levures

Il est très simple d'estimer la densité cellulaire d'une suspension de levures par spectrophotométrie. En effet, à 600 nm, une unité de DO (densité optique) correspond à 2.10^7 levures par mL.

B - Cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées

L'étude menée sur la levure a permis de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires perturbés par les AGS. Le but ici est de montrer que ces phénomènes sont également perturbés dans les cellules humaines et, en particulier, dans le cas de la mucoviscidose. Nous avons donc poursuivi nos recherches sur des cellules humaines fraîchement dissociées, ou cellules primaires, issues de poumons de patients atteints ou non de la mucoviscidose.

1 - Origine des prélèvements

Les échantillons de poumons non mucoviscidosiques sont fournis par le service de chirurgie cardiothoracique du CHU (Centre Hospitalier Universitaire) La Milétrie de Poitiers, en collaboration avec le Dr Jayle. Provenant de lobectomies suite, généralement, à des carcinomes pulmonaires, ces fragments de poumons sont considérés comme des déchets

opératoires. Ils sont conservés à 4 °C dans un milieu dit « de décontamination » composé du DMEM/HAM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, SIGMA) supplémenté en antibiotiques : pénicilline/streptomycine (1 mg/mL, SIGMA), amphotéricine B (100 µg/mL, SIGMA), gentamycine (0,5 mg/mL, SIGMA).

Les échantillons de poumons mucoviscidiques, quant à eux, sont fournis par le service de chirurgie thoracique de l'Hôpital Foch de Suresnes, en collaboration avec le Dr Bonnette. Ces fragments sont récupérés après transplantation pulmonaire. Ils sont conservés à 4 °C dans le même milieu de décontamination décrit pour les cellules non mucoviscidiques, supplémenté de deux antibiotiques supplémentaires : la ceftazidime (500 µg/mL, SIGMA) et la ticarciline (500 µg/mL, SIGMA).

L'obtention de ces prélèvements est conforme à la législation française et approuvée par le comité de protection des personnes OUESTIII. Les échantillons de poumons utilisés dans cette étude provenaient de 17 patients : 7 non fumeurs n'ayant pas la mucoviscidose (5 hommes âgés de 61 ans en moyenne et 2 femmes âgées de 67 ans en moyenne), 3 fumeurs n'ayant pas la mucoviscidose (3 hommes âgés de 67 ans en moyenne) et de 10 patients atteints de la mucoviscidose, homozygotes pour la mutation *F508del-CFTR* (4 hommes âgés de 27 ans en moyenne et 6 femmes âgées de 28 ans en moyenne).

2 - Obtention des cellules épithéliales bronchiques

Les fragments de lobes pulmonaires (Figure 27A) sont disséqués afin de libérer les bronches du parenchyme à l'aide de ciseaux de microdissection, dans du milieu de décontamination. Une fois extraites, les bronches (Figure 27B) sont ensuite « nettoyées » de tout tissu avoisinant sous une loupe binoculaire.

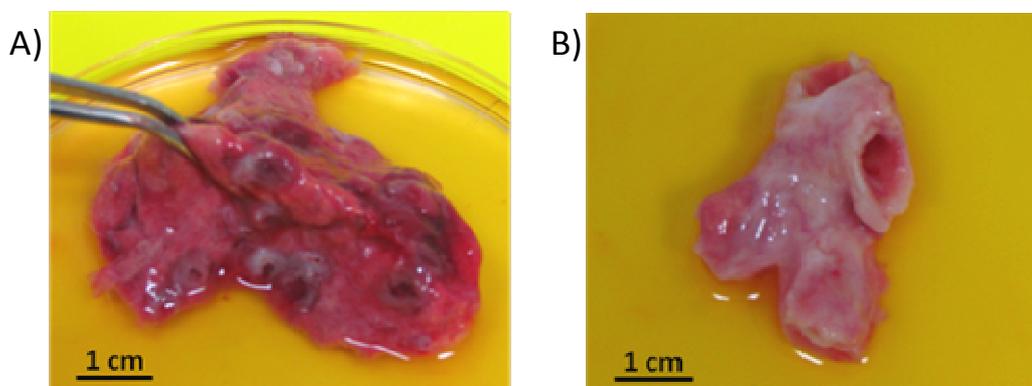


Figure 27 : Dissection de bronches

A) Fragment de lobe pulmonaire contenant des bronches. B) Bronche disséquée.

Les bronches sont alors découpées en petits morceaux puis mises en suspension dans un milieu dit « de dissociation » composé de milieu de décontamination adéquat supplémenté en protéases (0,1%, v/v, SIGMA) et en désoxyribonucléase I (0,01%, v/v, SIGMA), pendant 24 h à 4 °C. La digestion enzymatique est arrêtée par l'ajout de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza, 10% du volume). Après avoir retiré les segments de bronches, les cellules épithéliales sont récupérées par centrifugation à 600 rpm (rotor Awel SL180), pendant 5 min, sous forme de culot cellulaire. Plusieurs lavages de ces culots au PBS (Phosphate-Buffered Saline) sont effectués afin d'éliminer toute trace de mucus, très riche en bactéries mais aussi en acide palmitique (Mander *et al.*, 2002).

C - Lignées cellulaires humaines

Les cellules humaines fraîchement dissociées sont un très bon modèle d'étude nous permettant de nous approcher au plus près des conditions physiologiques humaines. Cependant, leur utilisation est limitée par la disponibilité réduite du matériel. C'est pourquoi nous avons, en parallèle, travaillé sur des lignées cellulaires humaines. En effet, l'usage et la culture de ces lignées, qui sont des cellules prélevées chez un individu puis transformées afin de les rendre immortelles, sont plus aisés que celui de cellules fraîchement dissociées.

1 - Les lignées 16HBE14o⁻ et CFBE41o⁻

Deux lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines ont été choisies pour ce travail : les 16HBE14o⁻ (Human Bronchial Epithelial cells, Figure 28) et les CFBE41o⁻. La première provient d'un individu n'étant pas atteint de la mucoviscidose et possède le gène *CFTR* sauvage, tandis que la seconde provient d'un patient atteint de la mucoviscidose, homozygote pour la mutation *F508del-CFTR*. Les 16HBE14o⁻ et les CFBE41o⁻ ont été transformées par le virus SV40 par le Dr Gruenert en 1994 (Cozens *et al.*, 1994) et 2004 (Gruenert *et al.*, 2004), respectivement.

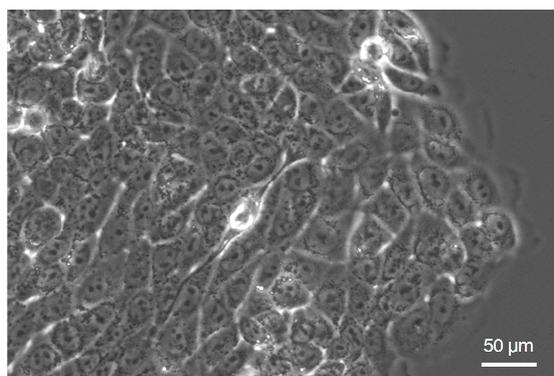


Figure 28 : 16HBE14o⁻ observées au microscope inversé

2 - Culture cellulaire

Toutes les manipulations de culture cellulaire sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

2a - Milieux de culture

Les 16HBE14o⁻ et CFBE41o⁻ sont toutes deux cultivées dans le même milieu essentiel minimum (MEM, Gibco, 31095) contenant de la L-glutamine et supplémenté de 10% de sérum de cheval décomplémenté (horse serum, HS, Gibco) et de 5 µg/mL de plasmocine (InVivoGen) pour prévenir toute contamination par des mycoplasmes. L'incubation des cellules avec des AG, se fait dans le même milieu sans supplémentation en sérum.

Dans notre laboratoire, les sérums utilisés sont l'ultrosor G et le SVF. Cependant, nous avons choisi de travailler avec du sérum de cheval car, grâce à une étude comparative menée par Linette Kadri lors de son stage de Master 1 dans notre équipe, nous savons qu'il est celui qui se rapproche le plus du sérum humain en terme de contenu en AG. Le sérum de cheval, comme tout sérum, est composé en majorité de protéines globulaires. En plus des AG, il va apporter aux cellules les facteurs de croissance dont elles ont besoin pour survivre et croître. Cependant, le sérum de cheval doit être décomplémenté avant son utilisation. Ceci consiste en la dénaturation des protéines du complément (protéines activatrices de la réponse immunitaire innée) par choc thermique (30 min à 56 °C).

2b - Entretien des lignées

Les lignées cellulaires sont cultivées à 37 °C sous une atmosphère humide composée de 5% de CO₂ et de 95% d'O₂. Pour les conditions de culture en hypoxie, l'O₂ est remplacé par du N₂.

Les cellules rendues immortelles perdent l'inhibition de contact. C'est pourquoi il est nécessaire de les repiquer lorsqu'elles atteignent 80% de confluence. Cette étape consiste à décrocher les cellules de la boîte afin de les redistribuer avec une dilution appropriée dans une nouvelle flasque de routine et dans des boîtes adaptées aux manipulations envisagées.

Les cellules sont attachées entre elles et à la boîte *via* des protéines d'adhérence calcium-dépendantes. Pour les décrocher, une étape de protéolyse est effectuée avec un mélange de trypsine, une enzyme protéolytique, et d'EDTA (acide éthylène diamine

tétracétique) un chélateur de calcium. Pour cela, il faut tout d'abord éliminer le milieu de culture et rincer les cellules avec du PBS stérile dépourvu de calcium (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco®). Cette étape a plusieurs buts : enlever les cellules mortes, éliminer les traces de sérum qui inhibe l'action de la trypsine mais aussi le calcium libre qui favorise les interactions cellule-cellule. Après élimination du PBS, un volume du mélange trypsine-EDTA (SIGMA, chauffé à 37 °C, 1 mL) est ajouté, puis les cellules sont incubées pendant environ 2 min à 37 °C, jusqu'à ce que celles-ci se décollent. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout de 4 volumes de milieu contenant du sérum. L'ensemble est centrifugé à 1 100 rpm (rotor pour tubes de 50 mL de la centrifugeuse Jouan B3.11) pendant 7 min. Une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire est repris dans 6 mL de milieu afin de procéder aux dilutions voulues pour l'ensemencement d'au moins une flasque de routine, puis d'autres supports suivant le type d'expérience à réaliser. Les milieux sont changés tous les 2 jours.

2c - Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide. Pour cela, les culots cellulaires obtenus après traitement à la trypsine sont repris dans du SVF et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde, SIGMA) qui a un effet cryoprotecteur. Les échantillons sont ensuite placés dans des cryotubes pendant 24 h à -80 °C afin d'effectuer un refroidissement progressif, avant d'être stockés dans l'azote liquide (-180 °C).

La décongélation des cellules doit se faire rapidement pour réduire le contact des cellules avec le DMSO qui, à température ambiante, est toxique pour les cellules. Pour cela, le contenu d'un cryotube est versé directement dans un grand volume de milieu de culture chauffé à 37 °C, puis le mélange est centrifugé à 1 100 rpm (rotor pour tubes de 50 mL de la centrifugeuse Jouan B3.11) pendant 7 min. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans 6 mL de milieu de culture qui sont ensuite transférés dans une flasque de 25 cm².

Les cellules étant congelées puis décongelées en présence de SVF, une période d'adaptation au sérum de cheval est nécessaire. 2 jours après la décongélation, le milieu avec SVF est remplacé par du milieu contenant 5% de SVF et 5% de sérum de cheval pendant 48 h. Passé ce délai, les cellules sont cultivées dans du milieu ne contenant que du sérum de cheval. L'entretien de ces cellules est décrit dans le paragraphe précédent.

3 - Incubation des cellules avec des acides gras

La préparation des AG et le protocole d'incubation des cellules ont été inspirés d'une étude menée sur les cellules β du pancréas par Karaskov et ses collaborateurs (Karaskov *et al.*, 2006).

3a - Préparation des acides gras

Une solution de NaOH 0,1 M filtrée est chauffée à 70 °C pour solubiliser les acides palmitique et oléique, par salification (formation de sels alcalins à partir d'acides gras), à une concentration de 10 mM ou 50 mM. Pour faciliter l'incorporation des AG par les cellules, ces acides gras doivent être complexés à de l'albumine de sérum bovin, BSA. Une solution aqueuse filtrée de BSA dépourvue d'AG (BSA-fatty acid free, SIGMA) à 5% (m/v) est chauffée à 65 °C avant d'y ajouter l'acide gras, chauffé à 70 °C, à cinq fois la concentration finale voulue (ces solutions seront par la suite diluées au 1/5 dans du milieu de culture). Le mélange doit être encore une fois chauffé à 65 °C pendant 10 min avant d'être refroidi à température ambiante. Si les AG conjugués à la BSA ne sont pas utilisés dans la journée, ils peuvent être congelés à -20 °C. Auquel cas, ils devront être décongelés par un chauffage à 65 °C pendant 10 min, puis refroidis à température ambiante avant d'être utilisés.

3b - Conditions de culture

Pour une extraction de lipides, les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures « coatées » (Corning) de 10 cm² jusqu'à ce qu'elles atteignent au moins 90% de confluence. Pour des expériences d'efflux d'iodure, les cellules sont cultivées sur des plaques 24 puits jusqu'à atteindre 100% de confluence. Les solutions d'AG conjugués à la BSA sont diluées au 1/5 dans du milieu de culture ne contenant pas de sérum et l'incubation des cellules se fait à 37 °C pendant 16 h.

3c - Récupération des cellules

Le protocole utilisé pour récupérer les cellules après incubation avec des AG est basé sur celui utilisé pour l'entretien des lignées (décrit dans le paragraphe II 1322 – Entretien des lignées) avec l'utilisation de trypsine. Cependant, les AG rendant les cellules visqueuses et difficiles à culoter, ce protocole a dû être adapté pour récupérer le maximum de cellules.

En effet, à la fin de l'incubation avec des AG, le milieu est récupéré et transféré dans

un tube de 15 mL. Les cellules sont rincées avec 1 mL de PBS qui est également récupéré et transféré dans le tube. 1 mL de trypsine est ajouté et les cellules sont placées pendant 2 minutes à 37 °C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 3 mL de milieu de culture contenant du sérum. Les cellules sont ensuite transférées dans le tube de 15 mL puis centrifugées à 4 000 rpm (rotor Awel SL180) pendant 7 min. Le surnageant est éliminé délicatement à la pipette pour ne pas aspirer le culot cellulaire. Le culot est repris dans 10 mL de PBS avant d'être centrifugé à nouveau. Après élimination délicate du surnageant, le culot est repris dans 2 mL de PBS puis les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez. Le volume contenant le nombre de cellules voulu, selon le type d'expérience à effectuer, est prélevé puis centrifugé.

D - Plasmides

Deux plasmides ont été utilisés dans cette étude et sont décrits dans le tableau 4. Ces plasmides sont « stockés » dans des bactéries *Escherichia coli* de type DH5a, qui sont conservées à -80 °C avec 25% de glycérol (stock glycérol).

La culture des bactéries transformées en milieu LB (Luria Bertani : tryptone 10 g/L, BIOKAR ; d'extraits autolytiques de levure 5 g/L, BIOKAR ; et NaCl 5 g/L, SIGMA) supplémenté par 100 µg/mL d'ampicilline (Amp) permet l'amplification de ces plasmides. Pour cela, les bactéries provenant des stocks glycérol sont étalées sur un milieu LB solide (obtenu par ajout de 2% (m/v) d'agar) + Amp à 37 °C pendant 2 jours, avant d'être cultivées en milieu LB liquide + Amp, à 37 °C, sous agitation, sur la nuit. L'extraction et la transformation des levures par ces plasmides sont décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes, III- Méthodes de biologie moléculaire.

Plasmide	Sélection dans la bactérie	Sélection dans la levure	Origine	Caractéristiques
pPW344	Résistance à l'ampicilline	URA3	(Cox and Walter, 1996)	Plasmide multicopie portant 4 domaines d'activation UPRE dans le promoteur minimal <i>CYCI</i> en amont du gène <i>LacZ</i>
pFl38gF-GFP	Résistance à l'ampicilline	URA3	(Marchal <i>et al.</i> , 2002)	Vecteur centromérique portant la séquence codant pour la protéine de fusion FUR4-GFP sous le contrôle du promoteur GAL 10

Tableau 5 : Plasmides utilisés

II - Méthode de génétique : obtention de doubles mutants

Saccharomyces cerevisiae est une levure bourgeonnante. Elle peut se reproduire de manière asexuée par bourgeonnement. Cette levure est également un ascomycète hétérothallique. Ceci implique que sa reproduction sexuée entre 2 individus haploïdes de signe sexuel opposé (*MAT α* et *MAT α*) résulte en un individu diploïde qui, après méiose (ou sporulation chez la levure) donne naissance à un asque contenant des spores haploïdes. Cette particularité en fait un excellent outil pour des analyses génétiques classiques et permet d'obtenir des doubles mutants sans avoir recours à des techniques de biologie moléculaire. En effet, l'élaboration d'un double mutant nécessite le croisement entre deux souches haploïdes, de signe sexuel opposé, et portant des mutations individuelles. Un exemple en est donné dans la Figure 29.

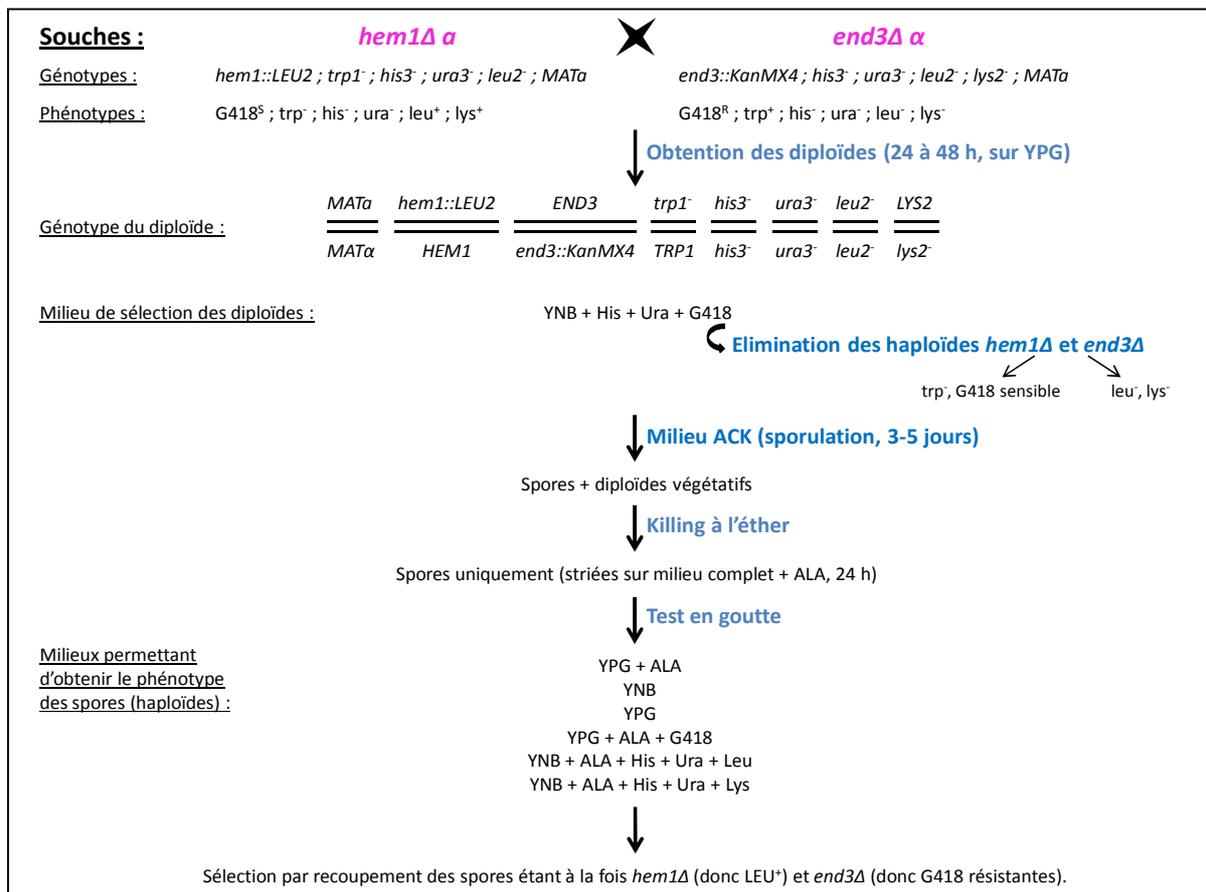


Figure 29 : Exemple d'élaboration d'un double mutant: cas de *hem1 Δ end3 Δ*

Le gène *KanMX4* confère la résistance à un antibiotique : le G418. Le δ -aminolévulinate (ALA) palie la déficience causée par la mutation *hem1 Δ* . Modifiée d'après la thèse de Ludovic Pineau, 2008.

Dans un premier temps, les souches haploïdes de signe sexuel opposé sont croisées sur un milieu complet YPG solide pendant 24 à 48 h, afin d'obtenir des individus diploïdes. Ces

diploïdes sont ensuite sélectionnés grâce à la complémentation fonctionnelle des auxotrophies des deux souches haploïdes après étalement sur un milieu sélectif (YNB + aa et/ou ba). Dans notre exemple, l'auxotrophie pour le tryptophane de la souche *hem1Δ* va être complétement par la souche *end3Δ*. Il ne sera donc pas nécessaire de mettre du tryptophane dans le milieu sélectif.

Les diploïdes sont alors déposés sur un milieu de sporulation ACK pendant 3 à 4 jours. Ce milieu, pauvre en nutriments, ne contient que de l'acétate de potassium, une source de carbone difficile à utiliser pour la levure. Cette carence va induire la méiose/sporulation des diploïdes qui se traduit par la formation d'un asque contenant quatre spores haploïdes par diploïde. Les diploïdes n'ayant pas sporulé sont éliminés par un traitement à l'éther qui permet également de dégrader la paroi des asques et de libérer les spores (« killing à l'éther » (Dawes and Hardie, 1974)).

Les spores isolées sont alors étalées sur un milieu complet YPG avant d'être analysées par un test en goutte. Ce dernier test consiste à déposer des gouttes de 10 µL contenant environ 10 000 cellules sur différents milieux gélosés. Après 2 à 3 jours de culture, ce test permet de déterminer le phénotype et de déduire le génotype des spores. Les souches recherchées sont alors conservées à -80 °C avec 25% de glycérol.

III - Méthodes de biologie moléculaire

A - Extraction d'ADN plasmidique à partir de culture bactérienne

La technique d'extraction et de purification de plasmides que nous avons utilisée est adaptée de celles de Birnboim (Birnboim and Doly, 1979) et de Ish-Horowicz (Ish-Horowicz and Burke, 1981).

Les bactéries transformées par le plasmide d'intérêt sont cultivées dans 1,5 mL de milieu LB + Amp à 37 °C, sous agitation, sur la nuit. Après centrifugation de cette culture à 10 000 g, pendant 2 min, le culot est récupéré dans 100 µL de solution 1 (glucose 0,9% (m/v), EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM) auxquels sont ajoutés 200 µL de solution de lyse (solution 2 : NaOH 0,2% (m/v), Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 1% (m/v)). L'ensemble est incubé à 4 °C pendant 10 min avant d'y ajouter 150 µL de solution de neutralisation (solution 3 : acétate de sodium 3 M, pH 5,2) pour une autre incubation sur glace pendant 10 min. Le tube est alors centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. 400 µL de surnageant sont alors récupérés

avant d'y ajouter 800 μ L d'éthanol absolu. L'ensemble est à nouveau centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 100 μ L de solution 4 (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, acétate de sodium 0,15 mM) et 200 μ L d'éthanol absolu sont ajoutés avant une dernière centrifugation à 10 000 g, pendant 10 min, à 4 °C. Une fois le surnageant éliminé, le culot est séché et pour finir, l'ADN plasmidique est repris dans 20 μ L d'eau. Les plasmides ainsi purifiés sont conservés à -20 °C.

B - Transformation de levures

Les levures ont une paroi rigide, en plus de leur membrane plasmique, qui, du fait de son épaissement en phase stationnaire, représente un obstacle pour leur transformation. C'est pourquoi les levures à transformer sont striées sur un milieu YPG solide moins de 24 h avant la transformation.

Une colonie prélevée sur le milieu gélosé est suspendue dans 100 μ L de solution A (acétate de lithium 100 mM, Tris HCL 10 mM, EDTA 1 mM, sorbitol 1 M) puis incubée à 27 °C pendant 1 h. Après centrifugation à 9 000 g pendant 1 min, le culot cellulaire est repris dans 5 μ L de solution contenant l'ADN plasmidique. Le mélange est alors incubé à température ambiante pendant 10 min. 100 μ L de solution B (acétate de lithium 100 mM, polyéthylène glycol 4000 (m/v), EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM) sont ajoutés pour une autre incubation de 30 min à 27 °C. Les cellules, rendues compétentes par les traitements précédents, subissent alors un choc thermique de 5 min à 42 °C avant d'être centrifugées à 9 000 g pendant 1 min. Le culot est alors resuspendu dans 100 μ L de solution C (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, sorbitol 0,6 M) qui seront étalés sur un milieu sélectif adéquat.

C - PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les effets des AGS sur la transcription des gènes de transporteurs ont été étudiés grâce à la technique de PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel. Celle-ci se décline en trois grandes étapes : l'extraction des ARN totaux, la transcription inverse des ARNm en ADN complémentaires (ADNc) par RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et la quantification de l'ADNc cible par qPCR (quantitative PCR).

1 - Extraction des ARN totaux

La première étape de cette expérience, l'extraction des ARN totaux, a été effectuée avec le kit RNeasy Mini de QIAGEN. Ce kit a été choisi pour sa simplicité d'utilisation mais

surtout parce qu'il permettait l'extraction des ARN de tous les types cellulaires que nous avons étudiés avec une qualité suffisante pour une analyse de qPCR.

Le protocole de lyse et la quantité de cellules utilisée diffèrent selon le type de cellule étudié. Les levures sont cultivées en milieu liquide. 2×10^7 levures sont récupérées après centrifugation du volume adéquat à 4 °C, 1 000 g, pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les levures sont lysées de façon mécanique. Le culot est repris dans 600 µL du tampon de lyse du kit (tampon RLT auquel 10 µL de β-Mercaptoéthanol sont ajoutés pour 1 mL de tampon) puis transféré dans un tube à bouchon avec environ 600 µL de billes en verre stériles (0,6 mm, Fisher Scientific, Bioblock). Le tube est ensuite placé dans un agitateur (Biospec) où les cellules sont cassées par 3 agitations à 5 000 tours/min de 20 s, entre lesquelles le tube est placé sur la glace pendant 30 s pour éviter que l'échantillon ne chauffe et ne se dégrade.

Quant aux cellules humaines, qu'il s'agisse de lignées ou de cellules fraîchement dissociées, l'extraction d'ARN se fait sur 10^7 cellules. Après plusieurs lavages au PBS, les culots de cellules sont repris dans 600 µL de tampon RLT contenant du β-Mercaptoéthanol. La lyse se fait par au moins 5 aspirations du lysat à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de 0,5 mm de diamètre.

Après la lyse, 600 µL d'éthanol absolu sont ajoutés au lysat afin de précipiter les acides nucléiques et la purification des ARN peut commencer. Les étapes du protocole sont les mêmes quel que soit le type de cellule considéré. L'échantillon est placé sur une colonne RNeasy de silice. Par une centrifugation de 15 s à 8 000 g, le lysat passe à travers la colonne et les acides nucléiques sont retenus par la silice. Toujours par centrifugation, plusieurs lavages de la colonne sont effectués avec les tampons RW1 et RPE du kit afin d'éliminer l'ADN et les protéines de la colonne. Enfin, les ARN sont élués par une dernière centrifugation avec 50 µL d'eau RNase-free (fournie par le kit), puis congelés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

2 - RT-PCR

L'ARN est dégradé par les RNases. Ces enzymes, très résistantes car capables de se renaturer même après dénaturation par chauffage, sont présentes chez tous les organismes et notamment sur les mains du manipulateur. Ceci fait de l'ARN une molécule fragile, à manipuler avec précaution (port de gants, utilisation de vaisselle et de solutions stériles ou

traitées afin d'éliminer les RNases). C'est l'une des raisons pour lesquelles les ARNm vont être recopiés en ADNc simple brin, qui sont moins fragiles, par RT-PCR.

Cette étape est réalisée avec la transcriptase inverse Superscript[®] II (Life technologies), une enzyme catalysant la synthèse d'ADNc simple brin à partir d'une matrice d'ARN. Les ARNm vont être ciblés grâce à des amorces (appelées « oligo(dT) » dans ce manuscrit) ciblant la queue polyadénylée des ARNm matures, puis amplifiés comme lors d'une PCR classique.

La RT-PCR se fait sur 12 µL d'ARN totaux auxquels on ajoute 1 µL d'oligo(dT) à 0,2 µg/µL. Le tout est chauffé à 70 °C pendant 5 min afin de dénaturer les ARN, avant incubation sur glace. Sont ensuite ajoutés 6 µL du tampon 5X de l'enzyme, 2 µL de dNTP (Agilent Technologies) à 1,25 mM, 2 µL de dithiothréitol (DTT, Life technologies) à 0,1 M, 5 µL d'eau et 2 µL d'enzyme (ou d'eau, pour le contrôle négatif).

Ce mélange réactionnel est incubé à 25 °C pendant 30 min pour permettre aux oligo(dT) de s'hybrider aux ARNm, puis à 42 °C pendant 1 h 30 min pour l'élongation des amorces, et enfin à 70 °C pendant 15 min pour désactiver l'enzyme. En fin de réaction, les ADNc synthétisés sont dilués au dixième et peuvent être stockés à 4 °C pour une utilisation dans les 24 h, ou à -20 °C pour une utilisation plus éloignée dans le temps.

3 - qPCR

La dernière étape de la RT-qPCR permet d'amplifier et de quantifier, tout au long de la PCR, les ADNc correspondant aux gènes d'intérêt par l'utilisation d'amorces spécifiques (décrites dans le Tableau 4) et d'une sonde fluorescente. Cette dernière, le SYBR[®] Green (applied biosystems), ne fluoresce que lorsqu'elle se fixe sur de l'ADN double brin. Ainsi, plus il y a d'ADN synthétisé, plus la fluorescence augmente. Celle-ci est mesurée par le système de détection Gene Amp 7500.

3a - Procédure expérimentale

La qPCR se fait dans les puits d'une plaque 96 puits (Thermo scientific, AB-1900). Chaque puits contient le mélange réactionnel suivant : 10 µL de SYBR[®] Green, 4,8 µL d'eau, 0,1 µL d'amorce sens à 25 µM, 0,1 µL d'amorce anti-sens à 25 µM et 5 µL d'ADNc (obtenu avec ou sans transcriptase inverse) ou d'eau (contrôle négatif).

Le protocole d'amplification est le suivant : 50 °C pendant 2 min, puis 95 °C pendant 10 min, et enfin 40 cycles composés de deux étapes à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

Les amorces utilisées, certaines conçues grâce au logiciel Primer-BLAST disponible sur le site internet PubMed, les autres tirées d'articles, sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Gène ciblé	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amplicon	Source
<i>ALG9</i>	5'-GCAGGCCAGGCAATGTCACG-3'	5'-ACCGGTGCCTTCACACCACC-3'	110 nt	Primer-BLAST
<i>OLE1</i>	5'-ACTACGCTGTCGGTGGTGTTC-3'	5'-GGCCCCACCATTAGCGGACC-3'	144 nt	Primer-BLAST
<i>HXT4</i>	5'-CCAGCTGATGCTTTGTCGCCAG-3'	5'-CGGAGGCGGGCTTCTTTGGA-3'	151 nt	Primer-BLAST
<i>FUR4</i>	5'-TGCCGGTGTGTCTGCTCAGA-3'	5'-AACCGGCAAGCAAGGAGCC-3'	170 nt	Primer-BLAST
<i>OPT2</i>	5'-TGTCTGGGGTGCAATTGGGCC-3'	5'-CCCCAGCGCTTCCAAACACC-3'	117 nt	Primer-BLAST
<i>PTR2</i>	5'-GCCGACCAGCTTCCTAAGCGG-3'	5'-ATAGGCCGCCCAGAACCCT-3'	186 nt	Primer-BLAST
<i>GAPDH</i>	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	87 nt	(Potiron <i>et al.</i> , 2007)
<i>HIF1</i>	5'-CCGCAAGCCCTGAAAGCGCA-3'	5'-GCTCTGTTTGGTGAGGCTGTCCG-3'	256 nt	(Potiron <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la qPCR

ALG9 (Asparagine-Linked Glycosylation) a été utilisé comme gène de ménage chez la levure. *OLE1* code pour l'enzyme désaturant les AGS chez la levure. *HXT4*, *FUR4*, *OPT2* et *PTR2* sont les gènes des transporteurs de glucose, d'uracile, d'oligopeptides et de peptides, respectivement, chez la levure. *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) a été utilisé comme gène de ménage chez l'humain. *HIF1* est le gène codant pour le facteur 1 de transcription humain induit par l'hypoxie. Les amorces utilisées pour l'étude menée chez la levure ont été synthétisées par la société Invitrogen, alors que celles utilisées pour l'étude menée chez l'humain ont été synthétisées pas la société Eurofins MWG Synthesis GmbH.

3b - Analyse des résultats

Au terme des 40 cycles d'amplification, on obtient pour chaque puits une courbe

d'amplification (Figure 30A) correspondant à l'intensité de fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles effectués. Au cours de l'amplification, la fluorescence augmente de manière exponentielle jusqu'à atteindre un plateau. Un seuil de fluorescence est fixé dans la zone de croissance exponentielle de la courbe (Figure 30B, seuil fixé à 0,4). Ce seuil permet de déterminer le Ct de chaque amplification, c'est-à-dire le nombre de cycles effectués pour atteindre ce seuil de fluorescence. Plus il y a d'ADNc ciblé par le couple d'amorces en question, moins il faudra effectuer de cycles d'amplification pour arriver à ce seuil de fluorescence.

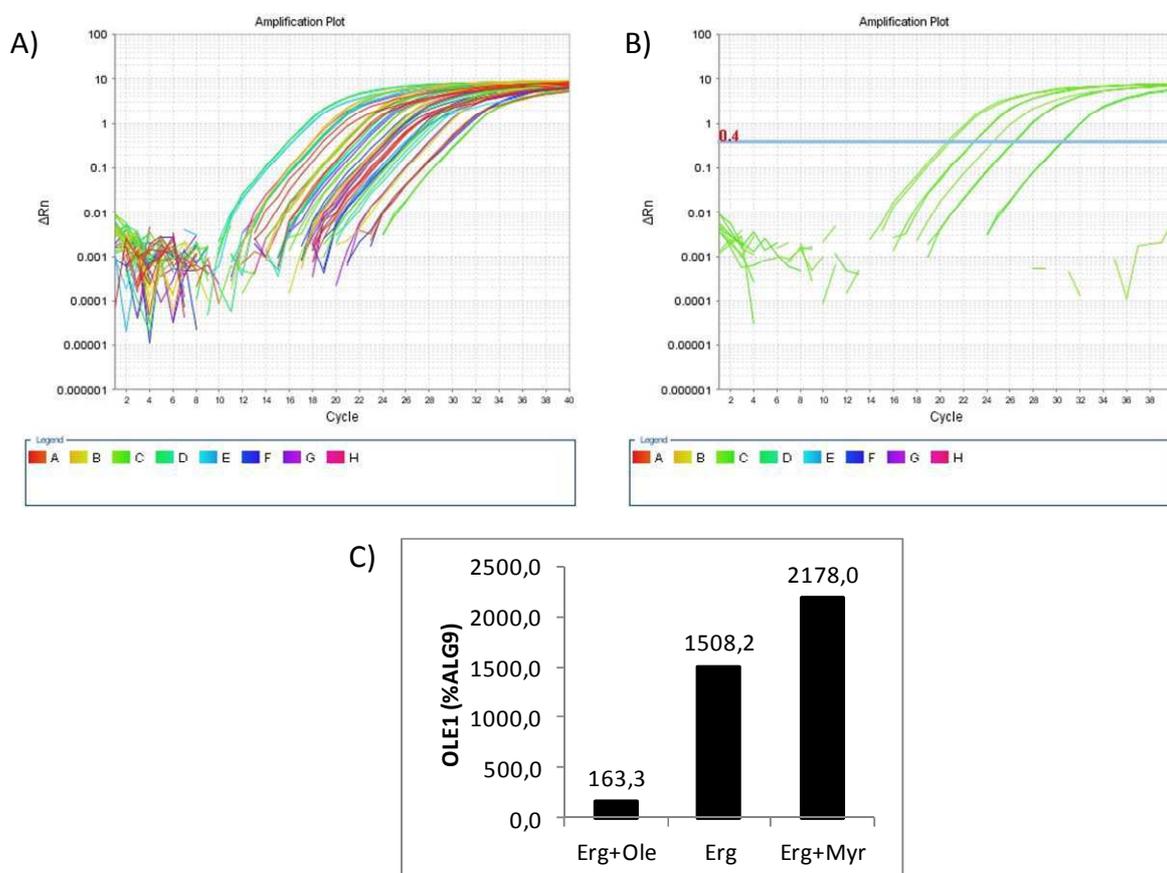


Figure 30 : Analyse des résultats de qPCR

A) Courbes d'amplification de tous les puits d'une plaque. B) Courbes d'amplification obtenues pour un couple d'amorce avec un seuil de fluorescence fixé à 0,4. C) Expression du gène *OLE1*, exprimé en pourcentage de l'expression d'*ALG9*, après culture des levures en présence d'ergostérol + oléate, ergostérol seul, et ergostérol + myriocine.

Les Ct obtenus pour chaque couple d'amorces vont nous permettre de quantifier l'expression des gènes ciblés. Pour pouvoir comparer l'expression des gènes cibles dans différentes conditions, il est nécessaire de les calibrer. Pour cela, le ΔCt , différence entre le Ct obtenu pour le gène ciblé et le Ct obtenu pour le gène de ménage (dont l'expression ne varie

pas), est calculé comme suit :

$$\Delta Ct = Ct \text{ gène ciblé} - Ct \text{ gène de ménage}$$

Puis, le ΔCt est exprimé en pourcentage d'expression du gène de ménage (Figure 30C) grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ du gène de ménage} = 100 \times 2^{-\Delta Ct}$$

Ces gènes de ménage sont *ALG9* (Asparagine-Linked Glycosylation) pour une étude chez la levure, et *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) pour l'humain.

3c - Validation des amorces

Les séquences des amorces utilisées pour cibler les gènes de levure ont été obtenues grâce au logiciel Primer-BLAST, mis à disposition sur le site de PubMed. Les couples d'amorces, avant d'être utilisés, doivent être validés. Pour cela, il faut vérifier que l'amplification de l'ADNc obtenue avec ce couple d'amorces est bien spécifique et « linéaire ».

La spécificité du couple d'amorces pour un ADNc cible est, au préalable, vérifiée au moment de la construction des amorces sur le logiciel Primer-BLAST. En effet, après avoir généré plusieurs couples d'amorces, ce logiciel vérifie dans les bases de données que ces amorces ne s'hybrident qu'au gène ciblé.

La spécificité de l'amplification, c'est-à-dire l'amplification d'un seul produit PCR, se vérifie dans un premier temps à la fin de la manipulation, avec les courbes de fusion obtenues pour un couple d'amorces, représentant les variations de fluorescence émise en fonction de la température. Le calcul de la dérivée de ces courbes donne des pics correspondant à la valeur de la température de fusion du couple d'amorce (Figure 31). Si un seul pic est observé pour un couple d'amorce, alors l'amplification est spécifique. Cette spécificité est par la suite confirmée par une électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.

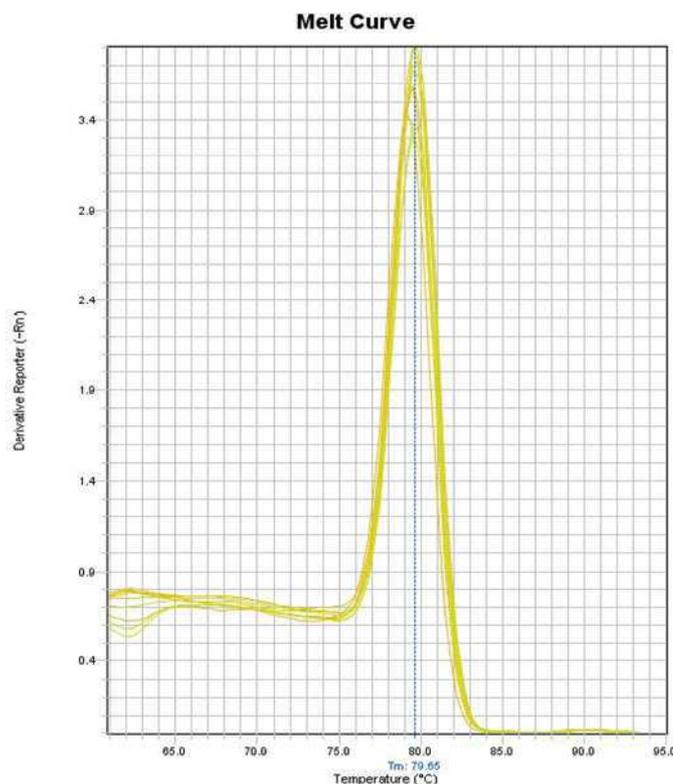


Figure 31 : Dérivée d'une courbe de fusion obtenue pour un couple d'amorces

Pour être validé, un couple d'amorces doit également amplifier un ADNc cible de manière linéaire. En effet, il existe une relation linéaire entre la quantité d'ADNc cible présente dans le milieu réactionnel et le Ct obtenu après amplification. Si on représente le Ct en fonction du log base 10 de la concentration en ADNc, on obtient une droite standard (Figure 32) par régression linéaire. Un couple d'amorces respecte la relation de linéarité si la pente de la droite est comprise entre 3,3 et 3,4, et si le coefficient de corrélation (R^2) est supérieur à 0,99.

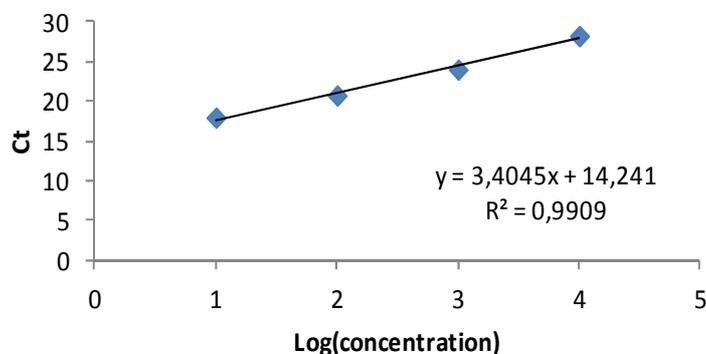


Figure 32 : Droite standard obtenue pour un couple d'amorces avec plusieurs concentrations d'ADNc

IV - Méthodes de biochimie

A - Mesure de l'activité β -galactosidase

L'induction de l'UPR a été étudiée en mesurant l'activité β -galactosidase des levures transformées par le plasmide pPW344. Ce dernier comporte quatre séquences d'activation UPRE (UPR element) dans le promoteur minimal CYC1 en amont du gène *LacZ*, codant pour la β -galactosidase. En cas d'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, les protéines régulatrices de l'UPR vont se fixer sur les UPRE du plasmide induisant ainsi la transcription du gène *LacZ*, puis sa traduction en β -galactosidase. Mise en présence d'ONPG (Ortho-nitrophényl- β -galactoside, incolore), un analogue structural de son substrat naturel, le lactose, une coloration jaune va apparaître suite à l'hydrolyse de l'ONPG par la β -galactosidase en ortho-nitrophénol (o-nitrophénol, jaune) et galactose (incolore). Ainsi, plus il y aura de β -galactosidase synthétisée, plus la coloration sera jaune, ce qui renseigne sur le taux d'induction de l'UPR.

Le test s'effectue sur 10^8 cellules. Après centrifugation, le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire peut être stocké à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation ultérieure.

Le culot est repris dans 1,5 mL de tampon Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoéthanol, pH 7). Afin d'évaluer le nombre de cellules prises en compte pour le test, 100 μL de la suspension sont prélevés et dilués au 1/10 dans de l'eau osmosée pour une mesure d'absorbance à 600 nm (DO_{600}). Les cellules en suspension restantes sont alors lysées par ajout de 100 μL de sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1% (m/v) et de 200 μL de chloroforme grâce à une agitation au vortex pendant 30 s. Après décantation, 400 μL de la phase supérieure sont transférés dans un tube à hémolyse. Ces 400 μL constituent le volume (V) de cellules utilisé pour le test. 600 μL de tampon Z sont ajoutés.

La réaction est initiée par l'addition de 200 μL d'ONPG à 4 mg/mL (préparé extemporanément dans du tampon Z) au temps $t=0$. Le tube est placé dans un bain marie à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune. La réaction est alors stoppée par l'ajout de 500 μL de NaCO_3 1 M (la β -galactosidase étant inactive à pH alcalin) et le temps de réaction (t) est noté.

Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 800 g, afin de culoter les débris

cellulaires. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube à hémolyse propre pour une mesure d'absorbance à 420 nm (DO_{420}) afin de déterminer la quantité d'o-nitrophénol formé et à 550 nm qui permettra d'estimer la contamination par les débris cellulaires.

L'activité β -galactosidase est estimée *via* l'équation suivante :

$$1000 \times \frac{DO_{420} - (1,75 \times DO_{550})}{t \times V \times DO_{600}}$$

où t est le temps de réaction exprimé en min, et V le volume de cellules utilisé exprimé en mL.

B - Détection et quantification de l'apoptose

L'induction de l'apoptose, la mort cellulaire programmée des cellules, a été mesurée grâce au kit de détection ELISA^{PLUS} de Roche Diagnostics. Ce kit utilise la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), qui, par l'utilisation d'anticorps spécifiques, permet de doser une protéine dans un liquide biologique. Le test ELISA de ce kit cible les oligonucléosomes issus de la fragmentation de l'ADN nucléaire, le stade ultime de l'apoptose.

L'immunodétection (Figure 33) se fait grâce à deux anticorps (Ac) : le premier Ac dirigé contre les histones des oligonucléosomes est couplé à la biotine qui interagit avec la streptavidine qui recouvre les puits de la plaque fournie par le kit ; le deuxième Ac dirigé contre l'ADN des oligonucléosomes est couplé à une enzyme, la HRP (horseradish peroxidase), qui mise en contact avec son substrat, l'ABTS[®], donnera une coloration verte, dont l'intensité sera mesurée par spectrophotométrie.

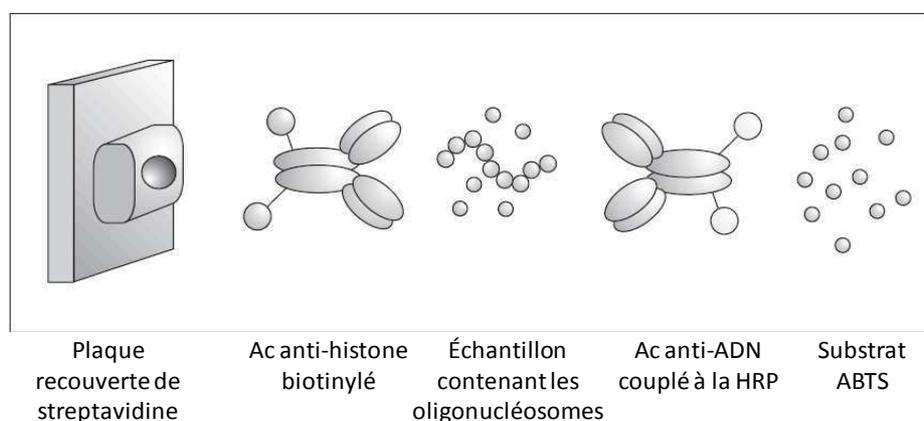


Figure 33 : Schéma récapitulatif du principe du test ELISA^{PLUS} pour la détection de l'apoptose
Modifiée d'après Roche Diagnostics.

Avant l'utilisation du kit, des plaques 96 puits adaptées à la culture cellulaire sont ensemencées à 10^4 cellules par puits. Une fois que les cellules ont adhéré au support, c'est-à-dire environ 4 h après l'ensemencement, celles-ci sont traitées avec des acides gras comme indiqué dans le chapitre II 1332 – Conditions de culture. Après centrifugation de la plaque à 200 g, pendant 10 min, le surnageant est éliminé. Les culots cellulaires sont repris dans 200 μ L de tampon de lyse et l'ensemble est incubé 30 min à température ambiante. Après centrifugation de la plaque pendant 10 min à 200 g, 20 μ L de surnageant sont transférés dans les puits d'une plaque dont les 96 puits sont recouverts de streptavidine. Seront également déposés sur la plaque un contrôle positif constitué de complexes ADN-histones, et un tampon d'incubation (blanc pour la mesure de DO). 80 μ L d'immuno-réactifs (mélange des Ac anti-histone biotinylés et Ac anti-ADN couplés à la HRP) sont ajoutés. La plaque est couverte d'un film adhésif avant d'être placée sous agitation à 300 rpm (agitateur de plaque IKA[®] MS2 Minishaker), pendant 2 h à température ambiante. Après avoir éliminé la solution, les puits sont rincés trois fois avec 250 μ L de tampon d'incubation. Après élimination de ce dernier, 100 μ L de substrat ABTS[®] sont ajoutés. La plaque est mise sous agitation jusqu'à l'apparition d'une coloration suffisante pour la mesure de DO. La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 μ L de solution ABTS[®] Stop, avant de mesurer la DO_{405} à l'aide d'un spectrophotomètre adapté à la lecture de plaques (Mithras LB940, Berthold Technologies).

C - Western blot

La technique du Western blot permet d'étudier de manière spécifique, l'expression d'une protéine dans un échantillon biologique. Une fois les protéines extraites des cellules, celles-ci sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse, puis transférées sur une membrane où les protéines d'intérêt seront détectées par un Ac primaire, puis révélées par un Ac secondaire couplé à une enzyme. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence l'induction de l'UPR dans les cellules humaines, en étudiant le taux de phosphorylation de la protéine eIF2 α (voir Introduction, chapitre II- A- 3a- L'UPR).

1 - Extraction, dosage et préparation des échantillons protéiques

Toutes les étapes nécessaires à l'extraction des protéines, effectuées à partir de cellules cultivées sur des boîtes de 6 cm de diamètre jusqu'à 80% de confluence, doivent se faire sur glace et avec des solutions stockées à 4 °C, afin de limiter la dégradation des protéines.

Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS. Après élimination du PBS, un volume

(10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) de tampon de lyse (Tris HCl 10 mM, pH 7,5 ; DOC 0,5% (m/v) ; NP-40 1% (v/v)) additionné de 2% (v/v) du cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete (Roche) et de 1% du cocktail 3 d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma) est déposé sur les boîtes. Ce tampon permet de solubiliser les membranes et d'en extraire les protéines sans les altérer. Les cellules sont récupérées de façon mécanique à l'aide d'un grattoir, transférées dans des tubes 1,5 mL propres et vortexées avant d'être incubées sur glace pendant 30 min. Après un nouveau passage au vortex, les lysats sont centrifugés à 4 °C, 14 000 rpm (rotor Awel SL180), pendant 5 min afin de les clarifier. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et dosé par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma).

La méthode BCA utilise deux types de solutions : du sulfate pentahydrate de Cu^{2+} et de l'acide bicinchoninique (BCA). Le Cu^{2+} forme un complexe avec les protéines et peut ensuite être réduit en Cu^{1+} en présence de certains aa ou de liaisons peptidiques (Wiechelman *et al.*, 1988). Le BCA, quant à lui, forme un complexe de couleur violette avec le Cu^{1+} dont l'intensité, mesurée par spectrophotométrie à 562 nm, est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Le protocole utilisé est très simple : dans un tube à hémolyse, 3 μL d'échantillon à doser (ou de tampon de lyse pour le blanc) dilués dans 47 μL d'eau sont mis en présence de 1 mL de sulfate pentahydrate de Cu^{2+} dilué au 1/50 dans du BCA. Le tube est vortexé puis incubé à 37 °C, à l'obscurité (le réactif étant sensible à la lumière) pendant 30 min. Après un autre passage au vortex, la DO_{562} des échantillons est mesurée.

Afin de déterminer la quantité de protéines contenue dans les échantillons, il est nécessaire d'effectuer, au préalable, une gamme étalon de BSA, c'est-à-dire des échantillons contenant des quantités (en μg) croissantes de BSA. La détermination de la DO_{562} de cette gamme va permettre de tracer une droite étalon représentant la DO_{562} en fonction de la quantité (en μg) de BSA. En reportant les valeurs de DO_{562} mesurées pour les échantillons de protéines sur cette droite, la quantité de protéines de ceux-ci pourra être déterminée.

Une fois les échantillons dosés, les volumes de lysats adéquats sont complétés avec du tampon de lyse afin d'obtenir des échantillons à 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines, puis un volume identique de solution Laemmli 2X (Sigma, Tris HCl 125 mM, pH 6,8 ; SDS 4,5% (v/v) ; glycérol 30% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,002% (m/v)) est ajouté. Après un passage au vortex, les échantillons ainsi préparés sont dénaturés à 37 °C pendant 1 h, avant d'être stockés à -20 °C. Cette façon de préparer les échantillons permet de travailler avec des lysats de

même concentration, et donc de déposer les mêmes volumes de lysat pour l'électrophorèse.

2 - Electrophorèse et transfert sur membrane

Les protéines (dépôt de 20 µg de protéines) sont séparées sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) composé d'un gel de séparation à 8%, et d'un gel de concentration à 5% (Tableaux 7 et 8), coulés l'un après l'autre dans une cassette Invitrogen (1 mm d'épaisseur), placée dans une cuve d'électrophorèse Xcell Surelock™ (Invitrogen). Un marqueur de poids moléculaire, le RPN800E (GE Healthcare), est utilisé afin de suivre la migration des protéines d'intérêt dans le gel. La migration des protéines se fait dans du tampon d'électrophorèse TG-SDS 10X (Tris 0,25 M, glycine 1,92 M, SDS 1% (v/v), Interchim) dilué au 1/10, à 30 mA, pendant 1h à l'aide d'un générateur PowerEase500 (Invitrogen).

	Gel de séparation à 8%	Gel de concentration à 5 %
Eau	3,3 mL	2,6 mL
Tampon 4X (Tableau 8)	1,5 mL	1 mL
Acrylamide-bisacrylamide	1,2 mL	400 µL
TEMED	6 µL	4 µL
Persulfate d'ammonium 10% (m/v)	60 µL	40 µL

Tableau 7 : Composition des gels de polyacrylamide

	Tampon 4X pour gel de séparation	Tampon 4X pour gel de concentration
Tris	18,07 g	6,06 g
SDS 10% (w/v)	4 mL	4 mL
Eau	qsp 100 mL	qsp 100 mL
pH	8,8	6,8

Tableau 8 : Composition des tampons pour les gels de séparation et de concentration

Suite à l'électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Pour cela, un « sandwich » (3 mousses/1 papier Whattman/gel/membrane nitrocellulose/papier Wattman/3 mousses) est effectué puis placé dans une cassette de transfert Invitrogen. Le montage est placé dans la cuve d'électrophorèse. Du tampon de transfert froid (Tableau 9) est ajouté au niveau de la cassette de transfert, et de l'eau froide ainsi que de la glace de part et d'autre de la cassette dans la cuve. Le transfert se fait à 200 mA, pendant 1 h.

Tampon de transfert		CAPS 10X	
Méthanol 100%	50 mL	CAPS	22,19 g
CAPS 10X	50 mL	Eau	qsp 1 L
Eau	400 mL	pH	11,8

Tableau 9 : Composition du tampon de transfert

3 - Immunodétection

Le transfert effectué, la membrane est récupérée et lavée trois fois avec du PBS, avant d'être incubée pendant 2 h, sous agitation à 4 °C, dans du TBS-Tween 20 0,1% (v/v, TBS-T) contenant 5% (m/v) de lait afin de saturer les sites sur lesquels les Ac pourraient se fixer de manière aspécifique. Après 3 lavages successifs de la membrane avec du TBS-T sous agitation, à 4 °C, pendant 5 min, celle-ci est découpée en s'aidant du marqueur de poids moléculaire, et les fragments de membranes sont incubés avec les Ac primaires (dont la provenance et les dilutions dans du TBS-T contenant 5% (m/v) de lait sont indiquées dans le Tableau 10) correspondants aux protéines ciblées, à 4 °C, sous agitation douce, sur la nuit. Après 3 lavages de la membrane avec du TBS-T, à 4 °C, sous agitation et pendant 5 min, celle-ci est incubée avec un Ac secondaire (tableau 10) dirigé contre les IgG de l'organisme dans lequel les Ac primaires utilisés ont été produits, et couplé à la HRP, à 4 °C, sous agitation, pendant 2 h.

Après 3 lavages de la membrane avec du TBS-T, les protéines d'intérêt sont révélées à l'aide du kit Enhanced Chemiluminescence™ (ECL) Western Blotting Analysis System (GE Healthcare), sur des films photographiques High Performance Chemiluminescence Film (GE Healthcare). Les signaux obtenus sont scannés puis quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ.

Anticorps	Dilution utilisée	source
Polyclonal rabbit anti-eIF2	1/500	Cell signaling Technology
Polyclonal rabbit anti-Phospho-eIF2	1/200	Cell signaling Technology
Polyclonal mouse anti-β-tubuline	1/2000	GE Healthcare
anti-rabbit IgG HRP-linked	1/5000	GE Healthcare
anti-mouse IgG HRP-linked	1/5000	GE Healthcare

Tableau 10 : Récapitulatif des anticorps utilisés

Tous les Ac nommés dans ce tableau ont été dilués dans du TBS-T contenant 5% (m/v) de lait écrémé.

D - Etude des lipides

1 - Extraction des lipides totaux

Pour l'étude des phospholipides, les extractions de lipides totaux se font selon la méthode décrite par Folch (Folch *et al.*, 1951), dans laquelle l'utilisation de solvants permet, après une lyse mécanique des cellules, de dénaturer et précipiter les protéines et de solubiliser les lipides.

10^8 levures ou 10^6 cellules humaines sont récoltées par centrifugation puis lavées à l'eau distillée pour les levures et au PBS pour les cellules humaines. Après centrifugation et élimination du surnageant les culots cellulaires sont repris dans 1 mL d'eau distillée puis transférés dans des tubes à essai en verre pyrex à bouchon (16 mm de diamètre, Pyrex Labware) auquel on rajoute 500 μ L de billes en verre (0,6 mm de diamètre, Fisher scientific Bioblock) et 4 mL de chloroforme:méthanol 2:1 (v/v). Les tubes sont agités pendant au moins 1 h à 1 500 rpm grâce à un agitateur de tubes IKA[®] VXR basic Vibrax[®] (SIGMA[®]) équipé d'une plateforme pouvant accueillir 36 tubes (IKA[®], SIGMA[®]). Après centrifugation des tubes à 1 500 rpm (rotor 1323 de la centrifugeuse Hettich Universal 2S) pendant 5 min, la phase supérieure aqueuse est éliminée. La phase organique restante est lavée avec 1 mL de 2N KCl/Méthanol 4:1 (v/v), sous agitation pendant 10 min. Après une autre centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, la phase supérieure aqueuse est encore une fois éliminée. La phase organique est de nouveau lavée avec un mélange de chloroforme/méthanol/eau 3:48:47 (v/v/v), sous agitation pendant 10 min. Après centrifugation, la phase supérieure aqueuse est éliminé et la phase organique est transférée dans un tube propre où elle sera lavée encore une fois avec du chloroforme/méthanol/eau 3:48:47 (v/v/v), sous agitation pendant 10 min. Ce lavage doit être répété jusqu'à ce que la limite entre les deux phases (aqueuse et organique) soit propre. Après une dernière centrifugation et l'élimination la phase supérieure aqueuse, la phase organique est transférée dans un tube à hémolyse en verre afin d'être évaporée sous flux d'azote.

Selon la classe de lipides étudiée et le type d'expérience à effectuer, les extraits lipidiques ne seront pas resuspendus dans le même solvant.

2 - Purification des phospholipides sur colonne de silice

Suite à l'évaporation des extraits lipidiques totaux sous flux d'azote, les échantillons

sont repris dans 2 mL de dichlorométhane pour la purification des PL sur colonne de silice (Agilent Bond Elut SI, 1 mL, Agilent Technologies).

Les colonnes de silice sont préalablement lavées avec 3 mL de méthanol puis 2 mL de dichlorométhane. Les échantillons de lipides sont alors déposés sur les colonnes. Les PL et la silice étant des molécules polaires, celles-ci vont interagir. En effet, les PL vont s'adsorber à la colonne de silice. Un premier lavage de la colonne avec 2 mL de dichlorométhane va permettre d'éliminer les lipides non polaires. Les glycolipides seront par la suite éliminés par un deuxième lavage avec 3 mL d'acétone. Enfin, les PL sont élués par l'ajout de 2 mL de chloroforme/méthanol/eau (50:45:5, v/v/v), puis évaporés sous flux d'azote.

3 - Analyse en spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) permet de détecter et d'identifier des molécules organiques, mais aussi de caractériser leur structure chimique en les fragmentant. Cette technique consiste à séparer des molécules chargées (ions) en phase gazeuse en fonction de leur rapport m/z (masse/charge). En effet, le bombardement électronique d'une molécule organique va entraîner son ionisation, positive ou négative selon le type de solvant dans lequel l'échantillon est repris. Les ions moléculaires ainsi obtenus renseignent sur la masse molaire de la molécule. Des ruptures de liaisons chimiques peuvent également se faire au sein de cet ion moléculaire donnant lieu à des ions fragments caractéristiques de l'espèce étudiée. Ces ions fragments sont alors séparés grâce à un champ magnétique et/ou électrique, en fonction de leur rapport m/z , et constituent le spectre de masse de la molécule étudiée.

Pour les analyses d'extraits lipidiques totaux ou de PL purifiés sur colonne de silice en MS, les échantillons, après évaporation des solvants, sont repris dans 100 μ L de diéthylamine pour une analyse en « mode ionisation négative » (sphingolipides) ou dans 100 μ L de d'acide formique pour une analyse en « mode ionisation positive ». Les échantillons de lipides ont été analysés grâce au spectromètre de masse PerkinElmerSciex Instruments API 165. Les spectres obtenus ont été traités à l'aide du logiciel MassLynx v4.1 afin d'attribuer une intensité à chaque valeur de m/z . Le profil moléculaire du sphingolipide inositol phosphocéramide (IPC) a été établi en mode ionisation négative, grâce à l'identification de l'ion fragment ayant un rapport m/z de 241, caractéristique de la déshydratation de l'inositol phosphate. Le profil moléculaire des PC, quant à lui, a été établi en mode ionisation positive, grâce à l'identification de l'ion fragment caractéristique des PC de rapport m/z de 184.

Les données provenant du logiciel MassLynx ont été copiées dans une feuille de calcul

Excel créée au sein du laboratoire, où les intensités de chaque valeur de m/z sont transformées en pourcentage du pic majoritaire (qui, lui, correspond à 100%). Le bruit de fond est éliminé par un seuil minimum d'intensité fixé à 5% du pic majoritaire. Pour les espèces de PC, l'identification des pics est réalisée par la comparaison automatique des valeurs expérimentales avec les valeurs théoriques calculées pour les espèces attendues.

4 - Purification des PC par chromatographie sur couche mince

Suite à l'évaporation des extraits lipidiques sous flux d'azote, les échantillons sont repris dans 100 μL de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) pour la purification des PC par chromatographie sur couche mince ou TLC (thin-layer chromatography).

Ce type de chromatographie permet de séparer les constituants d'un mélange grâce à deux phases non miscibles : une phase stationnaire qui est une plaque de verre recouverte de bandes de silice de faible épaisseur (plaque TLC) établissant des liaisons plus ou moins fortes avec les molécules à séparer ; et une phase liquide, un solvant, qui par capillarité, va entraîner et décrocher les molécules retenues par la phase stationnaire pour les séparer.

Avant de séparer les espèces lipidiques des échantillons, la plaque TLC (Whatmann, LK5) est prélavée avec du chloroforme/méthanol 1:1 (v/v) dans une cuve en verre adaptée (cristallisateur, Figure 34A). Après séchage sous une hotte aspirante, la plaque TLC est trempée dans une solution d'acide borique à 2,3% (m/v) préparée dans de l'éthanol. Elle est ensuite séchée, tout d'abord sous la hotte aspirante pendant 5 min, puis, une fois emballée dans du papier aluminium, dans un four Pasteur à 100 °C pendant 15 min. Les échantillons de lipides sont ensuite déposés dans la zone de concentration à environ 2 cm du bas de la plaque (Figure 34B) à l'aide d'une seringue Hamilton. La plaque est alors replacée dans le cristallisateur contenant 50 mL de chloroforme/éthanol/eau/triéthylamine (30/35/7/35, v/v/v/v). Le solvant, entraîné sur les couches minces de silice par capillarité, va permettre la séparation des différentes espèces de lipides contenues dans les échantillons. Après environ 2 h de migration et le séchage de la plaque sous hotte jusqu'à l'évaporation complète du solvant, une solution de primuline (5 mg dans 100 mL d'acétone/eau, 80:20, v/v), une molécule fluorescente hydrophobe, est vaporisée sur la plaque et les lipides sont visualisés sous UV (Figure 34C).

Les bandes correspondant à l'espèce recherchée (dans notre cas, des PC) sont identifiées grâce à l'ajout d'une molécule standard sur la plaque (Figure 34C), puis récupérées

et placées dans des tubes à hémolyse. L'éluion des PC de la silice se fait par deux lavages successifs avec 2 mL de chloroforme/méthanol/eau (5:5:1, v/v/v) et d'un dernier lavage avec 2 mL d'eau. Les surnageants sont récupérés à chaque étape puis placés dans un tube à hémolyse propre. Après une centrifugation de 8 min à 3 000 g, la phase organique inférieure contenant les PC est transférée dans un tube à hémolyse propre. Après dosage des PC, décrit dans le chapitre suivant, l'échantillon est évaporé puis repris dans 1 mL de chloroforme.

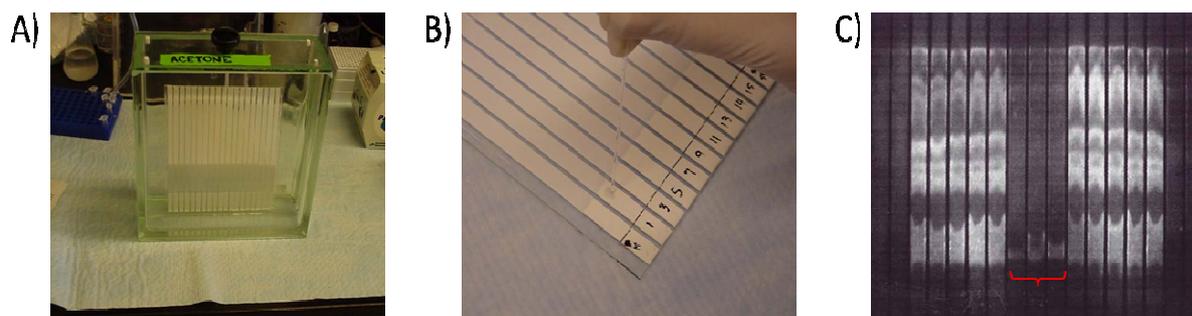


Figure 34 : Purification de PC par TLC

A) Lavage de la plaque TLC dans un cristalliseur. B) Dépôt des échantillons lipidiques sur la plaque. C) Visualisation des lipides par exposition aux UV après traitement à la primuline. L'accolade rouge montre les dépôts correspondants aux PC standards, dont différentes quantités (en μg) ont été déposées, permettant l'identification des PC dans nos échantillons.

5 - Dosage des PC par détermination colorimétrique

La quantité de PC extraits par TLC a été déterminée par une méthode colorimétrique (Stewart, 1980) utilisant comme réactif du ferrothiocyanate d'ammonium (2,8% FeCl_2 (m/v), 3% NH_4SCN (m/v)). La formation de complexes phospholipide-ferrothiocyanate d'ammonium donne une coloration rouge dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de phospholipides contenus dans l'échantillon, est déterminée par spectrophotométrie à 488 nm, par comparaison à une gamme étalon.

La réaction colorimétrique se fait par l'ajout de 1 mL de réactif à 2 mL d'échantillon (dilués au 1/40 et au 1/20 pour les échantillons de PC). L'ensemble est vortexé pendant 1 min, puis centrifugé 1 min à 1 000 g. La phase inférieure est récupérée et la DO_{488} est mesurée.

6 - Expérience de flottaison

L'effet des AGS sur la formation des vésicules a été étudié par des expériences de flottaison, effectuées en collaboration avec le Dr Joëlle Bigay de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université Sophia Antipolis.

La formation des vésicules COP I au niveau de l'appareil de Golgi débute par le

recrutement de la protéine Arf1 du manteau qui conduit au bourgeonnement de la membrane. Lorsque la courbure de ce bourgeonnement est suffisante, la protéine ArfGAP1 (chez l'homme) ou la protéine Gcs1p (chez la levure) est recrutée afin d'inactiver la protéine Arf1 et terminer le processus de vésiculation. Le recrutement de ces protéines se fait *via* un motif particulier appelé ALPS. Ce domaine protéique, non structuré en solution, s'insère majoritairement dans les membranes de forte courbure et les régions phospholipidiques peu ordonnées (Bigay *et al.*, 2005).

Dans les expériences de flottaison, des liposomes de diamètre variable ont été reconstitués à partir de PC extraits des levures *hem1Δ* cultivées en condition d'accumulation d'AGS ou en condition témoin. Ces liposomes ont été reconstitués à partir de PC (entre 1 et 1,3 mg) purifiés de levure, et évaporés sous vide jusqu'à obtenir des films homogènes. Ces films sont resuspendus à une concentration de 1 à 2,5 mM, dans une solution d'HEPES 50 mM, pH 7,2 et d'acétate de potassium 120 mM. Après cinq étapes de congélation/décongélation dans l'azote liquide, les suspensions de liposomes ont été extrudées de façon séquentielle à travers un extrudeur manuel (Avanti) équipé de filtres de polycarbonate dont la taille des pores diminue (0,4 ; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 et 0,03 mm). Après avoir estimé le rayon des liposomes obtenus par diffusion dynamique de la lumière (ou DLS, Dynamic Light Scattering), ceux-ci sont stockés à température ambiante et doivent être utilisés dans les 2 jours suivant l'extrusion.

Un mélange de liposomes et de protéines Gcs1p a été déposé dans la partie inférieure d'un gradient de saccharose (de la partie inférieure à la partie supérieure : 30%, 25% et 0% de saccharose). Après ultracentrifugation à 240 000 g, 20 °C, pendant 1 h, les liposomes ayant recruté ou non des protéines Gcs1p, se retrouvent dans la phase supérieure du gradient. 100 µL de cette fraction supérieure ont été collectés puis analysés sur gel SDS-PAGE. L'utilisation du colorant fluorescent sypro-orange (Molecular Probes) permet de visualiser la protéine Gcs1p et de la quantifier après exposition aux UV. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation de Gcs1p à la fraction microsomale considérée, par comparaison à la quantité totale de Gcs1p chargée (100%).

IV - Méthodes de microscopie

A - Microscopie confocale

La protéine de fusion Fur4p-GFP, dont l'expression a été induite dans la souche de

levure *hem1Δ* cultivée dans différents milieux, a pu être observée en microscopie confocale grâce à une station Olympus FV1000 équipée d'un microscope inversé à fluorescence (IX-81, Olympus). La fluorescence verte de la GFP a été enregistrée après une excitation à 488 nm, puis détectée par un détecteur spectral entre 500 nm et 530 nm. Les images ont été acquises grâce au logiciel FLUOVIEW™ v1.6. Des images en contraste interférentiel (transmission) ont également été réalisées.

B - Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) a été choisie pour la visualiser des vésicules de sécrétion, dont l'accumulation a été induite dans la souche de levures *hem1Δ*, *sec6^{ts}* par incubation à température non permissive (39 °C).

Un culot de 2.10^8 cellules a été préfixé avec du glutaraldéhyde à 10%, préparé dans du tampon cacodylate (Caco, 0,5 M, pH 6,9), pendant 30 min, puis fixé pendant 2 h dans la même solution avec 2% de glutaraldéhyde. Après une centrifugation à 75 g, les cellules ont été lavées deux fois avec du Caco à 0,5 M, puis postfixées pendant 2h avec du OsO₄ à 2%, préparé dans du Caco à 0,1 M. Suite à la fixation, les cellules ont été déshydratées incubation dans des solutions contenant des concentrations croissantes d'éthanol (de 50 à 100%). Les cellules ont alors été incorporées dans une résine (LR white). Une incubation à 60 °C pendant 24 h permet la polymérisation de la résine. Le bloc résultant, contenant les cellules, a été coupé à l'aide de l'ultramicrotome Leica UC6 équipé d'un couteau en diamant afin d'obtenir des coupes ultrafines de 60 nm d'épaisseur. Ces coupes ultrafines sont placées sur des grilles de carbone avant d'être incubées dans une solution d'acétate d'uranyle à 2% préparée dans de l'éthanol à 70% pendant 2 min, puis dans du citrate de plomb pendant 7 min, afin de contraster les échantillons. Enfin, les grilles sont examinées avec le microscope électronique Jeol 1010 à 80 kV. Les images sont acquises avec la caméra digitale Quemesa (Olympus).

VI - Méthodes de mesure d'activité des canaux ioniques

A - Efflux d'iodure

La mesure des efflux d'iodure, autrement dit la mesure des changements de concentrations en ¹²⁵I radioactif de part et d'autre de la membrane plasmique, nous a permis d'étudier la fonctionnalité du CFTR, mais également de deux autres canaux Cl⁻ (Cl_{Swell} et Cl_{Ca}), sur une population cellulaire. Cet iode radioactif émet un rayonnement γ qu'il est

possible de détecter et de quantifier.

L' $^{125}\text{I}^-$ a été préféré au $^{36}\text{Cl}^-$ pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les canaux chlorure ont une meilleure sélectivité pour l'iode que pour le chlore. De plus, les ions $^{125}\text{I}^-$ ont une demi-vie très courte (30 jours pour l'isotope ^{125}I contre 300 000 ans pour le ^{36}Cl). Enfin, l' $^{125}\text{I}^-$ est dix fois moins onéreux que le $^{36}\text{Cl}^-$.

Les cellules, cultivées dans des plaques 24 puits jusqu'à ce qu'elles atteignent 100% de confluence, sont rincées plusieurs fois avec du milieu d'efflux (NaCl 136,9 mM ; KCl 5,4 mM ; KH_2PO_4 0,3 mM ; NaH_2PO_4 0,3 mM ; NaHCO_3 4,2 mM ; CaCl_2 1,8 mM ; MgCl_2 0,8 mM ; MgSO_4 0,4 mM ; HEPES 10 mM ; Glucose 5,6 mM) afin d'éliminer les cellules mortes. Elles sont ensuite incubées dans 500 μL de solution de charge (milieu d'efflux contenant 1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{125}\text{I}^-$) pendant 1 h, au cours de laquelle la quantité d'iode radioactif s'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique.

Toutes les étapes qui suivent sont effectuées à l'aide du robot Multiprobe[®] IIEX de Packard. Plusieurs rinçages sont effectués avec du milieu d'efflux pour éliminer la radioactivité non incorporée avant de remettre 500 μL de solution d'efflux sur les cellules. Le surnageant est collecté toutes les minutes et placé dans un tube à hémolyse (pour un comptage ultérieur de la radioactivité) puis remplacé par un volume équivalent de solution d'efflux. Les trois premiers prélèvements correspondent à l'efflux basal de l' $^{125}\text{I}^-$, reflet de la sortie passive des ions $^{125}\text{I}^-$. Les six prélèvements suivants sont obtenus en présence d'agents pharmacologiques activant les canaux chlorure (choc osmotique pour les canaux Cl_{swell} sensibles au gonflement de la cellule, A23187 qui est un ionophore calcique pour les canaux Cl_{Ca} et Fsk+Gst pour le canal CFTR). La sortie d' $^{125}\text{I}^-$ est ainsi mesurée pendant 9 min. A la dixième minute, les cellules sont lysées pendant environ 30 minutes sous agitation grâce à l'ajout de 500 μL de NaOH (0,1 N) / 0,1% SDS (pH 7,4). Cette étape permet de récupérer la radioactivité résiduelle contenue dans les cellules et de déterminer la radioactivité totale. Enfin l'ensemble des fractions collectées dans les tubes à hémolyses sont mesurées en coups par minute (cpm) grâce à un compteur γ (Cobra[®] II, Packard).

Les résultats en cpm sont exprimés sous la forme de sortie d'ions $^{125}\text{I}^-$ (k) exprimée en min^{-1} . Ils sont calculés grâce à la formule suivante :

$$k = \frac{\ln(^{125}\text{I} t_1) - \ln(^{125}\text{I} t_2)}{t_2 - t_1}$$

où ^{125}I t_1 et ^{125}I t_2 sont respectivement la radioactivité mesurée (en cpm) aux temps t_1 et t_2 . Afin de s'affranchir des variations causées par la sortie passive des radioéléments, les résultats sont ensuite exprimés en $k_{\text{pic}}-k_{\text{basal}}$ (Figure 35).

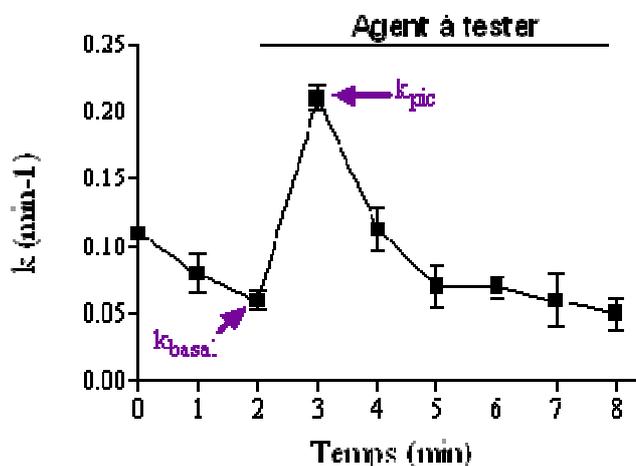


Figure 35 : Représentation graphique des efflux d'iodure

Le tracé représente l'évolution de la vitesse de sortie des ions ^{125}I radioactifs (k) en fonction du temps. Les k_{pic} et k_{basal} permettant de s'affranchir de la sortie passive des ions radioactifs sont indiqués par des flèches.

B - Mesure de l'activité calcique intracellulaire

Les variations calciques intracellulaires des lignées 16HBE14o⁻ et CFBE41o⁻ ont été mesurées grâce à la sonde fluorescente Fluo-4-acetoxymethyl-ester (Fluo-4-AM, FluoProbes[®]). La structure de cette sonde, présentée dans la Figure 36, dérive de chélateurs de calcium tels que l'EGTA ou le BAPTA, et lui permet de se lier de façon spécifique au calcium.

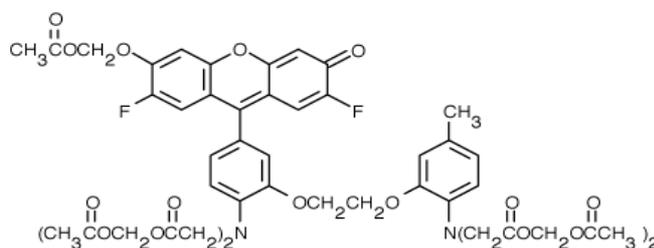


Figure 36 : Structure chimique de la sonde Fluo-4-AM

La sonde Fluo-4-AM est liposoluble. Cette propriété lui permet de pénétrer dans les cellules. Une fois dans le cytoplasme, elle est hydrolysée par les estérases cellulaires, ce qui rend la sonde capable de fixer le calcium intracellulaire. La longueur d'onde d'excitation de la sonde est de 488 nm, et celle d'émission de 522 nm. L'intensité de fluorescence émise est

directement proportionnelle à la quantité de calcium intracellulaire libre. Afin d'introduire la sonde Fluo-4-AM dans les cellules, celles-ci sont incubées pendant 20 min à température ambiante dans une solution de Krebs 2Ca^{2+} (NaCl 118,4 mM ; KCl 4,7 mM ; CaCl_2 2,5 mM ; KH_2PO_4 1,2 mM ; MgSO_4 1,2 mM ; NaHCO_3 25 mM ; Glucose 11,7 mM ; pH 7,4) contenant $3\ \mu\text{M}$ de Fluo-4-AM.

Pour des mesures de variation du calcium intracellulaire global, les cellules sont disposées sur le microscope inversé ZEISS Z1 équipé de la lampe COLIBRI. La fluorescence émise par la sonde, reflétant l'activité calcique intracellulaire, est mesurée toutes les 2 s pendant 5 min, puis analysée par le logiciel AxioVision v4.8.2.0. Pour cela, 12 cellules sont choisies dans le champ observé. La fluorescence basale de ces 12 cellules est mesurée pendant 1 min, avant l'ajout de $100\ \mu\text{M}$ d'ATP (adénosine triphosphate). En effet, l'ATP, en se fixant sur les récepteurs P2-purinergiques (récepteur couplé aux protéines Gq) présents à la surface des cellules, va enclencher une cascade d'évènements intracellulaires : i) activation de la phospholipase C, ii) accumulation d' IP_3 , iii) vidange des stocks calciques du RE dans le cytoplasme, iv) accumulation de DAG, v) activation de la PKC, vi) activation des canaux calciques de la membrane plasmique. Ainsi, la fluorescence émise dans le cytoplasme reflétera la totalité du calcium de la cellule (Figure 37).

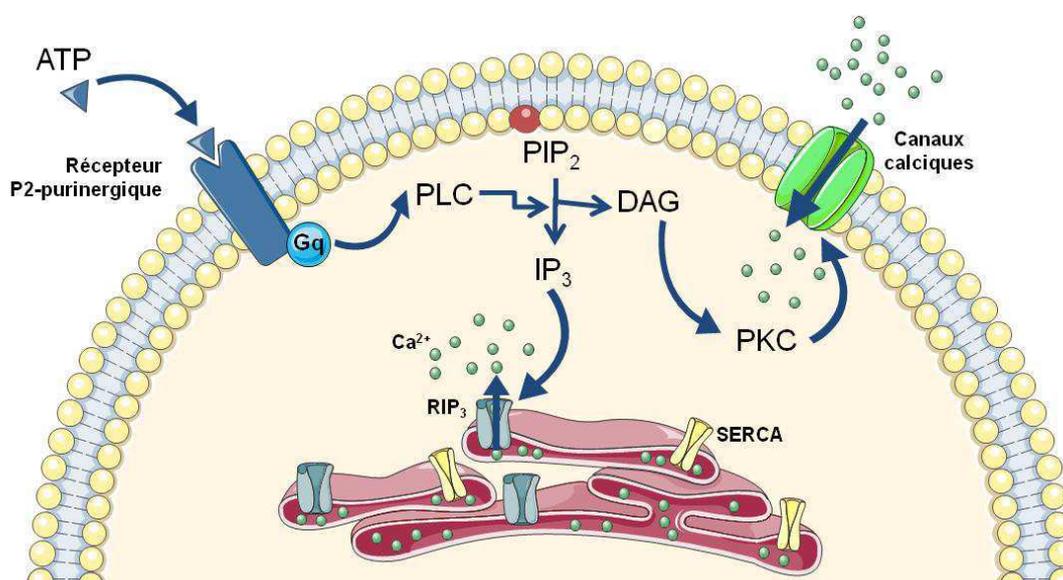


Figure 37 : Mobilisation calcique globale par l'ATP

La fixation de l'ATP sur le récepteur P2-purinergique entraîne l'activation de la protéine Gq. Celle-ci va à son tour activer la phospholipase C (PLC). Cette enzyme peut alors cliver le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3). L' IP_3 , après fixation sur son récepteur (RIP_3) localisé sur la membrane du RE, induit la sortie du calcium réticulaire dans le cytoplasme (vidange calcique). Le DAG, quant à lui, va activer la protéine kinase C permettant l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique et l'influx de calcium dans la cellule. La concentration calcique cytoplasmique sera par la suite rétablie par les pompes Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA), qui sont responsables de l'entrée du calcium dans le RE.

Pour des mesures de variation des réserves calciques du réticulum endoplasmique uniquement, la solution de Krebs 2Ca^{2+} contenant la sonde Fluo-4-AM est éliminée puis remplacée par de la solution Krebs 0Ca^{2+} (NaCl 118,4 mM ; KCl 4,7 mM ; KH_2PO_4 1,2 mM ; MgSO_4 1,2 mM ; NaHCO_3 25 mM ; Glucose 11,7 mM ; pH 7,4) afin d'éliminer les apports calciques extracellulaires, avant d'être placée sur le microscope inversé. Cette fois-ci, 10 μM de thapsigargine seront ajoutés. En effet, la thapsigargine est un inhibiteur spécifique des pompes SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases), des protéines membranaires du RE permettant de pomper le calcium cytosolique afin de le stocker dans le RE. L'inhibition de ces pompes va empêcher l'entrée de calcium dans le RE. L'augmentation de la fluorescence émise dans le cytoplasme reflète la fuite du calcium réticulaire *via* les récepteurs à IP_3 .

Les résultats sont exprimés en $(F/F_0) - 1$, où F correspond au signal fluorescent, et F_0 à l'intensité de fluorescence basale. L'aire sous courbe est calculée sous GraphPad Prism v6, puis représentée sous forme d'histogramme.

VII - Méthodes statistiques

Les résultats sont exprimés selon leur moyenne \pm SEM. Lorsque deux conditions sont comparées, la significativité statistique entre ces deux moyennes est calculée par le test *t* de student. Si plus de deux conditions sont comparées, la significativité statistique entre toutes les moyennes comparées est calculée par la méthode ANOVA (ANalysis Of VAriance) en combinaison avec un test de comparaison multiple de type Bonferroni ou Sidak.

RÉSULTATS

Chapitre I : Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion

Résumé de la première publication

Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties

Traffic, publié en ligne le 2 Octobre 2013, DOI: 10.1111/tra.12117.

Laurie-Anne Payet, Ludovic Pineau, Ellen C. R. Snyder, Jenny Colas, Ahmed Moussa, Brigitte Vannier, Joelle Bigay, Jonathan Clarhaut, Frédéric Becq, Jean-Marc Berjeaud, Clarisse Vandebrouck and Thierry Ferreira

Dans cette première publication, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires et cellulaires de la lipotoxicité associée aux AGS. Dans des études menées précédemment par notre équipe, il avait été montré, dans un modèle cellulaire eucaryote simple, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et en particulier la souche *hem1Δ* (voir Objectifs de l'étude, I- Comprendre l'implication des AGS sur la voie de sécrétion), qu'une accumulation d'AGS modifiait la fluidité des membranes (Deguil *et al.*, 2011), induisait l'UPR par une accumulation de protéines mal repliées dans le RE (Pineau *et al.*, 2009), altérait le trafic des protéines membranaires (Pineau *et al.*, 2008) et conduisait à la mort des cellules par apoptose (Pineau *et al.*, 2009). Dans la cellule, les AGS peuvent être intégrés dans des lipides complexes de type céramides/sphingolipides ou dans des PL. Notre objectif, dans ce premier article, était d'identifier les contributions relatives des céramides/sphingolipides et des PL saturés aux effets des AGS sur la voie de sécrétion et la survie cellulaire. Dans ce chapitre, nous ferons référence aux figures provenant de cette première publication. Celles-ci seront notées Fig. p1, suivi du numéro correspondant à la figure au sein de l'article.

Les AGS altèrent la morphologie des vésicules de sécrétion.

Il avait déjà été montré au sein de notre laboratoire avant le début de ma thèse, que Fur4p, notre protéine modèle, était bloquée à la sortie de l'appareil de Golgi en condition d'accumulation d'AGS (Pineau *et al.*, 2008). Ce blocage pouvant être corrigé par l'ajout d'oléate, nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle l'accumulation d'AGS pourrait altérer le processus de vésiculation à la sortie de l'appareil de Golgi, et par conséquent, le trafic de Fur4p. Afin de visualiser les vésicules de sécrétion émergeant du réseau *trans* golgien (TGN) « en route » vers la membrane plasmique, nous avons utilisé le double mutant

thermosensible *hem1Δ,sec6Δ^{ts}*, dont la culture en absence d'ALA permet d'accumuler des AGS, et à température non permissive (39 °C) de bloquer les processus d'exocytose et donc d'accumuler les vésicules de sécrétion. Ces dernières ont été visualisées en microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons ainsi pu montrer que le nombre de vésicules formées en condition d'accumulation d'AGS se trouvait divisé par 3 (Fig. p1-1A) par rapport au nombre de vésicules accumulées en conditions de culture normale. De façon surprenante, suite au blocage de l'exocytose, nous avons pu observer que les vésicules qui se forment dans des conditions d'accumulation d'AGS n'arboraient pas la structure sphérique des vésicules de sécrétion classiques (Fig. p1-1B) mais une structure polygonale (Fig. p1-1C à p1-1E). Un autre type de structures présentant une double membrane possède également cette organisation polygonale (Fig. p1-1C à 1-F). Cependant, malgré leur structure atypique, ces vésicules de sécrétion n'ont pas perdu leur capacité à cibler et à fusionner avec la membrane plasmique, puisqu'elles ne sont pas (ou peu) observées lorsque l'exocytose n'est pas bloquée.

Les AGS affectent donc la voie de sécrétion tardive, au niveau du TGN, en réduisant le nombre de vésicules de sécrétion à destination de la membrane plasmique, ce qui pourrait rendre compte d'une diminution de l'efficacité d'acheminement des protéines à la membrane plasmique par cette voie.

Les céramides/sphingolipides interviennent dans les étapes précoces de la voie de sécrétion.

L'altération de la morphologie du TGN pourrait provenir de l'impact indirect des AGS sur la régulation des gènes impliqués dans la formation des vésicules, notamment de ceux codant pour les protéines formant les manteaux protéiques nécessaires à la vésiculation. Afin de tester cette hypothèse, une analyse transcriptomique a été réalisée par Ellen Snyder lors de son stage de L3 au sein de notre équipe. Celle-ci a permis de mettre en évidence la dérégulation de 92 gènes en condition d'accumulation d'AGS (Table supplémentaire p1-S2), mais aucun en relation avec la formation des vésicules. De façon intéressante, 16 de ces gènes dérégulés sont en connexion directe avec l'homéostasie lipidique (métabolisme des stérols, PL et sphingolipides, Table p1-1). Certains de ces gènes présentent des homologues fonctionnels chez l'humain. C'est notamment le cas de *SCS7*, codant pour une enzyme catalysant l'hydroxylation des sphingolipides, dont l'expression est réprimée en condition

d'accumulation d'AGS. Son homologue humain, *FA2H* (fatty acid 2-desaturase), lorsqu'il est régulé négativement dans les adipocytes, est associé à une réduction de l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (Guo *et al.*, 2010). De façon intéressante, notre analyse transcriptomique a également mis en évidence la régulation négative par les AGS de quatre gènes codant pour des transporteurs de nutriments, que nous qualifieront également de perméases, parmi lesquels se trouvent celui codant pour notre protéine modèle, *FUR4* (perméase à uracile) et celui codant pour un transporteur de glucose *HXT4*, l'homologue levurien des transporteurs de glucose *GLUT*. *Scs7p* étant l'enzyme responsable de l'hydroxylation des sphingolipides, nous nous sommes demandés comment le taux d'hydroxylation pouvait influencer le trafic de Fur4p. Dans un premier temps, nous avons montré une diminution de l'hydroxylation des sphingolipides en conditions d'accumulation d'AGS (Fig. p1-2A). Puis, nous avons utilisé la souche *Scs7Δ*, dans laquelle le gène *Scs7* a été invalidé, transformée par le plasmide pFL38gF-GFP, contenant la construction de la protéine de fusion Fur4p-GFP sous le contrôle du promoteur inductible par le galactose *GAL10* (décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, I- D- Plasmides). En conditions d'accumulation d'AGS (dans la souche *hem1Δ*), Fur4p ne parvient pas à rejoindre la membrane plasmique (Fig. p1-2B et p1-2E). Dans la souche *Scs7Δ*, dans laquelle les sphingolipides ne sont pas hydroxylés (Fig. p1-2C), le trafic de Fur4p à la membrane plasmique est légèrement altéré mais pas complètement aboli (Fig. p1-2D et p1-2E). Ces résultats indiquent que le taux d'hydroxylation des sphingolipides est important pour le trafic optimal des protéines à la membrane plasmique mais qu'il n'est pas le seul acteur impliqué dans le blocage complet du trafic en cas d'accumulation d'AGS.

Les céramides/sphingolipides, du fait de leur abondance dans les radeaux lipidiques, ont un rôle critique dans le tri des protéines cargos à la sortie de l'appareil de Golgi et à destination de la membrane plasmique (Surma *et al.*, 2011; Surma *et al.*, 2012). Plutôt que le taux d'hydroxylation, nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle ce serait plutôt la quantité de céramides/sphingolipides qui serait impliquée dans le blocage du trafic de Fur4p à la membrane plasmique. Pour cela, nous avons procédé à une étude statistique plus poussée des données de transcriptomique. Ceci nous a permis de mettre en évidence que les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse précoce des sphingolipides étaient réprimés en condition d'accumulation d'AGS (Fig. p1-3A et B). Or, dans une étude précédente, nous avons montré que le taux de sphingolipides complexes augmentait dans ces conditions (Pineau *et al.*, 2008). Le palmitate, qui est l'AGS s'accumulant préférentiellement dans nos

expériences, est le substrat de la sérine palmitoyl transférase, l'enzyme impliquée dans la première étape de biosynthèse des sphingolipides (Figure 38). Une hypothèse raisonnable serait donc que, pour contrer les effets délétères d'une accumulation de céramides/sphingolipides, la cellule réagisse en régulant négativement les gènes impliqués dans leur biosynthèse.

De plus, l'accumulation de céramides/sphingolipides est connue pour réprimer l'expression de gènes de transporteurs de nutriments (Guenther *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2001; Skrzypek *et al.*, 1998), induisant la mort des cellules par privation nutritionnelle. Afin d'évaluer l'impact du taux de sphingolipides sur le trafic de Fur4p en condition d'accumulation d'AGS, la synthèse des sphingolipides a été inhibée par la myriocine, l'inhibiteur de la sérine palmitoyl transférase (Figure 38 et Fig. p1-3B). La myriocine n'a pas permis de restaurer le trafic de Fur4p à la membrane plasmique (Fig. p1-4A). Néanmoins, elle a permis de restaurer l'expression des gènes de transporteurs de nutriments (Fig. p1-4C) mais également d'abolir l'UPR induite par les AGS (Fig. p1-4D).

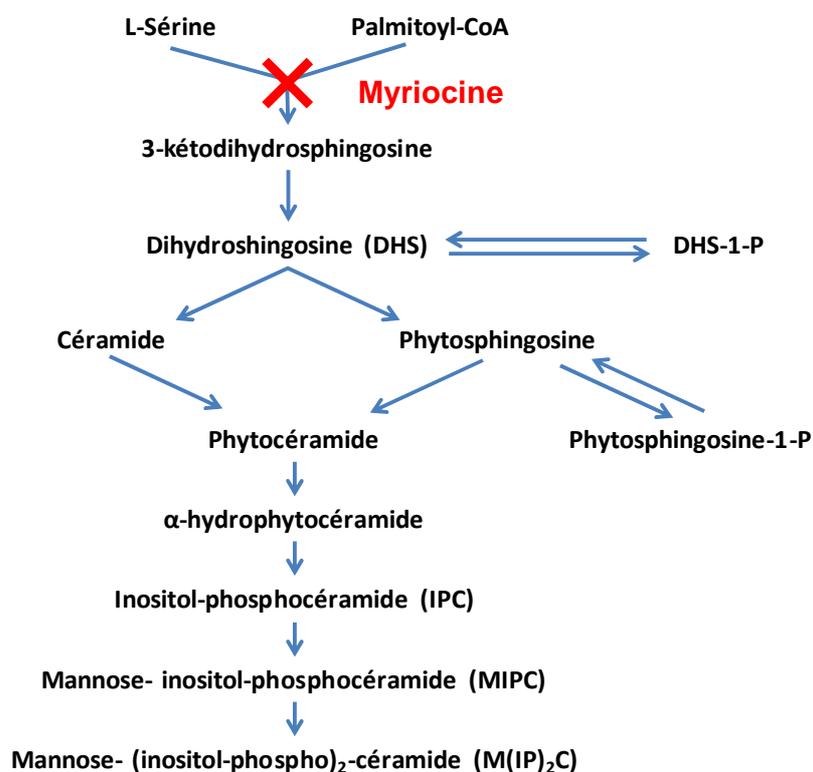


Figure 38 : Voie de biosynthèse des céramides/sphingolipides chez la levure

La myriocine est utilisée comme inhibiteur de la biosynthèse des céramides/sphingolipides. P : Phosphate.
Modifiée d'après (Dickson *et al.*, 2006).

Les céramides/sphingolipides ne sont donc pas les seuls acteurs du défaut de trafic de Fur4p à la sortie de l'appareil de Golgi, mais sont des modulateurs importants de la régulation transcriptionnelle des gènes de perméases et de l'induction de l'UPR. Ils agissent donc dans les étapes précoces de la voie de sécrétion.

Les PL saturés sont des régulateurs clés de la formation des vésicules au niveau du TGN.

Une caractéristique importante du RE et de l'appareil de Golgi réside dans la composition de leur membrane, riche en PL insaturés. Les taux de PL saturés, quant à eux, augmentent tout au long de la voie de sécrétion, pour atteindre un maximum au niveau de la membrane plasmique (Tableau 2). Des taux élevés de PL insaturés résultent en un « loose lipid packing », nécessaire au recrutement des protéines impliquées dans la formation des vésicules (voir chapitre Introduction, III- B- Formation des vésicules). La protéine Gcs1p, dont le recrutement est crucial pour terminer le processus de vésiculation, est impliquée dans le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le RE, mais aussi dans le transport vésiculaire post-golgien. Nous avons vu précédemment que les vésicules de sécrétion avaient une structure anormalement polygonale en condition d'accumulation d'AGS. Nous nous sommes alors demandés si le recrutement de Gcs1p pouvait tout de même s'effectuer dans ces conditions. Pour cela, nous avons utilisé la souche *hem1Δ,SEC7RFP*, permettant l'accumulation d'AGS et l'expression de Sec7p-RFP, une protéine résidente du *trans* Golgi fusionnée avec la protéine fluorescente RFP. Cette souche a été transformée par le plasmide pRS315-GCS1-GFP permettant l'expression de la protéine de fusion Gcs1p-GFP. Lorsque les AGS s'accumulent, Gcs1p n'est pas colocalisée avec la protéine résidente du TGN, Sec7p. Gcs1p semble, dans ces conditions, redistribuée dans le cytosol (Fig. p1-5).

Afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la formation des vésicules au niveau du TGN, une expérience de flottaison (décrite dans le chapitre Matériel et méthodes IV- D- 6- Expérience de flottaison) a été effectuée sur les PC purifiés à partir des levures *hem1Δ* cultivées en conditions d'accumulation d'AGS. Des liposomes de différents diamètres ont été générés avec ces PC et le recrutement de Gcs1p par ces liposomes a été déterminé. Le recrutement de Gcs1p augmente avec la courbure des liposomes (ceux de faible diamètre) composés de PC obtenus en condition normale de culture (Fig. p1-6B et 6D), alors que Gcs1p est très peu recrutée par les liposomes composés de PC obtenus en condition d'accumulation

d'AGS, quel que soit leur diamètre. En effet, lorsque les AGS s'accumulent, le taux de phospholipides saturés augmente, ce qui rend les membranes plus ordonnées/compactes. Comme nous l'avons déjà évoqué, plus que la courbure de la membrane, le recrutement de Gcs1p nécessite un « loose lipid packing » (voir chapitre Introduction, III- B- Formation des vésicules). Nos résultats montrent que, dans des membranes composées de PL saturés, l'augmentation de la courbure ne compense pas l'absence de « loose lipid packing ». Ce processus pourrait rendre compte de la localisation de Gcs1p dans le cytosol et pourrait participer à la réduction du nombre de vésicules formées au niveau du TGN dans des conditions d'accumulation d'AGS.

En conclusion de cette première publication, nous avons pu déterminer que lors d'une accumulation d'AGS, les céramides/sphingolipides agissaient de façon précoce dans la voie de sécrétion, en diminuant la transcription des gènes de transporteurs qui entrent dans la voie de sécrétion, mais également au niveau du RE avec le déclenchement de l'UPR. Nous avons également montré que les PL saturés agissaient plus tardivement dans la voie de sécrétion, sur le trafic des protéines, par une vésiculation altérée. En effet, lorsque les AGS s'accumulent, il y a moins de vésicules formées et leur structure est anormalement polygonale. Nous proposons également un mécanisme moléculaire pour expliquer ce problème de vésiculation : les membranes des vésicules en formation lors d'une accumulation d'AGS, sont trop ordonnées pour pouvoir recruter Gcs1p et terminer le processus de vésiculation.

Saturated Fatty Acids Alter the Late Secretory Pathway by Modulating Membrane Properties

Laurie-Anne Payet¹, Ludovic Pineau², Ellen C. R. Snyder¹, Jenny Colas¹, Ahmed Moussa³, Brigitte Vannier¹, Joelle Bigay⁴, Jonathan Clarhaut⁵, Frédéric Becq¹, Jean-Marc Berjeaud⁶, Clarisse Vandebrouck¹ and Thierry Ferreira^{1,*}

¹Université de Poitiers, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, FRE CNRS 3511, Pôle Biologie-Santé, 1, Rue Georges BONNET, BP 633, 86022 Poitiers Cedex, France

²Present address: Department of Biochemistry, University of Geneva, CH-1211 Geneva, Switzerland

³Ecole Nationale des Sciences Appliquées de Tanger, BP 1818, 90000 Tanger, Morocco

⁴Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR CNRS 7275, Université de Nice-Sophia Antipolis, 660 Route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

⁵INSERM CIC 0802, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

⁶Université de Poitiers, Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France

*Corresponding author: Thierry Ferreira, thierry.ferreira@univ-poitiers.fr

Saturated fatty acids (SFA) have been reported to alter organelle integrity and function in many cell types, including muscle and pancreatic β -cells, adipocytes, hepatocytes and cardiomyocytes. SFA accumulation results in increased amounts of ceramides/sphingolipids and saturated phospholipids (PL). In this study, using a yeast-based model that recapitulates most of the trademarks of SFA-induced lipotoxicity in mammalian cells, we demonstrate that these lipid species act at different levels of the secretory pathway. Ceramides mostly appear to modulate the induction of the unfolded protein response and the transcription of nutrient transporters destined to the cell surface. On the other hand, saturated PL, by altering membrane properties, directly impact vesicular budding at later steps in the secretory pathway, i.e. at the *trans*-Golgi Network level. They appear to do so by increasing lipid order within intracellular membranes which, in turn, alters the recruitment of loose lipid packing-sensing proteins, required for optimal budding, to nascent vesicles. We propose that this latter general mechanism could account for the well-documented deleterious impacts of fatty acids on the last steps of the secretory pathway in several cell types.

Key words: Arf-GAP1, loose lipid packing, protein trafficking, *trans*-Golgi network, type 2 diabetes, vesicular budding

Received 22 January 2013, revised and accepted for publication 30 August 2013; uncorrected manuscript published online 6 September 2013

Obesity and dyslipidemia predispose individuals to metabolic disorders including type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases. The increasing prevalence of this metabolic syndrome is closely correlated with the worldwide generalization of the Western-diet which is excessively rich in saturated fat, originating from both animal and vegetal (e.g. palm oil) sources. In obese individuals, the incidence of the metabolic syndrome is generally associated with high plasma levels of long-chain (i.e. 16 carbons and above) saturated fatty acids (SFA) (1,2). When the storage capacity of adipocytes is exceeded, SFA begin to accumulate into tissues not suited for lipid storage, among which muscle cells and pancreatic β -cells are prime examples (1).

Exposure of pancreatic β -cells to SFA alters insulin secretion (3) and induces a so-called ER (endoplasmic reticulum)-stress that can ultimately lead to cell death by apoptosis (4). These processes are believed to participate in insulin-deficiency via β -cell dysfunction and, on the longer term, a decrease in β -cell mass. In muscle cells, major impacts of SFA appear to be a downregulation of the insulin receptor (5) and of the glucose transporter GLUT4 (6,7). Collectively, these mechanisms could account for both insulin-deficiency and insulin resistance in T2D.

However, the precise molecular mechanisms of SFA toxicity are still a matter of debate. It has been proposed that SFA could alter ER function either by promoting a cellular accumulation of ceramides/sphingolipids, as potent apoptosis inducers (8,9), or by redistributing themselves within phospholipids (PL; (10–12)). By increasing membrane order, saturated PL could impact several ER-based processes such as vesicular budding, calcium homeostasis and protein translocation and folding (13). Most likely, these effects may act in combination for the induction of the ER-stress, the trademark of which is the induction of a complex, coordinated signaling pathway, known as the unfolded protein response (UPR).

SFA may also have impacts later in the secretory pathway. Indeed, impairment of β -cell function by the SFA palmitate is associated to decreased glucose-stimulated insulin release (14). In muscle cells, downregulation of the GLUT4 transporter under SFA accumulation relates, at least in part, to its impaired translocation to the plasma membrane (6). Finally, SFA-shutdown of adiponectin secretion, one of the most abundant and functionally significant adipokines

Payet et al.

for improvement of whole body insulin sensitivity and glucose tolerance, relies on its targeting to the lysosome for degradation in adipocytes (15).

In this study, we took advantage of a simple yeast-based model, which recapitulates the main characteristics of lipotoxicity in human cells, to carefully track the relative contributions of ceramides/sphingolipids and saturated PL to SFA impacts on the secretory pathway, with a main emphasis on its later steps.

Results

SFA alter the morphology of the trans-Golgi network

We have recently developed a yeast-based assay that brings together most of the trademarks of the lipid-induced ER-stress observed in pancreatic β -cells (11). This system is based on a knock-out mutant of the Δ -aminolevulinate (ALA) synthase (*hem1* Δ ; Figure S1A). This strain can synthesize haem only if the medium is supplemented with ALA. Since haem is required in yeast as the prosthetic group of Ole1p, the fatty acid desaturase, as well as several enzymes of the ergosterol (ERG) pathway, the *hem1* Δ strain suffers double-lipid depletion when grown in the absence of ALA, i.e. loss of both ERG and unsaturated fatty acids (UFA) (16,17). When transferred from ALA-supplemented to YPD medium supplemented with or without an exogenous source of ergosterol (YPD + ERG and YPD, respectively), *hem1* Δ cells stop growing as early as 5 h after the shift (16). This arrest correlates with an accumulation of SFA [mainly myristic (C14:0), palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids] at the expense of unsaturated forms [UFA; palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acids] (17).

As with pancreatic β -cells, SFA accumulation is associated with significant impacts on the ER function and morphology, in a process that can be synergized by ERG (11): endogenous SFA accumulation results in the induction of the UPR and, if ERG and long-chain SFA (namely palmitate) are supplied as exogenous sources, in a swelling of the ER that appears as clefts expanding throughout the cytosol.

In the later secretory pathway, we have also demonstrated that SFA result in the preclusion of the delivery of a model plasma membrane transporter, the uracil permease Fur4p, to its final destination (17). Under SFA accumulation and in a way independent of the addition of an exogenous ERG source, Fur4p fails to exit the Golgi and is rather diverted to the vacuole for degradation (Figure S1A).

These two processes are paralleled by an increase in the saturation rate of PL and results in an ordering of the membrane bilayers (18) (Figure S1B). Interestingly, cell growth can be fully recovered, the UPR alleviated and trafficking to the plasma membrane restored if selective UFA, such as the mono-unsaturated fatty acid oleic acid,

are added to the medium (Figure S1B; (18)). Under these conditions, exogenous UFA are efficiently incorporated within PL and restore membrane properties to normal (18).

In this study, we hypothesized that preclusion of Fur4p in the late secretory pathway could be related to general effects of SFA on organelle function/integrity. Indeed, to account for permease diversion from the Golgi to the vacuole, a simple explanation would be that SFA could have a general impact on vesicle formation at the *trans*-Golgi Network. To evaluate this hypothesis, we used a strain bearing a thermosensitive mutation in the *SEC6* gene, encoding a protein required for optimal targeting and fusion of secretory vesicles to sites of exocytosis at the plasma membrane (19). As shown in Figure 1A, as compared to control conditions, a threefold decrease in the number of accumulating vesicles was observed under endogenous SFA accumulation at the non-permissive temperature. Moreover, under these conditions, many vesicles displayed an intriguing polygonal shape (Figure 1C–E), which appeared very different from the normal, characteristic, round morphology (Figure 1B). Intriguingly, some of the accumulating structures under SFA accumulation were delineated by two distinct membranes (Figure 1C–F). Overall, these polygonal structures represented 66% of the total vesicle population (estimated from 30 independent cells) within the *hem1* Δ , *sec6*^{ts} strain under SFA accumulation. In order to address whether these structures conserved some ability to be efficiently targeted to and fused with the plasma membrane, such as regular secretory vesicles, their number was compared between *hem1* Δ and *hem1* Δ , *sec6*^{ts} cells. In this aim, cells were grown for 7 h in YPD at 28°C before transfer to 39°C for 2 h, and the number of polygonal structures was determined as described in the legend of Figure 1. Interestingly, the average number of polygonal structures per cell was found to be 19.7 ± 2.1 in *hem1* Δ , *sec6*^{ts} and 2.5 ± 0.3 in *hem1* Δ cells, respectively ($n=30$; $p < 0.0001$). This observation strongly suggests that the polygonal structures/vesicles induced by SFA accumulation can be efficiently targeted and tethered to active sites of exocytosis at the plasma membrane in the non-*sec6*^{ts} background.

In summary, we concluded from these experiments that SFA affect the organizations of the *trans*-Golgi network/late secretory pathway, by decreasing the number of secretory vesicles *en route* to the plasma membrane. This process could account for altered delivery of proteins destined to the cell surface, including Fur4p, to their final destination.

Genome wide transcription profiling reveals intense remodeling of specific lipid biosynthetic pathways under SFA accumulation

A possible explanation to account for SFA alterations of the Golgi morphology could be their indirect impacts on the regulation of genes encoding tethers, coats and/or accessory proteins of the Golgi vesicular machinery, such as members of the COPI complex (20).

SFA Impact the Late Secretory Pathway

To check this hypothesis, we conducted a genomic analysis on *hem1Δ* cells by comparing their transcriptomic profiles under growth in complete medium supplemented with ergosterol and oleate (YPD + ERG + OLE), or with ergosterol alone (YPD + ERG; SFA accumulation). Differential expression analysis, conducted with a cut-off of 1.7 for fold change (FC) and of 0.0025 for the *p* value, identified a total of 92 genes with dysregulated expression under SFA accumulation, 71 being overexpressed and 21 being downregulated (Table S2).

However, among these genes, none of them appeared to be related to the COPI machinery and, more generally, to vesicle formation (Table S2). Instead, 16 showed direct connections to lipid homeostasis (Table 1), including sterol, fatty acid and sphingolipid metabolisms, some of which displaying strong functional similarities with mammalian homologues known to be related to T2D.

For example, SFA accumulation resulted in the upregulation of *Ole1p*, a homologue of the human stearoyl CoA desaturase 1 (*SCD1*). *SCD1* levels have been demonstrated to be strictly related to sensitivity to SFA in humans. Indeed, enhanced expression of *SCD1* protects β -cells from lipoapoptosis (10), whereas low hepatic *SCD1* activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese individuals (21).

Particularly pertinent hits from our genomic screen were also two members of the *IZH* [implicated in zinc homeostasis; (22)] family (*IZH2* and *IZH4*). *IZH* are homologues of mammalian adiponectin receptors (22) which mediate antidiabetic metabolic effects (23). It therefore appears that a core, basic pathway could have been conserved from yeast to human, for cells to adapt lipotoxicity, via the conserved *IZH/AdipoRQ* membrane sensors/receptors.

Another interesting observation was the upregulation of two genes encoding broad-specificity lysophospholipid acyltransferases, namely *ALE1* and *ICT1*. *Ale1p* and *Ict1p* have been shown to display a strong preference for unsaturated acyl-CoA substrates (24,25). One may therefore assume that, under conditions of UFA scarcity, cells may try to counter saturated PL accumulation by specifically targeting UFA to PL. Interestingly, *Ale1p* displays human homologues, belonging to the membrane-bound O-acetyltransferases (*MBOAT*), namely *MBOAT 1*, *2*, *5* and *7*, all of them showing a strong preference for unsaturated substrates (26). These proteins, which could constitute potential targets for future therapies, will deserve particular attention.

Sphingolipid metabolism could also be altered in yeast under SFA accumulation since two genes encoding enzymes involved in this pathway were found to be downregulated (*YPC1* and *SCS7*; Table 1 and see below). *Scs7p*, which catalyzes the hydroxylation of ceramides/sphingolipids, has a direct functional

homologue in mammalian cells, known as *FA2H*. Relevantly, *FA2H* has been connected to insulin resistance, since depletion of *FA2H* inhibits both basal and insulin-stimulated glucose uptake (ISGU) in adipocytes (27) (see below).

In more to this first observation, we focused in this study on the ceramide/sphingolipid metabolism for additional reasons. First, the late steps for complex sphingolipid synthesis take place in the Golgi apparatus (28). Second, sphingolipids have been shown to play critical roles in the sorting of specific sets of cargo proteins, *en route* to the plasma membrane, at the Golgi level (29). Third, implication of ceramides/sphingolipids in insulin resistance and lipotoxicity has been clearly demonstrated (30). These lipid species have been somehow connected to insulin signal transduction, chronic inflammation, lipotoxicity in several organs and nutrient transport (30,31). This latest process refers to the property of ceramides to downregulate nutrient permeases in yeast (32,33) and mammalian cells (31), which could, in turn, lead to cell death by starvation. However, the mechanisms of action of ceramides/sphingolipids on permease biogenesis remain poorly understood. Consistently, we could observe the transcriptional downregulation of four different genes encoding nutrient transporters under SFA accumulation, namely the high-glucose affinity transporter *Hxt4p* (a strict functional homologue of the human glucose transporter *GLUT4*), the uracil permease *Fur4p*, the oligopeptide transporter *Opt2p* and the di-tripeptide transporter *Ptr2p* (Table S2).

Altogether, these observations prompted us to investigate in further detail the connections between permease biogenesis and the ceramide/sphingolipid pathway under SFA accumulation in our yeast model.

Ceramides/sphingolipids act at early steps of the secretory pathway

As already mentioned, among the two genes involved in ceramide/sphingolipid biosynthetic pathway that were shown to be downregulated under SFA accumulation, was the *SCS7* gene, encoding a sphingolipid alpha-hydroxylase. Accordingly, *SCS7* downregulation correlated with the accumulation of hypo-hydroxylated forms [twofold increase for complex sphingolipids (Figure 2A) and ninefold increase for ceramides (Figure S2)]. Sphingolipids are important components of the lipid rafts. Interestingly enough, accelerated diffusional mobility of raft-associated lipids has been shown to be increased under depletion of *FA2H* (the mammalian *Scs7p* homologue), a process that could account for enhanced degradation of both *GLUT4* and the insulin receptor in adipocytes under these conditions (27). It therefore seemed important to test whether preclusion of sphingolipid hydroxylation could account for *Fur4p* mistargeting in our yeast model. In this aim, *Fur4p* trafficking was evaluated in a *scs7* deleted strain. In such a strain, even if hydroxy-sphingolipids were hardly detectable (Figure 2C, right), *Fur4p* delivery to

Payet et al.

Table 1: SFA-dysregulated genes related to lipid metabolism

Gene name	p value	Fold Change	Description
Downregulated genes			
<i>ERG5</i>	2.53E-06	-1.74467734	C-22 sterol desaturase, a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain in ergosterol biosynthesis; may be a target of azole antifungal drugs
<i>YPC1</i>	2.88E-06	-1.73308228	Alkaline ceramidase that also has reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity, catalyzes both breakdown and synthesis of phytoceramide; overexpression confers fumonisin B1 resistance
<i>SCS7</i>	0.00107647	-1.80540177	Sphingolipid alpha-hydroxylase, functions in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long-chain fatty acids, has both cytochrome b5-like and hydroxylase/desaturase domains, not essential for growth
<i>FAA1</i>	0.00227896	-2.25801109	Long-chain fatty acyl-CoA synthetase, activates imported fatty acids with a preference for C12:0-C16:0 chain lengths; functions in long-chain fatty acid import; accounts for most acyl-CoA synthetase activity; localized to lipid particles
Upregulated genes			
<i>INO1</i>	1.55E-06	2.7454811	Inositol-3-phosphate synthase, involved in synthesis of inositol phosphates and inositol-containing phospholipids; transcription is coregulated with other phospholipid biosynthetic genes by Ino2p and Ino4p, which bind the UASINO DNA element
<i>IZH4</i>	4.36E-06	5.1719371	Membrane protein involved in zinc ion homeostasis, member of the four-protein IZH family, expression induced by fatty acids and altered zinc levels; deletion reduces sensitivity to excess zinc; possible role in sterol metabolism
<i>RTA1</i>	6.40E-06	4.8023256	Protein involved in 7-aminocholesterol resistance; has seven potential membrane-spanning regions; expression is induced under both low-heme and low-oxygen conditions; member of the fungal lipid-translocating exporter (LTE) family of protein
<i>IZH2</i>	1.44E-05	2.2640908	Plasma membrane protein involved in zinc homeostasis and osmotin-induced apoptosis; transcription regulated by Zap1p, zinc and fatty acid levels; similar to mammalian adiponectins; deletion increases sensitivity to elevated zinc
<i>FAA4</i>	2.17E-05	2.0488887	Long-chain fatty acyl-CoA synthetase, activates imported fatty acids with a preference for C12:0-C16:0 chain lengths; functions in long-chain fatty acid import; important for survival during stationary phase; localized to lipid particles
<i>ALE1</i>	2.47E-05	2.0267613	Broad-specificity lysophospholipid acyltransferase, part of MBOAT family of membrane-bound O-acyltransferases; key component of Lands cycle; may have role in fatty acid exchange at sn-2 position of mature glycerophospholipids
<i>ICT1</i>	3.42E-05	2.2208792	Lysophosphatidic acid acyltransferase, responsible for enhanced phospholipid synthesis during organic solvent stress; null displays increased sensitivity to Calcofluor white; highly expressed during organic solvent stress
<i>ATF1</i>	6.97E-05	2.4021553	Alcohol acetyltransferase with potential roles in lipid and sterol metabolism; responsible for the major part of volatile acetate ester production during fermentation
<i>OLE1</i>	7.84E-05	4.4421267	Delta(9) fatty acid desaturase, required for mono-unsaturated fatty acid synthesis and for normal distribution of mitochondria
<i>MGA2</i>	0.00021876	1.7750116	ER membrane protein involved in regulation of OLE1 transcription, acts with homolog Spt23p; inactive ER form dimerizes and one subunit is then activated by ubiquitin/proteasome-dependent processing followed by nuclear targeting
<i>FAS2</i>	0.00095185	1.7266125	Alpha subunit of fatty acid synthetase, which catalyzes the synthesis of long-chain saturated fatty acids; contains the acyl-carrier protein domain and beta-ketoacyl reductase, beta-ketoacyl synthase and self-pantetheinylation activities
<i>HES1</i>	0.00113412	1.7001732	Protein implicated in the regulation of ergosterol biosynthesis; one of a seven member gene family with a common essential function and non-essential unique functions; similar to human oxysterol binding protein (OSBP)

Gene descriptions are from the *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>).

the plasma membrane was not fully abolished (Figure 2D, right; compare *ERG* and *scs7Δ* in Figure 2E). However, significant accumulation of intracellular Fur4p could be observed in this strain (Figure 2D, right; Figure 2E). This demonstrates that, if hydroxy-sphingolipid levels are clearly important for optimal permease delivery to the cell surface, the moderately decreased amounts observed under SFA accumulation (Figure 2A, right) cannot account,

by themselves, for the complete block in Fur4p trafficking observed under these conditions (Figure 2B, right).

To get a broader view of the potential impacts of SFA on ceramide/sphingolipid synthesis, we reconsidered our microarray data and applied a hierarchical clustering on 27 yeast genes involved in this pathway (Table S3). This approach identified nine genes of the sphingolipid

SFA Impact the Late Secretory Pathway

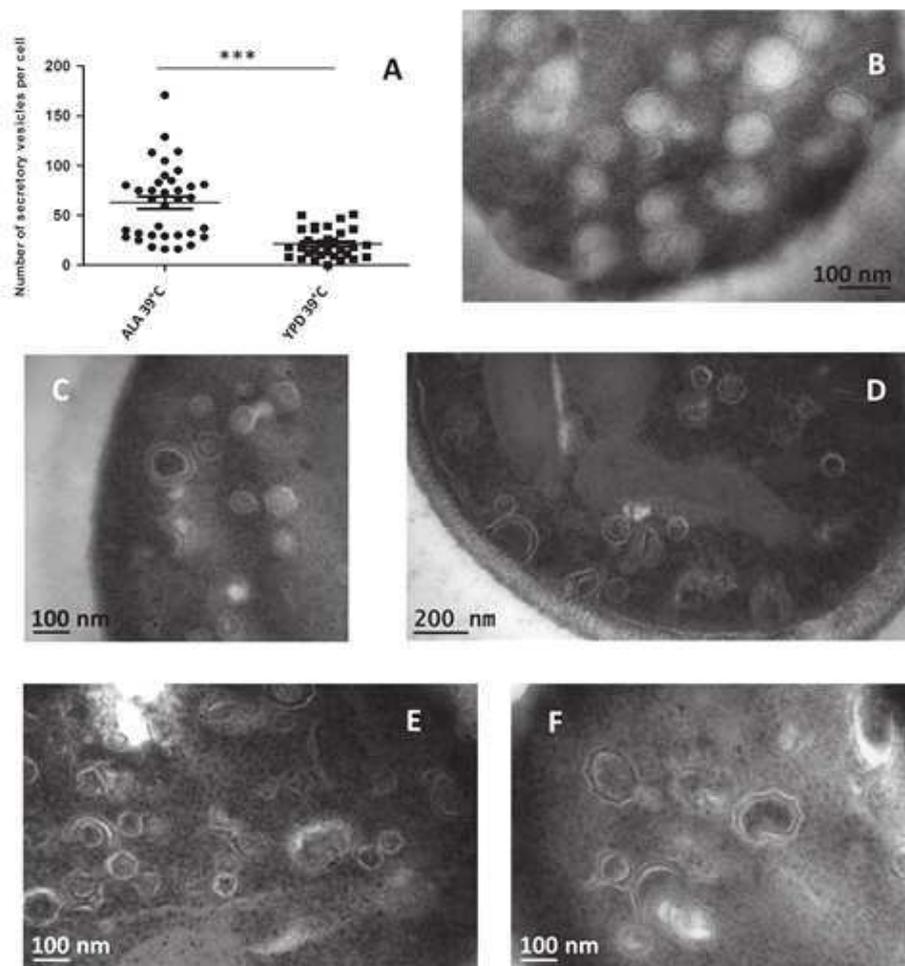


Figure 1: SFA impact the late secretory pathway. *hem1Δ, sec6^{TS}* cells were grown in YPD or YPD + ALA during 7 h. The accumulation of secretory vesicles was induced by incubating the cells at 39°C for 2 h. Cells were harvested and prepared for electron microscopy observation as described in the *Materials and Methods*. A) The number of secretory vesicles per cell was determined in at least 30 different cells. The p value was calculated by a two-tailed t-test, using the GRAPHPAD PRISM 5 software; ***, $p < 0.0001$. Means \pm SEM are indicated. Characteristic electron micrographs of the vesicles are showed for cells grown in either YPD + ALA (B) or YPD (C–F). Eighty-seven percent of 31 random sections of *hem1Δ, sec6^{TS}* cells grown in YPD, from three independent experiments, exhibited polygonal structures/vesicles at non-permissive temperature (C–F). In marked contrast, *hem1Δ, sec6^{TS}* cells grown in YPD + ALA did not display any such structures, but rather round vesicles, with a bright content delineated by a single membrane (B).

pathway with a highly significant deregulated expression ($p < 0.02$), seven of which being downregulated (*IIFA38, LAC1, SCS7, YPC1, LCB2, TSC13, LAG1*), and two upregulated (*ISC1* and *SKN1*) (Figure 3A). When considering these genes in the context of the overall sphingolipid pathway (Figure 3B), one may anticipate a global decrease of ceramide/sphingolipid synthesis due to a shutdown of the early steps. However, we have already reported that SFA accumulation results in complex sphingolipid accumulation in yeast [namely IPC, MIPC and M(IP)2C; (17)] and quantification of ceramides in this study revealed an overall increase of these species under the same conditions (Figure S2). The apparent discrepancies between expected and measured ceramide/sphingolipid amounts

likely find their explanation in the fact that palmitate, which is the main SFA-accumulating species under our experimental conditions, is the substrate of serine palmitoyltransferase (SPT; under the form of palmitoyl-CoA), the first enzyme of the ceramide/sphingolipid pathway (Figure 3B). In reaction to this, knowing the deleterious effects of high ceramide/sphingolipid levels, cells may react by shutting down the overall pathway at the transcriptional level.

Since high ceramide amounts have been demonstrated to kill both yeast and mammalian cells by inducing intracellular nutrient limitation subsequent to nutrient transporter downregulation (31,32,35), we next questioned if these lipid species may contribute to the observed

Payet et al.

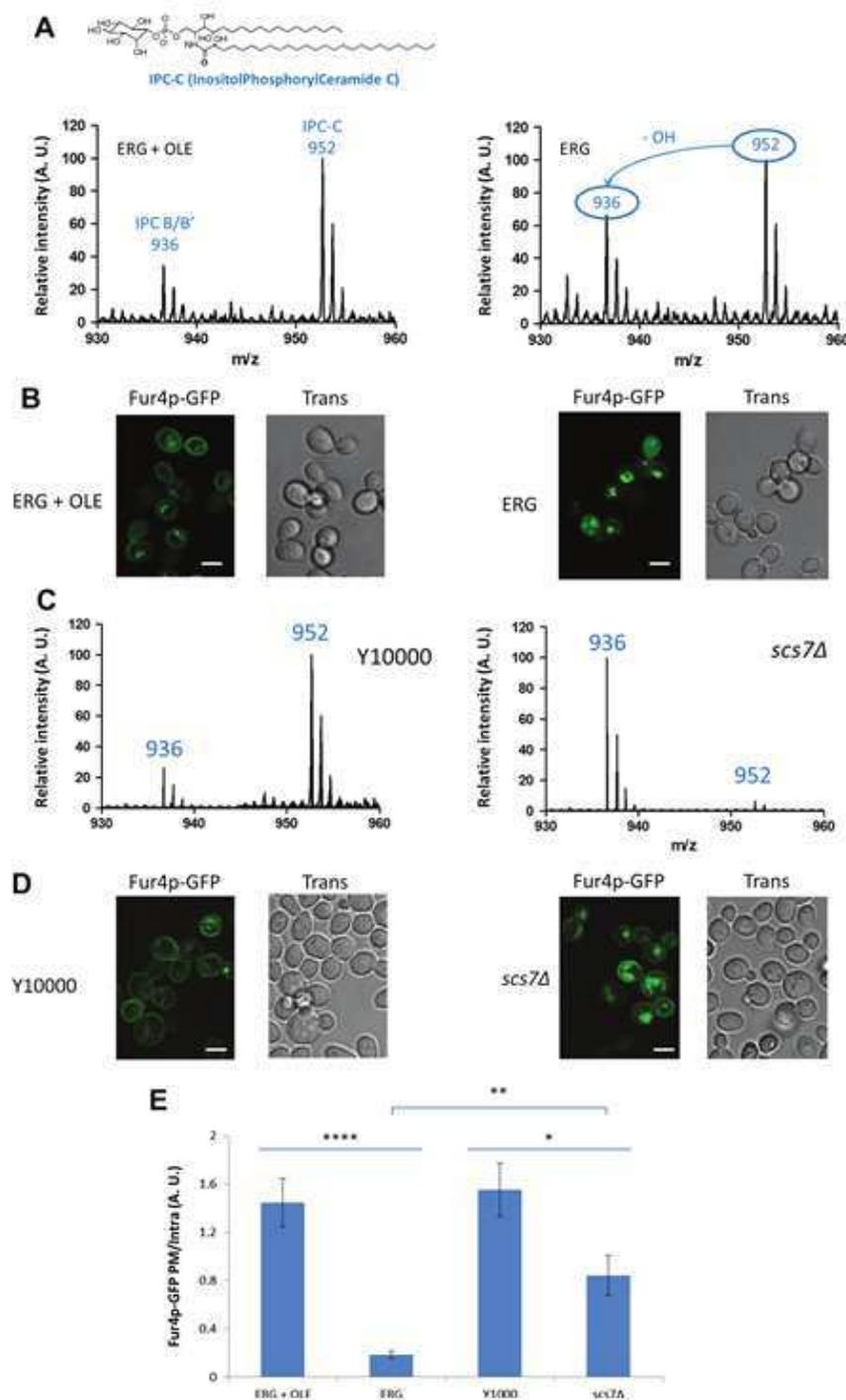


Figure 2: Impacts of hypo-hydroxylated sphingolipids on Fur4p trafficking. A) *hem1Δ* cells were grown in YPD + ERG + OLE or YPD + ERG (SFA accumulation) for 7 h before lipid extraction and MS analysis in the negative ion mode. The mature sphingolipid forms IPC-C ($m/z = 952$ Da) and IPC-B/B' ($m/z = 936$ Da), which differ from each other by one hydroxyl group, are indicated, A.U.: Arbitrary Units. B) *hem1Δ* (pFI38gF-GFP) cells were grown in YPD + ERG or YPD + ERG + OLE for 7 h and Fur4p-GFP synthesis was induced by adding galactose to the medium before visualization of GFP by confocal microscopy. Y10000 (pFI38gF-GFP) and *scs7Δ* (pFI38gF-GFP) cells were grown to the stationary phase in YPD, before shifting to early exponential phase (2×10^6 cells mL^{-1}) in fresh YPFaff. Seven hours after the shift, lipids were extracted for MS analysis of the IPC species in the negative ion mode (C) and Fur4p-GFP was visualized after galactose addition (D). Bar: 1 μm . B) In order to normalize the relative expression of Fur4p-GFP at the plasma membrane, the plasma membrane/intracellular fluorescence ratio (Fur4p-GFP PM/Intra) was estimated as described in the *Materials and Methods*. A.U.: Arbitrary Units. The p value was calculated by a two-tailed t test, using the GRAPHPAD PRISM 5 software. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.0001$. Means \pm SEM are indicated.

Fur4p trafficking defect under SFA accumulation. To test this hypothesis, cells were incubated with the serine palmitoyl transferases inhibitor myriocin (Figure 4A). As expected, treating SFA-intoxicated cells with myriocin resulted in decreased levels of ceramides (Figure S2). Surprisingly, however, myriocin failed to restore normal Fur4p trafficking (Figure 4A,B), demonstrating that

high ceramide/sphingolipid levels are not, by themselves, responsible for impaired permease localization.

We next questioned if ceramides/sphingolipids could act at earlier steps of permease biogenesis. SFA accumulation is associated to the transcriptional downregulation of nutrient permeases (Table S2). To evaluate the

SFA Impact the Late Secretory Pathway

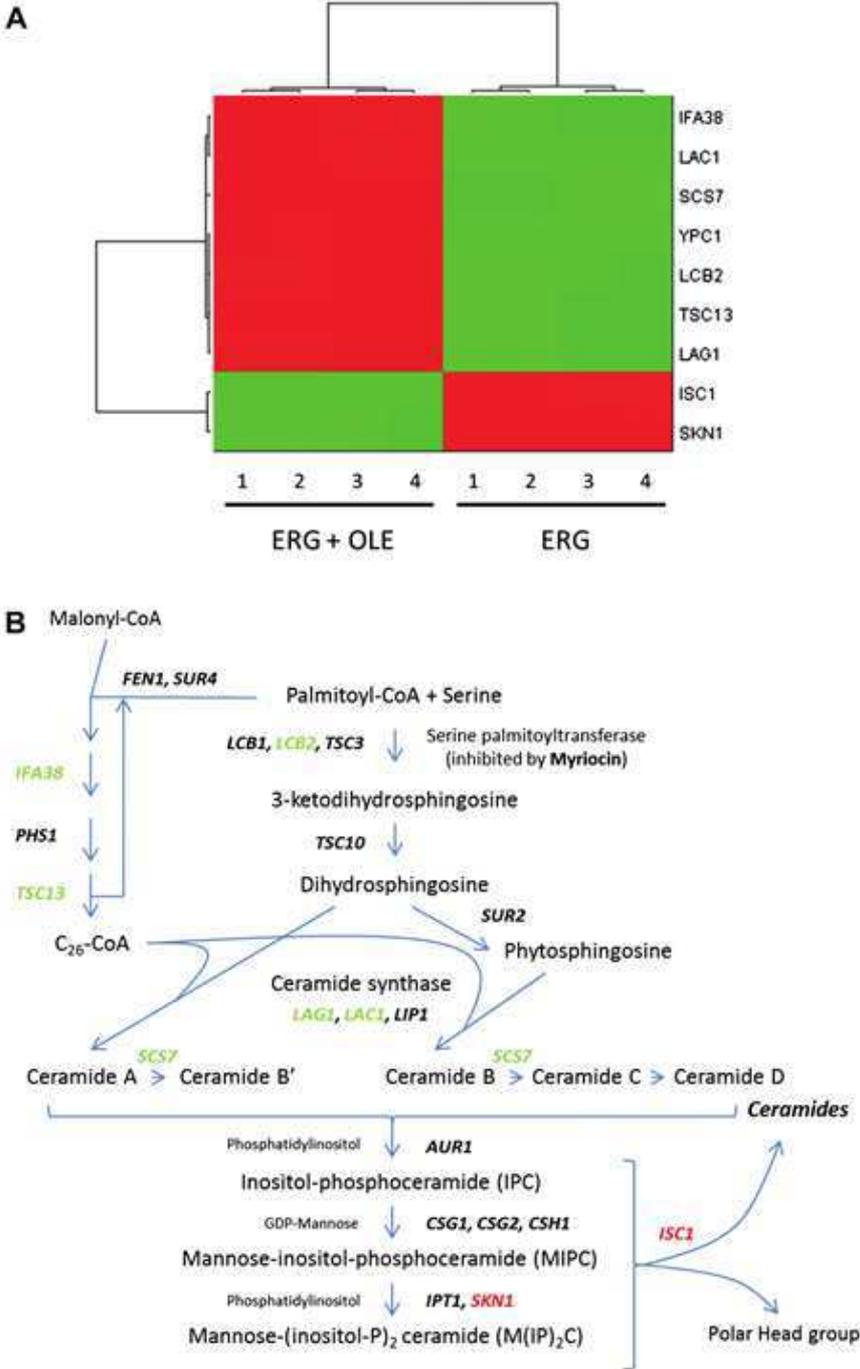


Figure 3: SFA-induced remodeling of the sphingolipid pathway. A) Hierarchical clustering of selected genes of the sphingolipid pathway. *hem1Δ* cells were grown to the stationary phase in YPD + ALA, before shifting to early exponential phase (2×10^6 cells mL⁻¹) to YPD + ERG + OLE or YPD + ERG (SFA accumulation). After 7 h growth in the indicated conditions, differential expression analyses were driven on 4 independent biological samples (1–4), as described in the *Materials and Methods*. Among the 27 genes involved in the ceramide/sphingolipid pathway in yeast (Table S3), 9 showed significant variations in expression (FC > 1.2 and p value < 0.02) under SFA accumulation, 7 being down-regulated (green) and 2 up-regulated (red). B) Outline of the sphingolipid pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Intermediates of the sphingolipid pathway are shown in regular lettering and genes are in italics. Genes which are either down-regulated (green) or up-regulated (red) under SFA accumulation are also indicated. Adapted from Dickson (34).

potential involvement of ceramides/sphingolipids in this process, the mRNA of the glucose transporter *HXT4* were quantified by RT-qPCR (Figure 4C) under myriocin treatment. As shown, myriocin restored mRNA amounts to levels very similar to what observed under non SFA-accumulating conditions. Interestingly, similar results were obtained for Fur4p, Opt2p and Ptr2p (data not-shown), showing that permease transcriptional

downregulation is likely a ceramide/sphingolipid regulated process.

Finally, the involvement of ceramides/sphingolipids on the induction of the ER-stress under SFA accumulation was evaluated. SFA accumulation is known to result in ER-stress and induction of the UPR. Interestingly, myriocin abolished SFA-induced UPR (Figure 4D).

Payet et al.

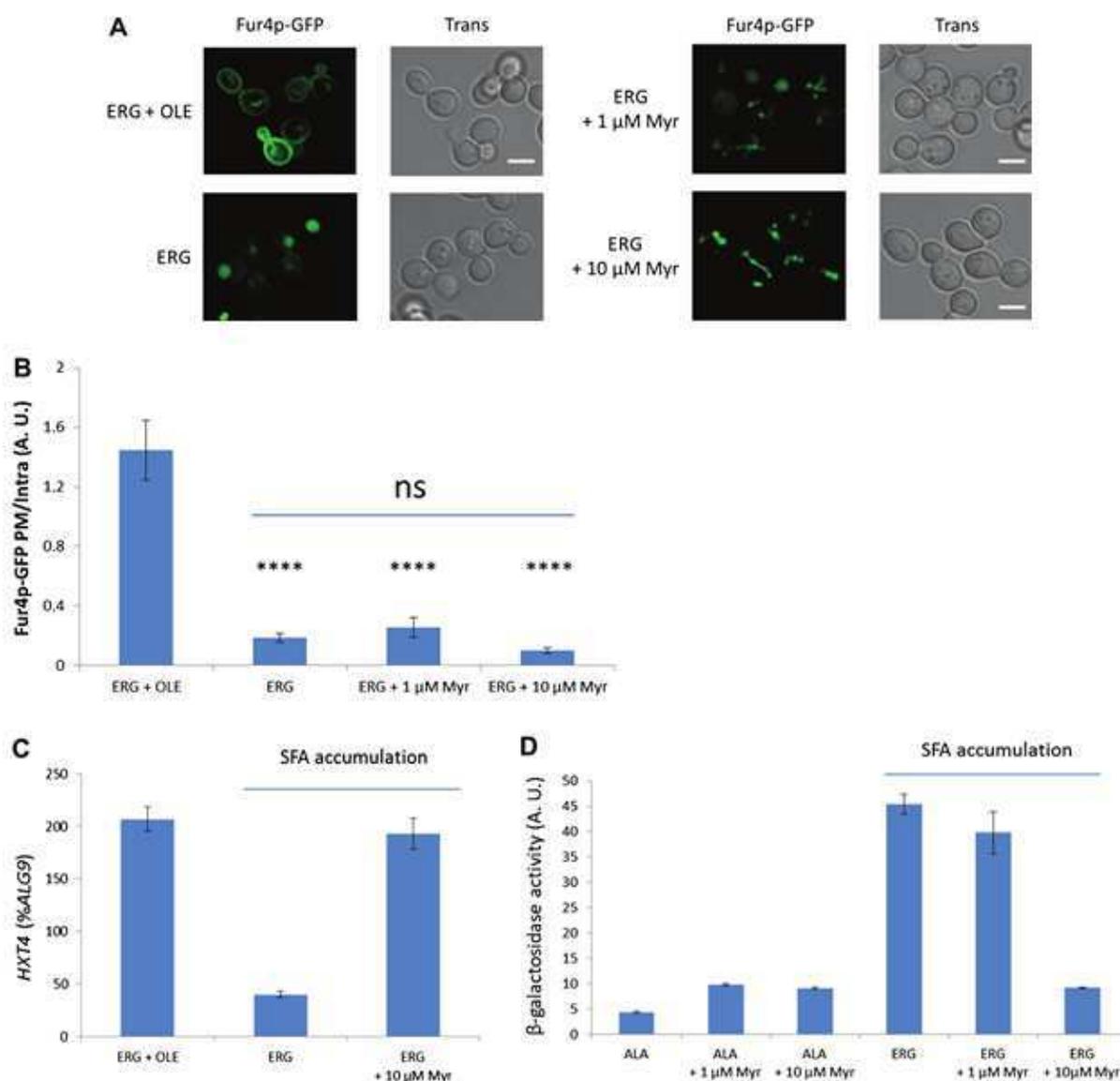


Figure 4: Physiological effects of myriocin under SFA accumulation. A) *hem1Δ, end3Δ* (pFI38gF-GFP) cells were grown to the stationary phase in YPD + ALA, before shifting to early exponential phase (2×10^6 cells mL^{-1}) in fresh YPRaff + ERG + OLE or in YPRaff + ERG supplemented with myriocin at the indicated concentrations. Seven hours after the shift, Fur4p-GFP expression was induced by adding galactose, and GFP fluorescence was visualized 12 h later. Bar: 1 μm . B) The Fur4p-GFP PM/Intra ratio was estimated as described in the legend of Figure 2. A.U.: Arbitrary Units. The p value was calculated by a two-tailed *t* test, using the GRAPHPAD PRISM 5 software. ****, $p < 0.0001$. ns: non-significant. Means \pm SEM are indicated. C and D) *hem1Δ* (pJC104) cells were grown to the stationary phase in YPD + ALA, before shifting to early exponential phase (2×10^6 cells mL^{-1}) in fresh YPD + ALA or YPD + ERG + OLE and YPD + ERG supplemented with myriocin at the indicated concentrations. After 7 h following the shift to the indicated medium, cells were harvested to measure *HXT4* expressions by RT-qPCR (C), or to quantify β -galactosidase activities to follow induction of the UPR (D), as described in *Materials and Methods*. A.U.: Arbitrary Units. RT-qPCR values are expressed as a percentage of *ALG9* expression, used as a standard. Values are means \pm SD of at least three independent determinations.

Taken together, this set of data shows that ceramides/sphingolipids are not the main actors of Fur4p trafficking defect at the Golgi exit but are important modulators of both SFA-induced UPR induction and permease transcriptional downregulation.

Saturated PL as key regulators of vesicle formation at the trans-Golgi network

A striking characteristic of the ER and the Golgi apparatus is that their membranes are constituted of highly unsaturated PL species, whereas saturated PL levels

SFA Impact the Late Secretory Pathway

increase later secretory pathway, to reach a maximum at the plasma membrane (36). High levels of unsaturated PL result in loose lipid packing, a biophysical parameter that appears to be crucial for the recruitment of selected proteins required for optimal vesicular budding. Prime examples are the members of the Arf-GAP1 family, one of them being Gcs1p in yeast. Gcs1p has been shown to mediate both Golgi-ER and post-Golgi vesicle transport in yeast (37). Interestingly, deletion of the *GCS1* gene and of its homolog *AGE2* results in Golgi fragmentation and preclusion of post-Golgi transport (38).

Arf-GAP1 proteins respond to membrane curvature through the membrane absorption of a specific motif, referred to as ArfGAP1 Lipid Packing Sensor (ALPS; (39)). In fact, the ALPS motif does not recognize membrane curvature *per se*, that is, a curved geometry, but loose lipid packing, which is a consequence of membrane curvature (39). Since increased amounts of saturated PL under SFA accumulation have been shown to increase lipid packing (18), we then questioned if abnormal Golgi morphology, poor secretory vesicle formation and consequent Fur4p trafficking defect could be the consequence of direct impacts of saturated PL on Gcs1p recruitment to the *trans*-Golgi network. Indeed, if we could not succeed in determining the precise PL composition of the polygonal structures displayed in Figure 1, we have already demonstrated that SFA accumulate within the PL of microsomal fractions under our experimental conditions (11). This strongly suggests that PL composition is altered in a similar fashion within the organelles of the entire secretory pathway, including the *trans*-Golgi network and secretory vesicles, under SFA accumulation.

In a first step, we evaluated the recruitment of Gcs1p (Gcs1p-GFP; Figure 5) to the Golgi complex *in vivo*, by its colocalization with the *trans*-Golgi resident protein Sec7p (Sec7p-RFP; Figure 5; (37)). As shown in Figure 5, Gcs1p failed to colocalize with Sec7p under SFA accumulation, but rather appeared redistributed within the cytosol.

To evaluate if saturated PL could account by themselves for altered Gcs1p recruitment to membranes, we used a flotation assay in which liposomes of defined PL compositions and associated proteins can be recovered at the top of a density gradient (Figure 6A; (39)). In this aim, liposomes were obtained from phosphatidylcholine (PC) species purified from *hem1Δ* cells grown either in the presence (ALA-PC) or in the absence (YPD-PC) of ALA (Figure S1). ALA-PC are mainly constituted of di-unsaturated species (i.e. bearing two mono-unsaturated fatty acyl chains; 55%), followed by mono-unsaturated species (one saturated chain and one mono-unsaturated chain; 40%) and saturated species (two saturated chains; 5%) and form highly disordered membranes (17,18). On the other hand, saturated forms raise up to 40% in YPD-PC (55% mono-unsaturated species and 5% di-unsaturated species) and result in highly ordered, packed membranes (17,18). As shown in

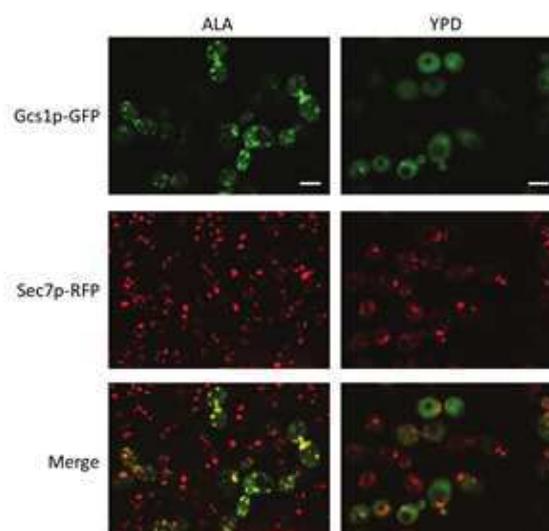


Figure 5: SFA accumulation impairs Gcs1p recruitment to the *trans*-Golgi network. *hem1Δ, SEC7RFP* cells transformed with the pRS315-GFP-GCS1 plasmid were grown for 7h in YPD + ALA or YPD (SFA accumulation) and before visualization of the Gcs1p-GFP and Sec7p-RFP fusion proteins by confocal microscopy. Bar: 1 μm.

Figure 6B, the binding of Gcs1p to ALA-PC liposomes strongly increased with membrane curvature, i.e. smaller liposome radius, in a very similar manner as what could be observed with liposomes obtained with a purified mono-unsaturated species, palmitoyl-oleyl PC (POPC; Figure S3). By contrast, Gcs1p poorly associated with YPD-PC liposomes, whatever their size (Figure 6C). Similar results could be obtained when the same experiments were conducted with dimyristoyl PC liposomes (a saturated species; DMPC, Figure S3). This experiment demonstrated that Gcs1p cannot bind YPD-PC liposomes, likely because of increased lipid packing related to high saturated PL amounts. This process could therefore account for Gcs1p mislocalization *in vivo* and may likely participate in the observed reduced vesicular budding at the *trans*-Golgi network.

Discussion

The impacts of SFA in β-cell death/dysfunction have been the object of intense investigations, and are supposed to occur via complementary actions including reduced ER-to-Golgi protein trafficking (40), induction of ER-stress and apoptotic pathways (4,13) and inhibition of insulin secretion (3). SFA accumulation correlates with increased amounts of saturated PL which could, in turn, alter membrane properties and therefore account for the observed cellular effects (13). However, since palmitate is the substrate of SPT (Figure 3B), these impacts of SFA are also paralleled by and correlated with an increase in ceramides and/or selective sphingolipid species (Figure

Payet et al.

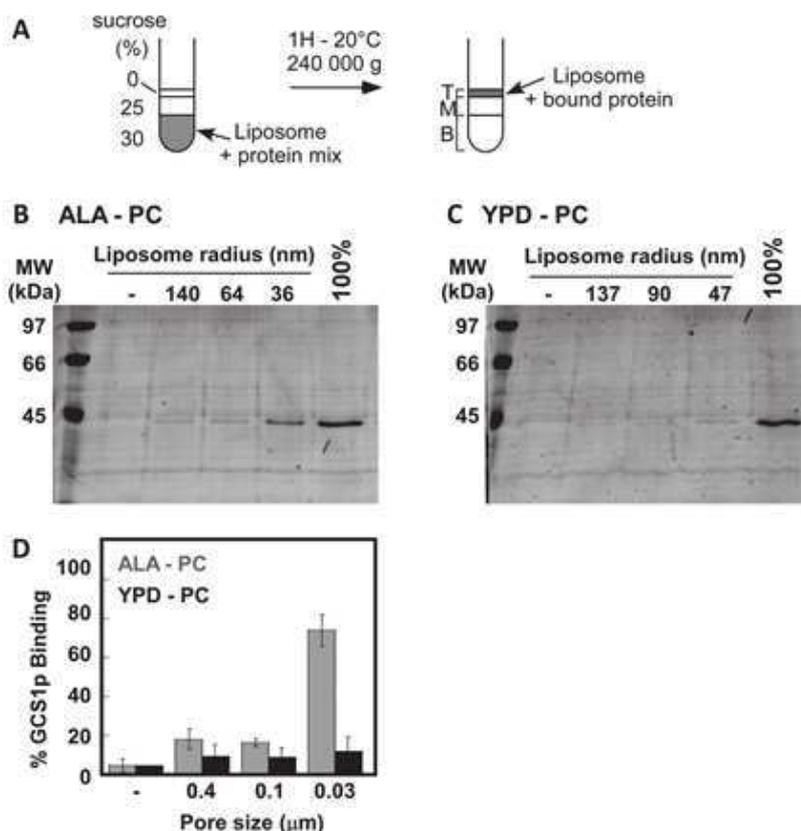


Figure 6: SFA accumulation alters Gcs1p recruitment to vesicles. A) Purified Gcs1p was incubated without or with either ALA-PC or YPG-PC liposome of different radius and loaded at the bottom of a three steps sucrose gradient before centrifugation (see *Materials and Methods* for details). Bottom (B: 250 µL), middle (M: 150 µL) and top (T: 100 µL) fractions were collected and analyzed. B and C) Gcs1p recruitment to liposome was determined by analysis of top fractions on SDS-PAGE and comparison to 100% protein fraction (total loaded protein volume diluted into 100 µL final top volume). Typical results with ALA-PC liposome (B) or with YPG-PC liposome (C). D) Combined results from two lipid purifications with two independent extrusion each. Liposome size varied for each experiment and was here referred depending on the pore size of the polycarbonate filters used in each condition.

2A and Figure S2; (8,41)). A major point of this study was therefore to address more precisely the relative contributions of ceramides/sphingolipids and saturated PL to SFA toxicity (for summary, see Figure 7A).

Using myriocin, a specific SPT inhibitor, we could first demonstrate that ceramides/sphingolipids mediate SFA-induced downregulation of nutrient transporters at the transcriptional level (Figure 4C). High ceramide levels have been demonstrated to kill both yeast and mammalian cells by inducing intracellular nutrient limitation subsequent to nutrient transporter downregulation (31,32,35). A similar process could therefore participate directly, at least in part, to SFA toxicity. The fact that the glucose transporter GLUT4 homologue Hxt4p belongs to the list of ceramide targets (Figure 4C), suggests that this mechanism could also account for previously reported SFA inhibition of ISGU(6,7), which leads to insulin resistance in diabetes. Relevantly, treating muscles with SPT inhibitors make them resistant to palmitate inhibition of ISGU in isolated soleus muscles (9).

A second observation is that ceramides/sphingolipids mediate SFA-related induction of the ER-stress/UPR pathways in our yeast model (Figure 4D). Since ER-stress is closely related to cell death, these data nicely correlate with previous studies showing that inhibitors of the ceramide biosynthetic pathway (i.e. fumonisins B

and myriocin) abolish SFA-induced apoptosis of β-cells (14,42). Altogether, these observations demonstrate that high ceramide/sphingolipid levels are not the prime cause of protein trafficking disruption.

Interestingly, SFA alter the late secretory pathway in two ways, i.e. by decreasing the amount of secretory vesicles emerging from the *trans*-Golgi network (Figure 1A), but also by catalyzing the accumulation of intriguing polygonal vesicular structures (Figure 1C-F). Formation of a spherical vesicle is a complex process that requires the orchestration of several elementary events, including membrane deformation by protein coats, to initiate the budding, and local lipid redistributions to obtain specific areas of positive and negative curvature (Figure 7B). A central actor of vesicle formation in the Golgi is the small G protein Arf1 (43). Arf1-GTP initiates membrane curvature and dissociates upon GTP hydrolysis when a mature curved lattice is formed. Arf1 release from the mature vesicle is driven by Arf-GAP1 (or Gcs1p in yeast) that promotes GTP hydrolysis in Arf1. Arf-GAP1/Gcs1p is specifically recruited to the highly curved/mature vesicle via its loose lipid-packing sensor ALPS motif (39).

We bring in this study several lines of evidence suggesting that saturated PL directly impact vesicle formation by two means (Figure 7B). First, conical lipids are required

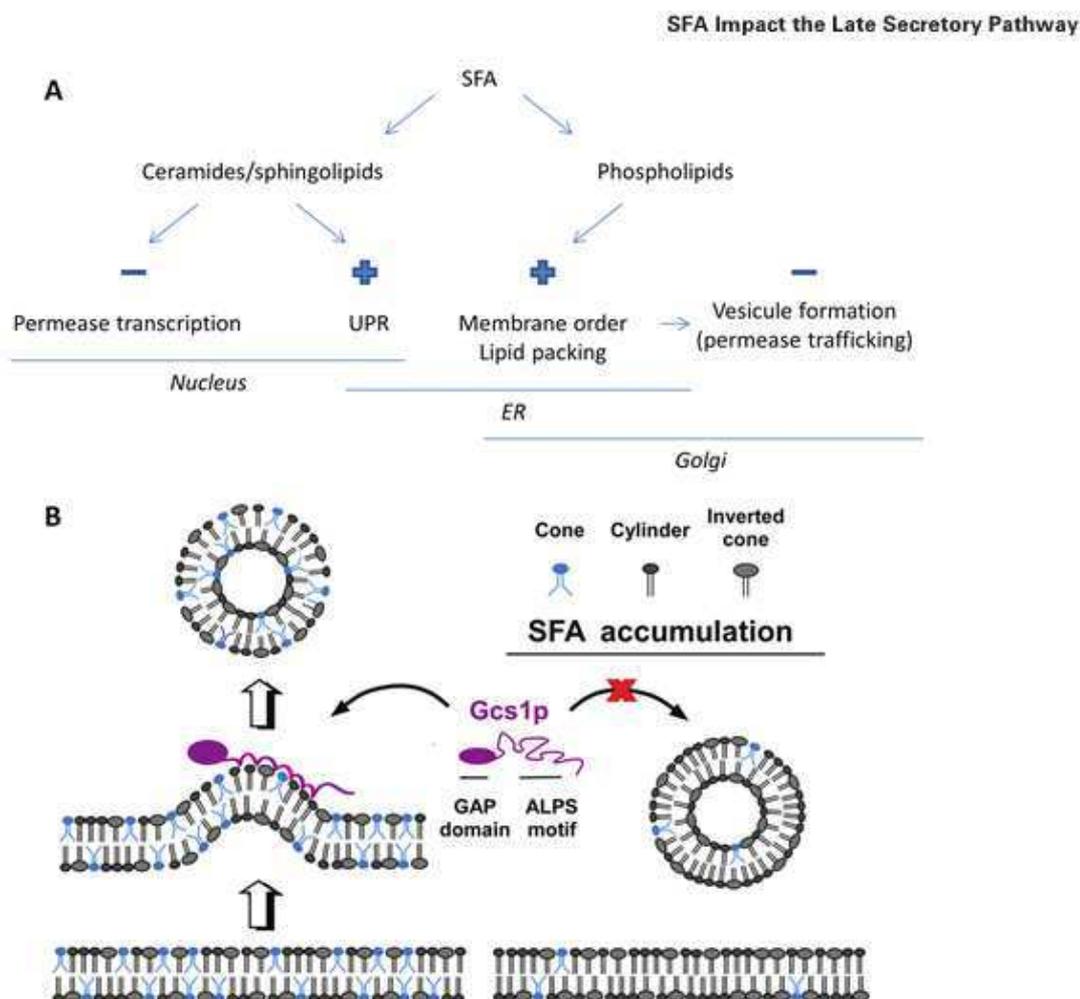


Figure 7: Summary of SFA impacts on the secretory pathway. A) Excess palmitate can be either driven to the ceramide/sphingolipid pathway or to the PL pathway, leading to high saturated PL-levels. In turn, high ceramide/sphingolipid amounts downregulate the transcription of target nutrient transporters (e.g. Hxt4p) and result in the induction of the UPR in the early secretory pathway. On the other hand, saturated PL increase membrane order and impact vesicle formation at the *Trans*-Golgi network, reducing the number of secretory vesicles ‘en route’ to the plasma membrane. B) A model for decreased vesicular budding in response to high saturated PL amounts. SFA accumulation within PL shifts PL shape from rather conical to cylindrical. This results in an overall increase in lipid packing which, in turn, alters Gcs1p recruitment to nascent vesicles. See text for details.

to form areas of positive and negative curvature, and SFA accumulation within PL is known to shift PL shape from conical to rather cylindrical (17). Such SFA-related conical-PL depletion is expected to alter membrane bending and could therefore account for the formation of the observed non-spherical, polygonal vesicles/structures (Figure 1C–F). Second, accumulation of saturated PL results in increased membrane order (i.e. high lipid packing; (18)) which alters Gcs1p recruitment to liposomes *in vitro* (Figure 6C) and is likely to account for the observed SFA impacts on Gcs1p targeting to the Golgi *in vivo* (Figure 5). Altogether, these processes may participate actively to disrupting the overall secretory pathway.

If extrapolated to mammalian cells, such a general mechanism could account, at least partly, for the many

dyregulations in the secretory pathway that have been reported for adipocytes, muscle and β -cells in response to SFA, including altered vesicular budding in the ER (40), decreased GLUT4 translocation to the plasma membrane (6, 7) and decline in adiponectin secretion (15).

Materials and Methods

Strains and culture conditions

Saccharomyces cerevisiae strains used in this study are listed in Table S1. The *hem1Δ* cells were grown aerobically at 28°C in YPD medium [1% Yeast extract (w/v), 1% Peptone (w/v), 2% Glucose (w/v)] supplemented with 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ALA. Accumulation of endogenous SFA was obtained as previously described (11) by cultivating the cells in YPD supplemented or not with 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ERG. Where indicated, myriocin (Sigma) was added from a stock solution in DMSO, and 1% Tween 80 (w/v) was

Payet et al.

used as the source of oleic acid (OLE). For Fur4p biogenesis studies, cells were transformed with the centromeric plasmid pFI38gF-green fluorescent protein (GFP). This plasmid codes a *FUR4* fusion gene, encoding Fur4p with a C-terminal GFP tag under the control of the inducible *GAL10* promoter (44). Fur4p-GFP synthesis was induced by adding galactose to a final concentration of 4% (wt/v) to a YPRaff medium in which Raffinose (4%; wt/v) is substituted to Glucose to avoid the repression of Glucose on the *GAL10* promoter. For visualization of secretory vesicles, the *hem1Δ*, *sec6^{ts}* strain was used. Cells were grown to early logarithmic phase in YPD medium supplemented or not with 80 μg mL⁻¹ ALA, at 28°C for 7 h, before shift at 39°C for 2 h to induce the accumulation of secretory vesicles. Localization of Gcs1p was conducted using a single-copy plasmid expressing Gcs1p tagged at the amino terminus with GFP (pRS315-GFP-GCS1; (37))

Microarrays

RNA extraction was from 2 x 10⁷ cells using a commercial kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen). For each condition of growth, samples were prepared from four individual biological samples. Agilent's Yeast oligo microarray contains 60-mer oligonucleotide probes to 6256 annotated ORFs for the S288C strain of *S. cerevisiae*. The ORF list was downloaded from the *Saccharomyces Genome Database* (SGD: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) at Stanford University. For statistical confidences and determination of differential gene expression, data files were analyzed using the free software R associated to packages of 'Bioconductor' project. Developed workflows begin by data normalization using Robust multichip average (RMA) method (45) that allows reduction of block effect done at the probeset level. The second step of data analysis workflow consists in selecting differentially expressed genes between 'control' and 'experiment'. The statistical algorithm SAM (Significance Analysis of Microarrays) (46) was used to compute p value and FC for each gene. Selected genes were obtained using a cut-off both for FC and p value (FC Cut-off = 1.7, p value Cut-off = 0.0025).

Real-time quantitative polymerase chain reaction

RNA extraction was from 2 x 10⁷ cells using a commercial kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was done with SuperScript II (Invitrogen) using the procedure supplied by the manufacturer. Gene expression was assessed relative to asparagine-linked glycosylation (*ALG9*) expression by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the GeneAmp 9500 Sequence Detection System and SYBR Green chemistry (Applied Biosystems). The RT-qPCR primers used were: *ALG9* forward GCAGGCCAGGCAATGTCACG, *ALG9* reverse ACCGGTGCCTTACACCACC, *HXT4* forward CCAGCTGATGCTTTGCGCCAG, *HXT4* reverse CGGAGCGGGCTTCTTTGGA. The amplicons were sequenced directly using the ABI PRISM Big Dye Terminator™ Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) and ABI PRISM 310 automatic sequencer.

Lipid analyses and mass spectroscopy

Lipid extracts were prepared from 10¹⁰ (PC purification for floatation assays) or 10⁹ (ESI-MS analysis) yeast cells, grown as indicated, according to Ferreira et al. (16). The final organic phase was evaporated and PL/sphingolipids were dissolved in 100 μL chloroform/methanol/H₂O (16:16:5, v:v:v) for analysis by mass spectrometry or 100 μL chloroform/methanol (2:1) for PC purification.

In order to analyze sphingolipid species by mass spectrometry (MS), 1% (v/v) diethylamine was added to the samples for analysis in the negative ion mode. The molecular profile of inositol phosphoceramide (IPC) was obtained by scanning for the negative ion precursors of m/z 241, specific for the dehydration product of inositol phosphate (17).

For floatation assays, PC species were purified as described by Ferreira et al. (16). PC amounts were estimated by the ammonium ferrioxalate

method (47). After evaporation, PC samples were finally resuspended to a concentration between 1 and 1.3 mg mL⁻¹ in chloroform.

β-Galactosidase assays

The UPR can be monitored in yeast by using reporter enzymes, such as β-galactosidase encoded by the *LacZ* gene, whose synthesis is placed under control of the UPR element (UPRE). UPRE is a 22bp sequence present in the promoters of genes that are activated by the UPR (48). In this aim, *hem1Δ* cells were transformed with plasmid pJC104 bearing a UPRE-CYC-LacZ gene fusion, provided by Dr. Peter Walter (University of California; (48)). β-Galactosidase assays were performed at 30°C as previously described (11).

Confocal and electron microscopy

Samples were examined by confocal laser scanning microscopy using a Bio-Rad MRC 1024 equipped with a 15-mW argon-krypton gas laser. GFP fusion proteins and Sec7p-RFP were visualized by excitation at 488 nm and 568 nm, respectively, and with a 522 nm pass band filter or a 605 nm pass band filter, respectively (35 nm width). Quantification of Fur4p-GFP at the plasma membrane was performed according to the procedure described by Nalaskowski et al. (49). For each experiment, a minimum of 60 cells were randomly selected and examined. To determine the plasma membrane/intracellular ratio, GFP fluorescence intensities both over the plasma membrane and in intracellular areas in each cell were averaged to calculate the ratio of plasma membrane over intracellular intensity. For evaluation of data, unpaired Student's t test was used using the GRAPHPAD PRISM 5 software. Mean values and SEM are given.

For electron microscopy, *hem1Δ*, *sec6^{ts}* cells on carbon-coated grids were prepared as described by Glauert et al. (50). To visualize secretory vesicles, grids were finally immersed in a staining solution, to improve contrast in the microscope, composed of 2.5% uranyl acetate in alcohol 70% and lead citrate. A 1010 Jeol electron microscope was used in examining sections at 80 kV. Micrographs were obtained with a digital camera Quemesa from Olympus.

Protein expression and purification

Full-length Gcs1p expressed in *Escherichia coli* was purified as described by Poon et al. (51).

Liposome preparation and Flotation experiments

A dried film was prepared by evaporation of 1.3 mg of either purified ALA-PC or YPD-PC lipids in chloroform, and then resuspended in 50 mM HEPES pH 7.2 and 120 mM K-acetate. After five steps of thawing and freezing in liquid nitrogen, the liposome suspension was extruded sequentially through (pore size) 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.03 mm polycarbonate filters using a hand extruder (Avanti) at a final lipid concentration of 1–2.5 mM. The liposome radius was estimated by Dynamic Light Scattering (DLS) in a Dyna Pro instrument. Liposomes were stored at room temperature and used within 2 days after preparation.

Acknowledgments

We are very grateful to Anne Cantereau and Emile Bere (Confocal and Electron Microscopy facilities of FRE CNRS 3511, Poitiers, France) for their precious advice regarding confocal and electron microscopy imaging and Lidwine Trouilh (Biochips Platform, LISBP, Toulouse, France) for performing microarray preparations and analyses. We thank Dr. Peter Walter (University of California, USA), Dr. Rosine Haguenaer-Tsapis (Institut Jacques Monod, Paris, France) and Dr. Jeffrey E. Gerst (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for strains and plasmids. We also acknowledge Drs. Bruno Antony (Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France) and Miroslava Spanova (Université de Poitiers, Poitiers, France) for their fruitful comments on the manuscript. This work was

SFA Impact the Late Secretory Pathway

supported by the French MENRT (with a grant to L. A. P.), the CNRS, the EFSD (European Foundation for the Study of Diabetes) and the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional).

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1: Yeast strains used in this study.

Table S2: SFA-dysregulated genes.

Table S3: List of the genes involved in sphingolipid pathway used for hierarchical clustering.

Figure S1: A yeast model for lipotoxicity. A) *hem1Δ* cells can synthesize haem only if the medium is supplemented with Δ-aminolevulinatate (ALA). Since haem is used as the prosthetic group of Ole1p, the fatty acid desaturase, and of several enzymes of the ergosterol pathway, *hem1Δ* cells accumulate saturated fatty acids (SFA) and suffer ergosterol depletion when grown in the absence of ALA (YPD). As with pancreatic β-cells, SFA accumulation is associated with ER-swelling and induction of the unfolded protein response (UPR) in this organelle, but also with the diversion of selective plasma membrane proteins, such as the uracil permease Fur4p, from the Golgi apparatus to the vacuole for degradation. Full growth can be recovered if the cells are grown in the presence of exogenous sources of ergosterol and unsaturated fatty acids (UFA), such as the mono-unsaturated species oleic acid. B) On a biophysical point of view, SFA accumulation correlates with an increase in the saturation rate of phospholipids which results, in turn, in an ordering of the membrane bilayers. See text for details.

Figure S2: Ceramide quantification. *hem1Δ* cells were grown in the media indicated for 7h before lipid extraction and MS analysis in the positive ion mode. The relative quantities of the phytoceramides species t18:0/26:0-B (*m/z* = 696.7 Da) and t18:0/26:0-C (*m/z* = 712.7 Da), which were the most represented ceramides in our samples and differ from each other by one hydroxyl group, were estimated by comparison to N-octadecanoyl-phytosphingosine (Avanti Polar Lipids, Inc.), used as a standard. Their schematic structures are also displayed. These species were unambiguously identified by scanning for the positive ion precursors of *m/z* 282.3 (2). A.U.: Arbitrary Units.

Figure S3: Gcs1p recruitment to liposomes of defined composition and various radiuses. To determine the role of unsaturated lipids on Gcs1p recruitment, purified Gcs1p was incubated with either pure DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine), pure POPC (palmitoyl-oleyl PC) or pure DMPC (dimyristoyl PC) liposomes of different radius [i.e. extruded through polycarbonate filters of respective pore size 0.4 μm (T2), 0.1 μm (T3) and 0.03 μm (T3), or no added liposomes (T1)], then loaded at the bottom of a three steps sucrose gradient before centrifugation as described in Figure 6. Gcs1p recruitment to liposome was quantified by analysis of top fractions on SDS-PAGE and comparison to 100% protein fraction (total loaded protein volume diluted into 100 μL final top volume).

References

1. Kusminski C, Shetty S, Orci L, Unger R, Scherer P. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 2009;14:1484–1495.
2. Sabin MA, De Hora M, Holly JMP, Hunt LP, Ford AL, Williams SR, Baker JS, Retallick CJ, Crowne EC, Shield JPH. Fasting nonesterified fatty acid profiles in childhood and their relationship with adiposity, insulin sensitivity, and lipid levels. *Pediatrics* 2007;120:e1426–e1433.
3. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of langerhans. *J Biol Chem* 2005;280:32413–32418.

4. Diakogiannaki E, Morgan NG. Differential regulation of the ER stress response by long-chain fatty acids in the pancreatic beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008;36:959–962.
5. Dey D, Mukherjee M, Basu D, Datta M, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:217–228.
6. Alkhateeb H, Chabowski A, Glatz JFC, Luiken JFP, Bonen A. Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *Am J Physiol: Endocrinol Metab* 2007;293:E783–E793.
7. Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Emoto N, Wagatsuma F, Matsushita S, Kanzaki M. Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes. *J Biol Chem* 2010;285:34371–34381.
8. Boslem E, MacIntosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, Laybutt DR, Meikle PJ, Biden TJ. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 beta-cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J* 2011;435:267–276.
9. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 2008;29:381–402.
10. Busch AK, Gurisik E, Cordery DV, Sudlow M, Denyer GS, Laybutt DR, Hughes WE, Biden TJ. Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme a desaturase protects pancreatic (beta)-cells from lipooptosis. *Diabetes* 2005;54:2917–2924.
11. Pineau L, Colas J, Dupont S, Beney L, Fleurat-Lessard P, Berjeaud JM, Berges T, Ferreira T. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic* 2009;10:673–690.
12. Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 2006;47:2726–2737.
13. Pineau L, Ferreira T. Lipid-induced ER stress in yeast and beta cells: parallel trails to a common fate. *FEMS Yeast Res* 2010;10:1035–1045.
14. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinass GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 2003;52:726–733.
15. Karki S, Chakrabarti P, Huang G, Wang H, Farmer SR, Kandror KV. The Multi-Level Action of Fatty Acids on Adiponectin Production by Fat Cells. *PLoS ONE* 2011;6:e28146.
16. Ferreira T, Regnacq M, Alimardani P, Moreau-Vauzelle C, Berges T. Lipid dynamics in yeast under haem-induced unsaturated fatty acid and / or sterol depletion. *Biochem J* 2004;378:899–908.
17. Pineau L, Bonifait L, Berjeaud JM, Alimardani-Theuil P, Berges T, Ferreira T. A lipid-mediated quality control process in the Golgi apparatus in yeast. *Mol Biol Cell* 2008;19:807–821.
18. Deguil J, Pineau L, Rowland Snyder EC, Dupont S, Beney L, Gil A, Frapper G, Ferreira T. Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape. *Traffic* 2011;12:349–362.
19. Songer JA, Munson M. Sec6p anchors the assembled exocyst complex at sites of secretion. *Mol Biol Cell* 2009;20:973–982.
20. Hsu VW, Yang J-S. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett* 2009;583:3758–3763.
21. Stefan N, Peter A, Cegan A, Staiger H, Machann J, Schick F, Claussen C, Fritsche A, Häring H-U, Schleicher E. Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia* 2008;51:648–656.
22. Lyons TJ, Villa NY, Regalla LM, Kupchak BR, Vagstad A, Eide DJ. Metalloregulation of yeast membrane steroid receptor homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5506–5511.
23. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762–769.
24. Ghosh AK, Ramakrishnan G, Rajasekharan R. YLR099C (ICT1) encodes a soluble acyl-CoA-dependent lysophosphatidic acid acyl-transferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2008;283:9768–9775.

Payet et al.

25. Riekhof WR, Wu J, Jones JL, Voelker DR. Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine Acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2007;282:28344–28352.
26. Gijón MA, Riekhof WR, Zarini S, Murphy RC, Voelker DR. Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 2008;283:30235–30245.
27. Guo L, Zhou D, Pryse KM, Okunade AL, Su X. Fatty acid 2-hydroxylase mediates diffusional mobility of Raft-associated lipids, GLUT4 level, and lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2010;285:25438–25447.
28. Dickson RC, Sumanasekera C, Lester RL. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res* 2006;45:447–465.
29. Surma MA, Klose C, Simons K. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta: Mol Cell Biol Lipids* 2012;1821:1059–1067.
30. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 2006;45:42–72.
31. Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17402–17407.
32. Chung N, Mao C, Heitman J, Hannun YA, Obeid LM. Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2001;276:35614–35621.
33. Skrzypek MS, Nagiec MM, Lester RL, Dickson RC. Inhibition of amino acid transport by sphingoid long chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998;273:2829–2834.
34. Dickson RC. Thematic review series: sphingolipids: New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* 2008;49:909–921.
35. Welsch CA, Roth LW, Goetschy JF, Movva NR. Genetic, biochemical, and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the novel immunomodulator FTY720 largely mimic those of the natural sphingolipid phytosphingosine. *J Biol Chem* 2004;279:36720–36731.
36. Schneider R, Brugger B, Sandhoff R, Zellnig G, Leber A, Lampl M, Athenstaedt K, Hrastrnik C, Eder S, Daum G, Paltauf F, Wieland FT, Kohlwein SD. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* 1999;146:741–754.
37. Robinson M, Poon PP, Schindler C, Murray LE, Kama R, Gabriely G, Singer RA, Spang A, Johnston GC, Gerst JE. The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Mol Biol Cell* 2006;17:1845–1858.
38. Poon PP, Nothwehr SF, Singer RA, Johnston GC. The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. *J Cell Biol* 2001;155:1239–1250.
39. Bigay J, Casella JF, Drin G, Mesmin B, Antony B. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* 2005;24:2244–2253.
40. Preston A, Gurisik E, Bartley C, Laybutt D, Biden T. Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia* 2009;52:2369–2373.
41. Lang F, Ullrich S, Gulbins E. Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:1061–1071.
42. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets. *Diabetes* 2002;51:1437–1442.
43. Antony B. Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:386–394.
44. Marchal C, Dupre S, Urban-Grimal D. Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. *J Cell Sci* 2002;115:217–226.
45. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249–264.
46. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5116–5121.
47. Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem* 1980;104:10–14.
48. Cox JS, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 1996;87:391–404.
49. Nalaskowski MM, Fliegert R, Ernst O, Brehm MA, Fanick W, Windhorst S, Lin H, Giehler S, Hein J, Lin YN, Mayr GW. Human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoform B (IP3KB) is a nucleocytoplasmic shuttling protein specifically enriched at cortical actin filaments and at invaginations of the nuclear envelope. *J Biol Chem* 2011;286:4500–4510.
50. Glauert AM, Lewis PR. *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy*. USA: Princeton University Press, Princeton, New Jersey; 1998.
51. Poon PP, Cassel D, Huber I, Singer RA, Johnston GC. Expression, analysis, and properties of yeast ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating proteins (GAPs) Gcs1 and Glo3. *Methods Enzymol* 2001;329:317–324.

Supplemental data

Supplemental Table 1: Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
Y10000	<i>Wild type (MAT)α his3 leu2 lys2 ura3</i>	Euroscarf
<i>hem1Δ a</i>	<i>Mating type (MAT)α trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	(Pineau <i>et al.</i> , 2009)
<i>hem1Δ α</i>	<i>(MAT)α trp1 his3 ura3 leu2 hem1::LEU2</i>	(Pineau <i>et al.</i> , 2009)
<i>scs7Δ</i>	<i>(MAT)α his3 leu2 lys2 ura3</i>	Y 10858 (Euroscarf)
<i>sec6Δ^{ts}</i>	<i>(MAT)α leu2 trp1 ura3 sec6–4 (ts)</i>	TFY15, (Ferreira <i>et al.</i> , 2002)
<i>hem1Δ, end3Δ</i>	<i>(MAT)α his3 ura3 hem1::LEU2 end3::KanMX4</i>	(Pineau <i>et al.</i> , 2008)
<i>hem1Δ, sec6Δ^{ts}</i>	<i>(MAT)α trp1 his3 ura3 hem1::LEU2 sec6–4 (ts)</i>	This study, progeny of <i>hem1Δ a</i> x TFY15
<i>SP1-SEC7RFP</i>	<i>(MAT)α can1 his3 ura3 leu2 ade8 trp1::TRP1::TPI1-SEC7-RFP</i>	(Robinson <i>et al.</i> , 2006)
<i>hem1Δ, SEC7RFP</i>	<i>(MAT)α his3 ura3 ad8 YDR232W::kanMX4 trp1::TRP1::TPI1-SEC7RFP</i>	This study, progeny of <i>SP1-SEC7RFP</i> X <i>(MAT)α</i> haploid progeny of Y23591 (Euroscarf)

Supplemental Table 2: SFA-dysregulated genes

Gene descriptions are from the *Saccharomyces genome database* (<http://www.yeastgenome.org/>).

FC: Fold Change

Down-regulated genes

Gene name	Pvalue	FC	Description
<i>HXT4</i>	2.97E-07	-1.76769547	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily, expression is induced by low levels of glucose and repressed by high levels of glucose
<i>ADE17</i>	6.44E-07	-2.12246367	Enzyme of 'de novo' purine biosynthesis containing both 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase and inosine monophosphate cyclohydrolase activities, isozyme of Ade16p; ade16 ade17 mutants require adenine and histidine
<i>HO</i>	7.36E-07	-1.76502852	Site-specific endonuclease required for gene conversion at the MAT locus (homothallic switching) through the generation of a ds DNA break; expression restricted to mother cells in late G1 as controlled by Swi4p-Swi6p, Swi5p and Ash1p
<i>OPT2</i>	1.83E-06	-2.0173451	Oligopeptide transporter; member of the OPT family, with potential orthologs in <i>S. pombe</i> and <i>C. albicans</i> ; also plays a role in formation of mature vacuoles
<i>ERG5</i>	2.53E-06	-1.74467734	C-22 sterol desaturase, a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain in ergosterol biosynthesis; may be a target of azole antifungal drugs
<i>PTR2</i>	2.77E-06	-2.53806285	mediates transport of di- and tri-peptides
<i>YPC1</i>	2.88E-06	-1.73308228	Alkaline ceramidase that also has reverse (CoA-independent) ceramide synthase activity, catalyzes both breakdown and synthesis of phytoceramide; overexpression confers fumonisin B1 resistance
<i>HPT1</i>	7.74E-06	-1.72854188	Dimeric hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, catalyzes the formation of both inosine monophosphate and guanosine monophosphate; mutations in the human homolog HPRT1 can cause Lesch-Nyhan syndrome and Kelley-Seegmiller syndrome
<i>HMS1</i>	3.12E-05	-1.96510269	Basic helix-loop-helix (bHLH) protein with similarity to myc-family transcription factors; overexpression confers hyperfilamentous growth and suppresses the pseudohyphal filamentation defect of a diploid mep1 mep2 homozygous null mutant
<i>YLR049C</i>	0.00012805	-1.71521425	Putative protein of unknown function
<i>CWP1</i>	0.00023571	-2.49563586	Cell wall mannoprotein that localizes specifically to birth scars of daughter cells, linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucon heteropolymer through a phosphodiester bond; required for propionic acid resistance
<i>YMR144W</i>	0.00024068	-1.71651176	Putative protein of unknown function; localized to the nucleus; YMR144W is not an essential gene
<i>COX4</i>	0.00034465	-1.91059552	Subunit IV of cytochrome c oxidase, the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; precursor N-terminal 25 residues are cleaved during mitochondrial import; phosphorylated; spermidine enhances translation
<i>PHM6</i>	0.00034929	-1.98222854	Protein of unknown function, expression is regulated by phosphate levels
<i>GCV2</i>	0.00039635	-1.70874481	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF; expression is regulated by levels of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm
<i>ADE4</i>	0.00043879	-1.70785768	Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (PRPPAT; amidophosphoribosyltransferase), catalyzes first step of the 'de novo' purine nucleotide biosynthetic pathway
<i>ADE1</i>	0.00044975	-2.01530513	N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (SAICAR) synthetase, required for 'de novo' purine nucleotide biosynthesis; red pigment accumulates in mutant cells deprived of adenine
<i>SCS7</i>	0.00107647	-1.80540177	Sphingolipid alpha-hydroxylase, functions in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids, has both cytochrome b5-like and hydroxylase/desaturase domains, not essential for growth
<i>SAG1</i>	0.00142242	-1.73545467	Alpha-agglutinin of alpha-cells, binds to Aga1p during agglutination, N-terminal half is homologous to the immunoglobulin superfamily and contains binding site for a-agglutinin, C-terminal half is highly glycosylated and contains GPI anchor
<i>FUR4</i>	0.00184114	-1.73120857	Uracil permease, localized to the plasma membrane; expression is tightly regulated by uracil levels and environmental cues
<i>FAA1</i>	0.00227896	-2.25801109	Long chain fatty acyl-CoA synthetase, activates imported fatty acids with a preference for C12:0-C16:0 chain lengths; functions in long chain fatty acid import; accounts for most acyl-CoA synthetase activity; localized to lipid particles

Up-regulated genes

Gene name	Pvalue	FC	Description
<i>YBL065W</i>	3.29E-11	2.1115275	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on available experimental and comparative sequence data; partially overlaps verified ORF SEF1/YBL066C; YBL065W is a non-essential gene
<i>PAU9</i>	3.20E-09	2.0119407	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>PAU2</i>	1.15E-08	2.1238698	Member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme
<i>YKL071W</i>	2.67E-08	2.2000996	Putative protein of unknown function; expression induced in cells treated with the mycotoxin patulin, and also the quinone methide triterpene celastrol; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm
<i>PUG1</i>	1.06E-07	2.2784343	Plasma membrane protein with roles in the uptake of protoporphyrin IX and the efflux of heme; expression is induced under both low-heme and low-oxygen conditions; member of the fungal lipid-translocating exporter (LTE) family of proteins
<i>PAU20</i>	2.03E-07	2.2994762	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; expression induced by low temperature and also by anaerobic conditions; induced during alcoholic fermentation
<i>YBR016W</i>	1.01E-06	1.7044751	Tail-anchored plasma membrane protein containing a conserved CYSTM module; predicted to be palmitoylated; has similarity to hydrophilins, which are involved in the adaptive response to hyperosmotic conditions
<i>BIO2</i>	1.04E-06	2.1401966	Biotin synthase, catalyzes the conversion of dethiobiotin to biotin, which is the last step of the biotin biosynthesis pathway; complements E. coli bioB mutant
<i>YOR019W</i>	1.14E-06	1.8247839	Protein of unknown function that may interact with ribosomes, based on co-purification experiments
<i>INO1</i>	1.55E-06	2.7454811	Inositol-3-phosphate synthase, involved in synthesis of inositol phosphates and inositol-containing phospholipids; transcription is coregulated with other phospholipid biosynthetic genes by Ino2p and Ino4p, which bind the UASINO DNA element
<i>HPF1</i>	2.16E-06	1.8256446	Haze-protective mannoprotein that reduces the particle size of aggregated proteins in white wines
<i>NCE103</i>	2.48E-06	2.1826678	Carbonic anhydrase; poorly transcribed under aerobic conditions and at an undetectable level under anaerobic conditions; involved in non-classical protein export pathway
<i>PYC1</i>	3.01E-06	1.7633309	Pyruvate carboxylase isoform, cytoplasmic enzyme that converts pyruvate to oxaloacetate; highly similar to isoform Pyc2p but differentially regulated; mutations in the human homolog are associated with lactic acidosis
<i>PAU4</i>	4.04E-06	2.1875373	Member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme
<i>IZH4</i>	4.36E-06	5.1719371	Membrane protein involved in zinc ion homeostasis, member of the four-protein IZH family, expression induced by fatty acids and altered zinc levels; deletion reduces sensitivity to excess zinc; possible role in sterol metabolism
<i>OSW2</i>	5.36E-06	2.3524975	Protein of unknown function proposed to be involved in the assembly of the spore wall
<i>RTA1</i>	6.40E-06	4.8023256	Protein involved in 7-amincholesterol resistance; has seven potential membrane-spanning regions; expression is induced under both low-heme and low-oxygen conditions; member of the fungal lipid-translocating exporter (LTE) family of protein
<i>PAU15</i>	7.31E-06	1.7305407	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>PRM7</i>	7.72E-06	2.1633181	Pheromone-regulated protein, predicted to have one transmembrane segment; promoter contains Gcn4p binding elements
<i>NDE1</i>	8.60E-06	1.7628928	Mitochondrial external NADH dehydrogenase, a type II NAD(P)H:quinone oxidoreductase that catalyzes the oxidation of cytosolic NADH; Nde1p and Nde2p provide cytosolic NADH to the mitochondrial respiratory chain
<i>PAU14</i>	8.62E-06	2.1202317	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; identical to Pau1p
<i>NCA3</i>	1.02E-05	3.1101102	Protein that functions with Nca2p to regulate mitochondrial expression of subunits 6 (Atp6p) and 8 (Atp8p) of the Fo-F1 ATP synthase; member of the SUN family; expression induced in cells treated with the mycotoxin patulin
<i>PUT1</i>	1.23E-05	2.1391025	Proline oxidase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source; PUT1 transcription is induced by Put3p in the presence of proline and the absence of a preferred nitrogen source
<i>YOR338W</i>	1.39E-05	3.0611703	Putative protein of unknown function; YOR338W transcription is regulated by Azf1p and its transcript is a specific target of the G protein effector Scp160p; identified as being required for sporulation in a high-throughput mutant screen
<i>GDH3</i>	1.44E-05	1.9906548	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from Gdh1p; expression regulated by nitrogen and carbon sources

<i>IZH2</i>	1.44E-05	2.2640908	Plasma membrane protein involved in zinc homeostasis and osmotin-induced apoptosis; transcription regulated by Zap1p, zinc and fatty acid levels; similar to mammalian adiponectins; deletion increases sensitivity to elevated zinc
<i>YNL024C</i>	1.71E-05	2.5639689	Putative protein of unknown function with seven beta-strand methyltransferase motif; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YNL024C is not an essential gene
<i>AAD6</i>	2.04E-05	2.2218694	Putative aryl-alcohol dehydrogenase; involved in oxidative stress response; similar to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase; expression induced in cells treated with the mycotoxin patulin
<i>FAA4</i>	2.17E-05	2.0488887	Long chain fatty acyl-CoA synthetase, activates imported fatty acids with a preference for C12:0-C16:0 chain lengths; functions in long chain fatty acid import; important for survival during stationary phase; localized to lipid particles
<i>ALE1</i>	2.47E-05	2.0267613	Broad-specificity lysophospholipid acyltransferase, part of MBOAT family of membrane-bound O-acyltransferases; key component of Lands cycle; may have role in fatty acid exchange at sn-2 position of mature glycerophospholipids
<i>MEP2</i>	2.66E-05	1.7043315	Ammonium permease involved in regulation of pseudohyphal growth; belongs to a ubiquitous family of cytoplasmic membrane proteins that transport only ammonium (NH ₄ ⁺); expression is under the nitrogen catabolite repression regulation
<i>MOH1</i>	2.85E-05	1.7727188	Protein of unknown function, has homology to kinase Snf7p; not required for growth on nonfermentable carbon sources; essential for survival in stationary phase
<i>PAU11</i>	3.18E-05	2.0049327	Putative protein of unknown function and member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; mRNA expression appears to be regulated by SUT1 and UPC2
<i>ICT1</i>	3.42E-05	2.2208792	Lysophosphatidic acid acyltransferase, responsible for enhanced phospholipid synthesis during organic solvent stress; null displays increased sensitivity to Calcofluor white; highly expressed during organic solvent stress
<i>AAD16</i>	4.10E-05	1.8354379	Putative aryl-alcohol dehydrogenase; similar to <i>P. chrysosporium</i> aryl-alcohol dehydrogenase; mutational analysis has not yet revealed a physiological role
<i>RRT1</i>	4.43E-05	1.7631292	Identified in a screen for mutants with increased levels of rDNA transcription; dubious open reading frame unlikely to encode a protein, based on experimental and comparative sequence data
<i>ADI1</i>	4.64E-05	2.1733248	Acireductone dioxygenase involved in the methionine salvage pathway; ortholog of human MTCBP-1; transcribed with YMR010W and regulated post-transcriptionally by RNase III (Rnt1p) cleavage; ADI1 mRNA is induced in heat shock conditions
<i>FET3</i>	6.00E-05	2.0876311	Ferro-O ₂ -oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity, belongs to class of integral membrane multicopper oxidases
<i>PAU1</i>	6.22E-05	2.0191731	Member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme; identical to Pau14p
<i>PAU18</i>	6.91E-05	2.1632965	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; identical to Pau6p
<i>ATF1</i>	6.97E-05	2.4021553	Alcohol acetyltransferase with potential roles in lipid and sterol metabolism; responsible for the major part of volatile acetate ester production during fermentation
<i>PRM7</i>	7.80E-05	2.177254	Pheromone-regulated protein, predicted to have one transmembrane segment; promoter contains Gcn4p binding elements
<i>OLE1</i>	7.84E-05	4.4421267	Delta(9) fatty acid desaturase, required for monounsaturated fatty acid synthesis and for normal distribution of mitochondria
<i>PAU8</i>	8.59E-05	1.9530609	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>ARN2</i>	8.75E-05	1.7483281	Transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; responsible for uptake of iron bound to the siderophore triacetylfusarinine C
<i>DAN3</i>	0.00012675	1.8817939	Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p; member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; expressed under anaerobic conditions, completely repressed during aerobic growth
<i>YOR385W</i>	0.00013967	1.9030061	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YOR385W is not an essential gene
<i>CHA1</i>	0.00015592	1.8540776	Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase, catalyzes the degradation of both L-serine and L-threonine; required to use serine or threonine as the sole nitrogen source, transcriptionally induced by serine and threonine
<i>ARO10</i>	0.00016344	2.5693869	Phenylpyruvate decarboxylase, catalyzes decarboxylation of phenylpyruvate to phenylacetaldehyde, which is the first specific step in the Ehrlich pathway
<i>YER184C</i>	0.00016912	1.7838712	Putative zinc cluster protein; deletion confers sensitivity to Calcofluor white, and prevents growth on glycerol or lactate as sole carbon source
<i>DON1</i>	0.00018213	1.7594059	Meiosis-specific component of the spindle pole body, part of the leading edge protein (LEP) coat, forms a ring-like structure at the leading edge of the prospore membrane during meiosis II
<i>PAU16</i>	0.00019481	1.924277	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>MGA2</i>	0.00021876	1.7750116	ER membrane protein involved in regulation of OLE1 transcription, acts with homolog Spt23p; inactive ER form dimerizes and one subunit is then activated by ubiquitin/proteasome-dependent processing followed by nuclear targeting
<i>PAU10</i>	0.00023536	1.8166751	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>BAG7</i>	0.00023829	1.8453348	Rho GTPase activating protein (RhoGAP), stimulates the intrinsic GTPase activity of Rho1p, which plays a role in actin cytoskeleton organization and control of cell wall synthesis; structurally and functionally related to Sac7p

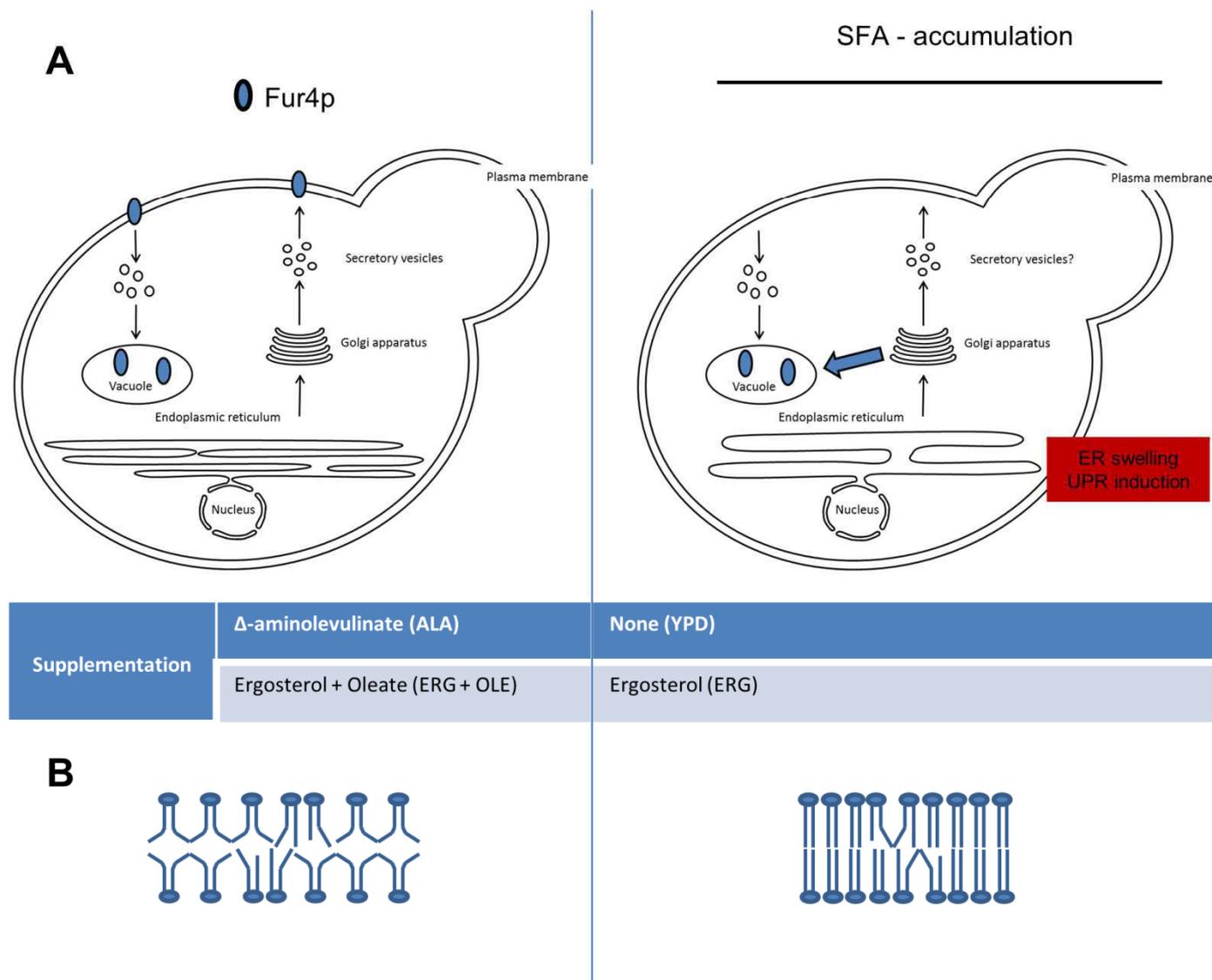
<i>PAU12</i>	0.00031686	1.9716065	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions
<i>SUE1</i>	0.00032814	1.8273099	Mitochondrial protein required for degradation of unstable forms of cytochrome c
<i>YMR316C-B</i>	0.00038874	1.7142699	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein, based on available experimental and comparative sequence data
<i>CRF1</i>	0.00039238	2.3870356	Protein that interacts specifically in vivo with phospholipid translocase (flippase) Dnf3p; similar to Cdc50p, which is an essential interaction partner of the flippase Drs2p
<i>PDR10</i>	0.00044777	1.7793012	ATP-binding cassette (ABC) transporter, multidrug transporter involved in the pleiotropic drug resistance network; regulated by Pdr1p and Pdr3p
<i>YPS3</i>	0.000548	2.1716388	Aspartic protease, member of the yapsin family of proteases involved in cell wall growth and maintenance; attached to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor
<i>PAU13</i>	0.00062698	1.9056727	Protein of unknown function, member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions; expression is induced after ethanol shock
<i>TDA4</i>	0.00073228	2.2403327	Putative protein of unknown function; null mutant is sensitive to expression of the top1-T722A allele
<i>RTS3</i>	0.00082652	1.7623321	Putative component of the protein phosphatase type 2A complex
<i>PAU6</i>	0.0008502	1.8134481	Member of the seripauperin multigene family encoded mainly in subtelomeric regions, active during alcoholic fermentation, regulated by anaerobiosis, negatively regulated by oxygen, repressed by heme; identical to Pau18p
<i>FAS2</i>	0.00095185	1.7266125	Alpha subunit of fatty acid synthetase, which catalyzes the synthesis of long-chain saturated fatty acids; contains the acyl-carrier protein domain and beta-ketoacyl reductase, beta-ketoacyl synthase and self-pantetheinylation activities
<i>HES1</i>	0.00113412	1.7001732	Protein implicated in the regulation of ergosterol biosynthesis; one of a seven member gene family with a common essential function and non-essential unique functions; similar to human oxysterol binding protein (OSBP)
<i>YGL039W</i>	0.00116853	2.3585109	Oxidoreductase shown to reduce carbonyl compounds to chiral alcohols
<i>TIS11</i>	0.00128386	1.8752267	mRNA-binding protein expressed during iron starvation; binds to a sequence element in the 3'-untranslated regions of specific mRNAs to mediate their degradation; involved in iron homeostasis
<i>DIA1</i>	0.00134481	1.8382475	Protein of unknown function, involved in invasive and pseudohyphal growth; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
<i>ROG3</i>	0.00166387	1.7586805	Protein that binds the ubiquitin ligase Rsp5p via its 2 PY motifs; has similarity to Rod1p; mutation suppresses the temperature sensitivity of an mck1 rim11 double mutant; proposed to regulate the endocytosis of plasma membrane proteins

Supplemental Table 3: List of the genes involved in sphingolipid pathway used for hierarchical clustering

This list was obtained from the *Saccharomyces genome database* (<http://www.yeastgenome.org/>).

Gene name	ORF name
<i>AUR1</i>	YKL004W
<i>CSG1</i>	YPL057C
<i>CSG2</i>	YBR036C
<i>DPL1</i>	YDR294C
<i>FEN1</i>	YCR034W
<i>IFA38</i>	YBR159W
<i>IPT1</i>	YDR072C
<i>ISC1</i>	YER019W
<i>LAC1</i>	YKL008C
<i>LAG1</i>	YHL003C
<i>LCB1</i>	YMR296C
<i>LCB2</i>	YDR062W
<i>LCB3</i>	YJL134W
<i>LCB4</i>	YOR171C
<i>LCB5</i>	YLR260W
<i>LIP1</i>	YMR298W
<i>PHS1</i>	YJL097W
<i>SCS7</i>	YMR272C
<i>SKN1</i>	YGR143W
<i>SUR2</i>	YDR297W
<i>SUR4</i>	YLR372W
<i>TSC10</i>	YBR265W
<i>TSC13</i>	YDL015C
<i>TSC3</i>	YBR058C-A
<i>YDC1</i>	YPL087W
<i>YPC1</i>	YBR183W
<i>YSR3</i>	YKR053C

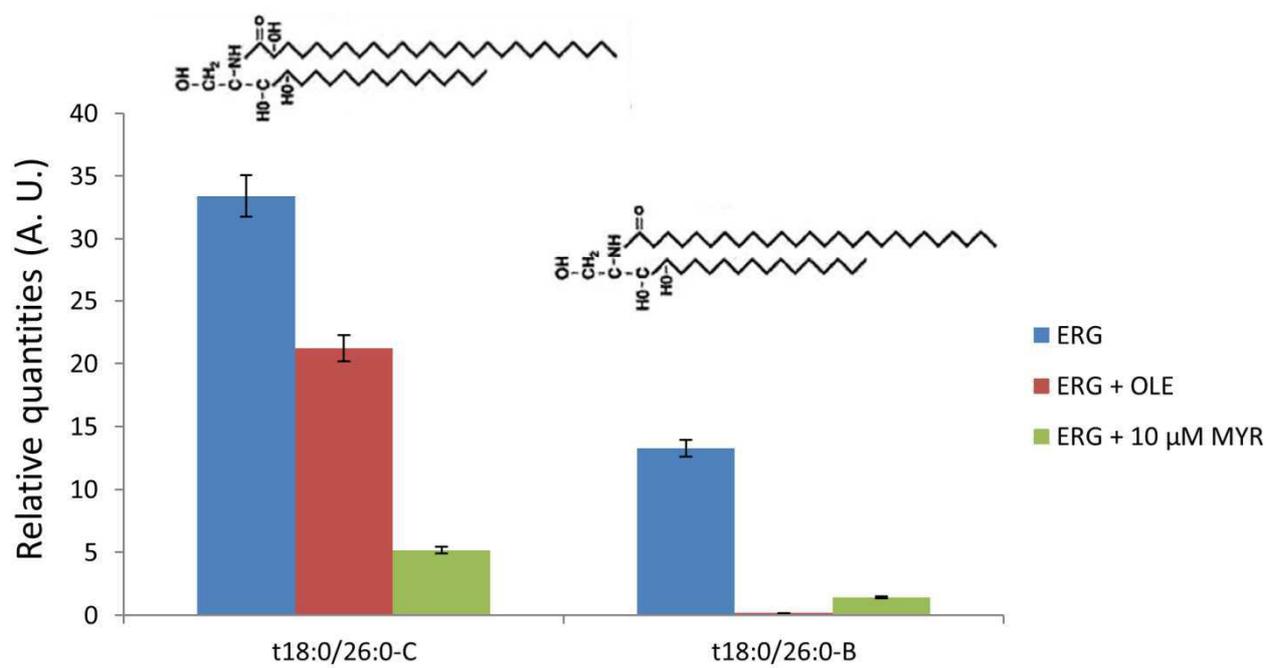
Supporting Figure 1



Supporting Figure 1: A yeast model for lipotoxicity

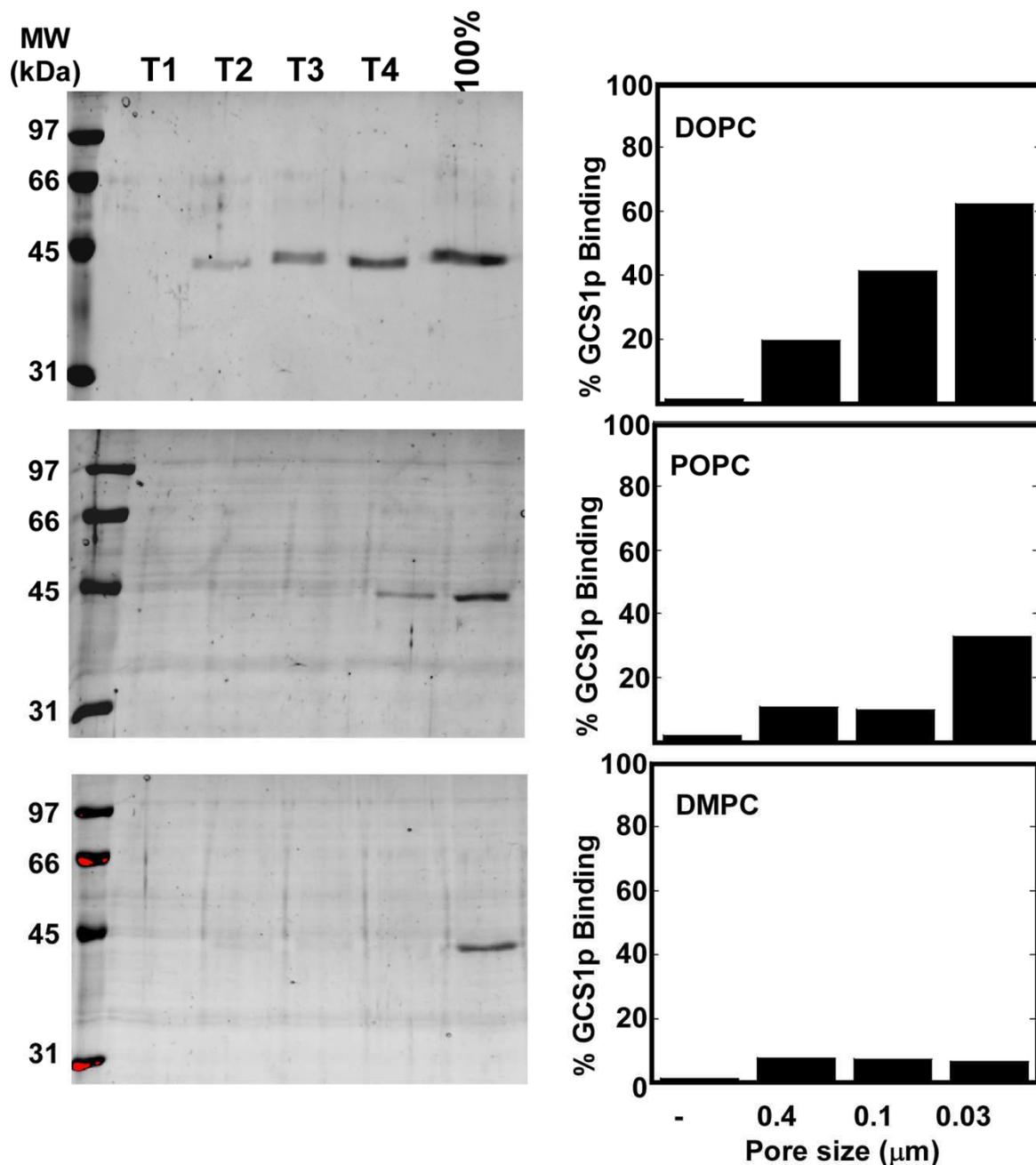
(A) *hem1Δ* cells can synthesize haem only if the medium is supplemented with Δ -aminolevulinate (ALA). Since haem is used as the prosthetic group of Ole1p, the fatty acid desaturase, and of several enzymes of the ergosterol pathway, *hem1Δ* cells accumulate Saturated Fatty Acids (SFA) and suffer Ergosterol depletion when grown in the absence of ALA (YPD). As with pancreatic β -cells, SFA accumulation is associated with ER-swelling and induction of the Unfolded Protein Response (UPR) in this organelle, but also with the diversion of selective plasma-membrane proteins, such as the Uracil permease Fur4p, from the Golgi apparatus to the vacuole for degradation. Full growth can be recovered if the cells are grown in the presence of exogenous sources of Ergosterol and Unsaturated Fatty Acids (UFA), such as the mono-unsaturated species oleic acid. (B) On a biophysical point of view, SFA accumulation correlates with an increase in the saturation rate of phospholipids which results, in turn, in an ordering of the membrane bilayers. See text for details.

Supporting Figure 2



Supporting Figure 2: Ceramide quantification

hem1Δ cells were grown in the indicated media for 7 h before lipid extraction and MS analysis in the positive ion mode. The relative quantities of the phytoceramide species t18:0/26:0-B ($m/z = 696.7$ Da) and t18:0/26:0-C ($m/z = 712.7$ Da), which were the most represented ceramides in our samples and differ from each other by one hydroxyl group, were estimated by comparison to N-octadecanoyl-Phytosphingosine (Avanti Polar Lipids, Inc.), used as a standard. Their schematic structures are also displayed. These species were unambiguously identified by scanning for the positive ion precursors of m/z 282.3 (Guan *et al.*, 2010). A. U.: Arbitrary Units.



Supporting Figure 3: Gcs1p recruitment to liposomes of defined composition and various radiuses

To determine the role of unsaturated lipids on Gcs1p recruitment, purified Gcs1p was incubated with either pure DOPC (dioleoyl PC), pure POPC (Palmitoyl-Oleoyl PC) or pure DMPC (dimyristoyl PC) liposomes of different radius (i.e. extruded through polycarbonate filters of respective pore size 0.4 μm (T2), 0.1 μm (T3) and 0.03 μm (T3), or no added liposomes (T1)), then loaded at the bottom of a three steps sucrose gradient before centrifugation as described in fig 6. Gcs1p recruitment to liposome was quantified by analysis of top fractions on SDS-PAGE and comparison to 100 % protein fraction (total loaded protein volume diluted into 100 μl final top volume).

Chapitre II : Implication des acides gras saturés dans la mucoviscidose

Résumé de la deuxième publication

Cystic fibrosis airway cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation

Article en révision dans la revue “American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology”.

Laurie-Anne Payet, Linette Kadri, Sébastien Giraud, Caroline Norez, Jean Marc Berjeaud, Christophe Jayle, Sandra Mirval, Frédéric Becq, Clarisse Vandebrouck, Thierry Ferreira.

La mutation la plus fréquente responsable de la mucoviscidose résulte d'un défaut de trafic de la protéine mutante F508del-CFTR vers sa destination finale. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le facteur n'ayant pas été pris en compte chez les patients CF, leur profil phospholipidique membranaire, pourrait être à l'origine de, ou du moins participer à l'efficacité moindre des correcteurs du F508del-CFTR dans les essais cliniques par rapport aux résultats obtenus *in vitro*. Dans cette deuxième publication, nous nous sommes donc intéressés aux contenus en AG des PL de cellules épithéliales bronchiques humaines homozygotes pour la mutation *F508del-CFTR*, et à leur implication dans la voie de sécrétion dans le contexte de la mucoviscidose. Dans ce chapitre, nous ferons référence aux figures provenant de cette publication. Celles-ci seront notées Fig. p2, suivi du numéro correspondant à la figure au sein de l'article.

Du palmitate s'accumule dans les PC des cellules de patients CF, mais cette accumulation n'est pas directement corrélée à la mutation *F508del-CFTR*.

Les extractions des PC des cellules épithéliales fraîchement dissociées de bronches CF et non-CF et leur analyse en spectrométrie de masse (MS) ont été initiées par Linette Kadri lors de son stage M2 au sein de notre équipe. Contrairement à ce que nous avons lu dans la littérature, la première observation que nous avons faite portait sur l'absence de différences concernant les PC contenant des AGPI, c'est-à-dire des PC(38:3), entre cellules de patients CF (Fig. p2-1B) et non-CF (Fig. p2-1A). En revanche, l'espèce PC(32:0), composée de deux palmitates (C16:0) était beaucoup plus abondante dans les cellules de patients CF comparées

aux non-CF, au détriment de l'espèce de PC(36:2), composée de deux oléates (C18:1). Les cellules de patients CF présentaient un profil de PC plus saturé que les non-CF (reflété par le pourcentage d'espèces de PC ne contenant pas de double liaison (DB), DB=0, Fig. p2-1E), au détriment des espèces di-insaturées (DB=2, Fig. p2-1E). La même étude menée dans les lignées cellulaires correspondantes (16HBE14o⁻ et CFBE41o⁻ qui seront nommées dans ce manuscrit lignées non-CF et CF, respectivement) a montré que les deux types cellulaires présentaient exactement le même profil de PC (Fig. p2-1C et 1D), l'espèce majoritaire étant PC(36:2), et l'espèce PC(32:0) étant retrouvée en très faible quantité. Ces données démontrent que les CFBE41o⁻, bien qu'étant des cellules épithéliales bronchiques humaines homozygotes pour la mutation *F508del-CFTR*, tout comme les cellules de patients CF, ne reflètent pas le contenu phospholipidique retrouvé dans les cellules fraîchement dissociées. Cette différence de profil lipidique proviendrait d'un facteur présent dans les poumons des patients que nous n'avons pas dans les conditions de culture *in vitro*.

Afin d'améliorer ce modèle cellulaire, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de palmitate dans les PC des cellules épithéliales bronchiques serait la conséquence d'une hypoxie induite par la couche épaisse de mucus visqueux dans les bronches de patients CF. En effet, les enzymes catalysant la désaturation des AGS en AGI sont oxygène-dépendantes (Los and Murata, 1998). Dans des conditions d'hypoxie, elles ne sont plus fonctionnelles et des AGS s'accumulent. Notre hypothèse a été renforcée par l'observation selon laquelle le taux de transcription du facteur 1 α induit par l'hypoxie, *HIF1 α* , était significativement supérieur dans les cellules de patients CF (Fig. p2-2A) comparées aux non-CF. Nous avons tenté de reproduire cette hypoxie en cultivant les lignées CF et non-CF en chambre hypoxique, dans laquelle l'oxygène peut être totalement remplacé par de l'azote. Ces expériences ont également été menées par Linette Kadri lors de son stage M2. Les PL ont été extraits et analysés en MS, puis dans le but d'avoir une vision plus quantitative que les abondances relatives représentées sur les spectres de masse, le rapport PC(32:0)/PC(36:2), reflétant le taux de saturation des PC, a été calculé à partir des spectres de masse. Pour les deux lignées cellulaires, la culture en chambre hypoxique induit une augmentation significative du taux de saturation (Fig. p2-2C et 2D). Cependant, les taux de saturation observés sont loin d'être aussi spectaculaires que ceux observés dans les cellules de patients (Fig. p2-2B). Priver les cellules d'oxygène résulte donc bien en l'accumulation d'AGS. Néanmoins, les 48 h de culture en hypoxie qui ont été appliquées dans les expériences

présentées dans la publication, ne sont pas suffisantes pour mimer le profil lipidique des cellules de patients CF.

Nous avons donc opté pour une stratégie alternative, déjà utilisée dans les cellules β humaines (Karaskov *et al.*, 2006), consistant en l'apport exogène d'AG conjugués à la BSA. L'incubation des CFBE410⁻ avec 1% de BSA (Fig. p2-3A) confère aux cellules un profil lipidique se rapprochant de celui observé pour les patients non-CF (Fig. p2-1A). L'utilisation de 1 mM de palmitate, la concentration classiquement utilisée avec les cellules β , entraîne l'accumulation de cet AG dans les PC, l'espèce majoritaire, sinon la seule, étant PC(32:0). Le taux de saturation obtenu avec cette concentration de palmitate étant trop élevé par rapport à celui observé chez les patients CF, nous avons alors testé une gamme de concentrations de palmitate allant de 0 à 1 mM. Les spectres de masses caractéristiques des profils obtenus pour 0, 100 μ M, 250 μ M et 1 mM de palmitate (Fig. p2-3A) montrent une augmentation de l'espèce PC(32:0) avec la concentration de palmitate testée. De façon plus générale, l'augmentation de la concentration de palmitate dans le milieu de culture entraîne une augmentation des espèces saturées (DB=0, Fig. p2-3B) au détriment des espèces mono- et di-insaturées (DB=1 et DB=2 respectivement, Fig. p2-3B). Afin de trouver la concentration en palmitate nous permettant de mimer le profil lipidique des patients CF, nous avons comparé les taux d'espèces de PC saturées (DB=0) obtenus après incubation des CFBE410⁻ avec différentes concentrations de palmitate, avec celui observé chez les patients CF. La concentration de 100 μ M de palmitate est celle qui nous permet de nous rapprocher au plus près du profil observé chez les patients CF (Fig. p2-3C).

L'augmentation du taux de saturation des PC induit un stress du RE et altère l'activité du F508del-CFTR corrigé.

L'incubation des cellules β avec du palmitate est connue pour induire l'apoptose de ces cellules (Cunha *et al.*, 2008). Pour cette raison, nous avons mesuré l'induction de l'apoptose des CFBE410⁻ incubées avec des concentrations croissantes de palmitate, grâce à un test ELISA (décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, IV- B- Détection et quantification de l'apoptose). Dans ce type cellulaire, l'apoptose n'est induite de façon significative qu'à partir de 250 μ M de palmitate (Fig. p2-4A, panneau de gauche) et peut être corrigée très efficacement par l'ajout de 50 μ M d'oléate (Fig. p2-4A, panneau de droite).

Lorsque nous nous sommes intéressés aux profils lipidiques correspondants, nous avons pu observer que l'incubation des CFBE41o⁻ avec 50 µM d'oléate en combinaison avec 250 µM de palmitate, induisait une très forte diminution de l'espèce PC(32:0) (Fig. p2-4B, panneau de gauche) qui était l'espèce majoritaire en l'absence d'oléate (Fig. p2-3A). L'incubation des CFBE41o⁻ en présence d'oléate seul conduit à un profil lipidique différent de celui obtenu en BSA, avec une accumulation de l'oléate dans l'espèce PC(36:2) (Fig. p2-4B, panneau de droite). Ceci suggère que l'ajout d'oléate dans le milieu de culture des CFBE41o⁻ contenant du palmitate induit le remodelage du profil de PC avec une diminution de l'espèce PC(32:0), confirmant l'implication du palmitate à forte concentration dans l'induction de l'apoptose.

Néanmoins, 100 µM de palmitate, la concentration nous permettant de mimer le profil lipidique des patients CF, n'induit pas l'apoptose des CFBE41o⁻. Sachant que dans les cellules β et chez la levure, l'apoptose s'accompagne de l'UPR (Pineau *et al.*, 2009; Diakogiannaki *et al.*, 2008), nous avons donc mesuré l'induction de ce stress du RE par la détermination du taux de phosphorylation d'eIF2α de la voie PERK (décrit dans le chapitre Introduction, II- A- 3a- L'UPR, Figure 15). L'incubation des CFBE41o⁻ avec 100 µM de palmitate induit une augmentation légère mais significative du taux de phosphorylation d'eIF2α comparé à celui obtenu avec le contrôle BSA (Fig. p2-4C). Ceci suggère qu'à cette concentration, la voie PERK-eIF2α est activée. L'ajout de 50 µM d'oléate, suffisante pour corriger l'induction de l'apoptose, semble réduire ce stress, mais pas de façon significative.

L'induction d'un stress du RE par l'incubation des CFBE41o⁻ avec 100 µM de palmitate, suggère qu'à cette concentration, l'intégrité du RE pourrait être affectée, et par conséquent, le repliement et le trafic des protéines pourraient être altérés. Le F508del-CFTR, normalement retenu dans le RE, peut être acheminé à la membrane plasmique par des agents pharmacologiques. Cette correction du trafic pourrait également être perturbée par l'ajout du palmitate dans les PC. Afin de tester cette hypothèse, l'activité du F508del-CFTR, corrigé par du miglustat, a été mesurée dans les CFBE41o⁻ après incubation avec 100 µM de palmitate, par la technique des efflux d'iodure. Sans correction par miglustat, F508del-CFTR n'est pas retrouvé à la membrane plasmique et sa stimulation spécifique par un mélange de forskoline (Fsk) et de génistéine (Gst) n'induit pas d'efflux d'iodure (Fig. p2-5A). Au contraire, l'incubation des CFBE41o⁻ avec miglustat restaure le trafic de F508del-CFTR à la membrane plasmique, et un flux d'iodure peut être mesuré après stimulation par Fsk+Gst. Cependant, ce flux est diminué de 35% lorsque les CFBE41o⁻ ont été préalablement incubées avec 100 µM

de palmitate (Fig. p2-5A et 5B) comparé au contrôle BSA. Le palmitate a donc un effet sur l'activité du F508del-CFTR corrigé. Par la suite, nous nous sommes demandés si cet effet était spécifique du F508del-CFTR ou s'il pouvait être généralisé aux autres protéines membranaires. Pour cela, nous avons testé l'activité de deux autres canaux chlorure présents à la membrane plasmique : Cl_{swell} (stimulé par un choc osmotique) et Cl_{Ca} (stimulé par l'ionophore calcique A23187). Tout comme pour le F508del-CFTR corrigé, l'activité des canaux Cl_{swell} et Cl_{Ca} avait diminué de 15% et 30% respectivement, suite à l'incubation des CFBE41o⁻ avec 100 μM de palmitate (Fig. p2-5C).

En conclusion de cet article, nous avons montré que du palmitate s'accumulait dans les PC membranaires des cellules épithéliales bronchiques des patients homozygotes pour la mutation *F508del-CFTR*. Cette accumulation pourrait être la conséquence de l'hypoxie retrouvée au niveau des poumons de ces patients. Dans notre modèle cellulaire amélioré afin de mimer le profil phospholipidique observé chez ces patients, nous avons montré que cette augmentation du taux de saturation des PC avait deux effets : l'induction de l'UPR et l'altération de l'activité du F508del-CFTR corrigé.



American Journal of Respiratory
and Critical Care Medicine/AJRCCM

Cystic fibrosis airway cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation.

Journal:	<i>American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	OC - Original Contribution
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	PAYET, Laurie-Anne; Université de Poitiers, KADRI, Linette; Université de Poitiers, GIRAUD, Sébastien; CHU de Poitiers, NOREZ, Caroline; Université de Poitiers, BERJEAUD, Jean-Marc; Université de Poitiers, JAYLE, Cristophe; CHU de Poitiers, MIRVAL, Sandra; Université de Poitiers, BECQ, Frédéric; Université de Poitiers, VANDEBROUCK, Clarisse; Université de Poitiers, FERREIRA, Thierry; Université de Poitiers, Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires
Keywords:	Cystic Fibrosis-Related Diabetes, Phospholipids, Saturated Fatty Acid, ER stress, Apoptosis

SCHOLARONE™
Manuscripts



Cystic fibrosis airway cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation

Laurie-Anne Payet¹, Linette Kadri¹, Sébastien Giraud², Caroline Norez¹, Jean Marc Berjeaud³, Christophe Jayle⁴, Sandra Mirval¹, Frédéric Becq¹, Clarisse Vandebrouck¹ and Thierry Ferreira¹.

¹ Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires, FRE CNRS 3511, Université de Poitiers, Poitiers, FRANCE

² Laboratoire Ischémie reperfusion en transplantation d'organes: mécanismes et innovation thérapeutiques, INSERM UMR1082, CHU de Poitiers, Poitiers, FRANCE

³ Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, Poitiers, FRANCE

⁴ Centre Hospitalier Universitaire la Milétrie, Service de Chirurgie Cardiothoracique, Poitiers, FRANCE

Corresponding author: Thierry Ferreira

thierry.ferreira@univ-poitiers.fr

Phone number: +33549454004

Fax number: +33549454014

Grants: This work was supported by the French MENRT (with a grant to LAP), the French association “Vaincre La Mucoviscidose”, the European Foundation for the Study of Diabetes and the CNRS.

Running Title: Lipointoxication in Cystic Fibrosis

9.17 Cystic Fibrosis: Translational & Clinical Studies

Total word count: 3486

At a glance:

The mistrafficking of the F508del-CFTR mutant form, responsible for Cystic Fibrosis (CF), can be corrected by pharmacological chaperones, but these molecules showed limitations in clinical trials. We show in the present study that freshly isolated CF bronchial epithelial cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation. This process results in the induction of an Endoplasmic Reticulum stress and alters the correction of F508del-CFTR by molecular chaperones. Therefore, relieving lipointoxication in CF cells may be a way to synergize corrector effects and optimize their therapeutic action.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org

Conception and design: LA, CV, TF; Performing the experiments: LA, LK, SG, CN, JMB, CJ, SM; Analysis and interpretation: LA, CV, TF; Drafting the manuscript for important intellectual content: LA, CN, FB, CV, TF; Writing the manuscript: LA, TF.

Abstract

Rationale: The *F508del-CFTR* mutation, responsible for Cystic Fibrosis (CF), leads to the retention of the protein in the endoplasmic reticulum (ER). The mistrafficking of this mutant form can be corrected by pharmacological chaperones, but these molecules showed limitations in clinical trials. We hypothesized that important factors in CF patients may have not been considered in the *in vitro* assays. CF is also associated with an altered lipid homeostasis, *i. e.* a decrease in polyunsaturated fatty acid levels in plasma and tissues. However, the precise fatty acyl content of membrane phospholipids from human CF bronchial epithelial cells has not been studied to date.

Objectives: Since the saturation level of phospholipids can modulate crucial membrane properties, with potential impacts on membrane protein folding/trafficking, we analyzed this parameter for freshly isolated bronchial epithelial cells from CF patients.

Methods: Phospholipids were analysed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Apoptosis and ER stress were quantified using ELISA and Western-blotting, respectively. Correction of *F508del-CFTR* activity was assessed by the iodide efflux technique.

Measurements and main results: Palmitate, a saturated fatty acid, accumulates within Phosphatidylcholine (PC) in CF freshly isolated cells, in a process that could result from hypoxia. The observed PC pattern can be recapitulated in CFBE41o⁺ cells by incubation with

100 μ M Palmitate. At this concentration, Palmitate induces an ER stress and leads to a decrease in the activity of the corrected F508del-CFTR.

Conclusion: Freshly isolated CF cells appear to be lipointoxicated by hypoxia-related Palmitate accumulation. This phenomenon could be an important bottleneck for F508del-CFTR trafficking correction by pharmacological means in clinical trials.

Number of words: 249

Keywords: Cystic Fibrosis-Related Diabetes, phosphatidylcholine, saturated fatty acids, ER stress, apoptosis

Introduction

Cystic fibrosis (CF), a genetic disease caused by mutations in the *CFTR* (CF Transmembrane conductance Regulator) gene, encoding a plasma-membrane chloride channel, has been described for the first time in 1936 and 1938 by Franconi and Anderson, respectively (1, 2). The corresponding gene was identified later in 1989 (3, 4). The most common mutation worldwide, the deletion of phenylalanine at position 508 (*F508del-CFTR*), leads to the retention of the corresponding protein in the endoplasmic reticulum (ER) and its degradation by the ER-associated protein degradation (ERAD) pathway (5-7).

The mistrafficking of *F508del-CFTR* to the plasma membrane can be restored by pharmacological agents. Among these correctors, 4-PBA (sodium 4-phenylbutyrate) (8), CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) (8), VX809 (9) and miglustat (10) have been tested in clinical trials but, until now, they appeared to be less efficient *in vivo* than *in vitro* (11-14). Our study falls within this context. We hypothesized that important factors in CF patients may have not been taken into consideration in the *in vitro* assays, therefore accounting for the clinical trial failure.

Before the *CFTR* gene discovery, CF had already been related to an altered lipid homeostasis, particularly to low concentrations of polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as linoleic acid (C18:2, (15)) and docosahexaenoic acid (C22:6, (16-18)), in CF patient plasma and tissues. Fatty acids (FA) are components of phospholipids (PL) and the species containing PUFA,

particularly phosphatidylcholine (PC), were also shown to be decreased in CF patient plasma (19).

Nevertheless, no study clearly determined the precise fatty acyl content of membrane PL in bronchial epithelial cells from CF patients. The unsaturation level of PL regulates crucial biophysical membrane properties and can therefore alter membrane protein folding and/or trafficking. Indeed, in previous studies using a simple eukaryotic model, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we showed that saturated fatty acid (SFA) accumulation within PL decreases membrane fluidity (20) and results in the accumulation of misfolded proteins within the ER, with the further induction of an ER-based response referred to as the Unfolded Protein Response (UPR). If sustained, this ER stress can ultimately lead to apoptosis (21). Vesicular budding is also perturbed under SFA accumulation (22). If such a lipointoxication occurred in CF patient cells, it could alter F508del-CFTR trafficking correction by pharmacological means.

In the present study, we therefore focused on the fatty acyl content of membrane PL in bronchial epithelial cells from CF patients. We first show that Palmitate (C16:0) accumulates within PC from CF patient cells but not in the corresponding CFBE41o⁺ cell line. Then, this CF cellular model was optimized to mimic the PL content encountered in CF patients and to evaluate the impacts of SFA-containing PL on ER stress induction and F508del-CFTR correction by pharmacological agents.

Materials and methods

Freshly isolated bronchial epithelial cells

The study was approved by our local institutional ethics committee. Human lung tissue was obtained from seven non-CF individuals and ten *F508del-CFTR/F508del-CFTR* individuals (mean age of 64 and 28 yrs respectively). Following lobectomy, bronchial tubes were isolated from lung samples, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and cut out in small segments. Epithelial cells were dissociated using enzymatic isolation for 24 h at 4°C with 0.1% (v/v) protease and 0.01% (v/v) deoxyribonuclease in a medium previously described (23). Freshly isolated cells were washed again with PBS before experiments.

Cell culture

The human bronchial epithelial CFBE41o⁻ (*F508del-CFTR/F508del-CFTR*) and 16HBE14o⁻ (wild type CFTR) cell lines, generously provided by Dr. D Grunert (24), were maintained at 37°C in 5% CO₂ and 95% O₂ in a culture medium (MEM, 31095, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with plasmocin (5 µg/ml) and 10% serum (v/v). Cells are frozen and thawed in a fetal bovine serum-containing medium before being cultured progressively in a horse serum-containing medium as described by Andersson *et al.* (25). For hypoxia experiments, cells were grown into a hypoxia chamber at 37°C in 5% CO₂ and 95% N₂ during 48 h.

FA preparation and cell treatment

Palmitate and Oleate preparation and cell treatment were described by Karaskov and colleagues (26).

Lipid extraction, phospholipid purification and mass spectrometry analyses

10^5 cells were harvested, washed with PBS and resuspended in 1 mL of water. Lipids were extracted as described by Folch et al. (27). The final organic phase, after evaporation, was dissolved in 1% (v/v) formic acid for ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry). The molecular profile of PC species was specifically obtained by scanning for the positive ion precursors of m/z 184, characteristic of choline phosphate.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA was extracted from 10^7 cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse-transcribed with SuperScript II (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Hypoxia-inducible factor 1 α (*HIF1 α*) expression was assessed relative to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression by RT-qPCR with the GeneAmp 9500 Sequence Detection System and SYBR Green chemistry (Life Technologies). The primers used were: *GAPDH*, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; and *HIF-1 α* , 5'-CATTACCCACCGCTGAAACG-3' and 5'-TTCCTGGGACTATTAGGCTC-3' (28).

Apoptosis quantification

Apoptosis was monitored using the cell death detection kit ELISA^{PLUS} (Roche, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions.

Western blot

Cells were lysed as described by Fresquet and colleagues (29). Western blot was performed as described by Karaskov and colleagues (26) with antibodies directed against the phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 α (P-eIF2 α , Cell Signaling, Beverly, MA, USA), eIF2 α (Cell Signaling), β tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany); secondary antibodies (Abcam, Paris, France) conjugated to horseradish peroxidase (HRP); and the Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Molsheim, France) detection system. Immunoblots were scanned and quantified using ImageJ software.

Iodide efflux

The activity of chloride channels was assessed by the iodide efflux technique as already described (30). All chemicals are from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except miglustat (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada), forskoline and genistein (LC Laboratories, Woburn, MA, USA).

Results

Palmitate accumulates within PC of bronchial epithelial cells from CF individuals, but this accumulation is not directly related to the F508del-CFTR mutation

Lipids extracted from freshly isolated bronchial epithelial cells of non-CF and CF patient lung samples were analyzed by ESI-MS. Characteristic PC profiles and the main peaks corresponding to molecular species of PC are displayed in Figure 1A (non-CF patient) and 1B (CF patient). The detailed composition of the various PC species in each sample is displayed in Supplemental Table E1. Interestingly, the most prominent differences between non-CF and CF patients were not observed for PC species bearing PUFA chains (*e. g.* PC(38:3); compare Fig. 1A and 1B). Rather, the obtained PC profiles revealed that PC(32:0), a PC species bearing two saturated (*i. e.* Palmitate C16:0) side chains, was very abundant in CF patients (2-fold increase; Fig. 1B), as compared to non-CF patient cells (Fig. 1A and Table E1). This shift towards more saturated lipid species can be visualized by representing the PC Double-Bond (DB) index (Fig. 1E). As shown, in CF patients, this shift is manifested by a dramatic increase of PC with two saturated acyl chains (*i.e.* total number of double bonds in both acyl chains is zero; DB=0) at the expense of PC with two monounsaturated acyl chains (DB=2). As shown on Figure 1A, the most represented DB=2 species corresponds to PC(36:2), a PC bearing two Oleate chains (C18:1). To check the link between the *F508del-CFTR* mutation and Palmitate accumulation within PC, the same experiment was performed on non-CF (Fig. 1C) and CF

(Fig. 1D) bronchial epithelial cell lines. Surprisingly, the two cell lines displayed the exact same PC profile, and no Palmitate accumulation within PC could be observed in the presence of the *F508del-CFTR* mutation (compare Fig. 1C and 1D; Table E1). The same observation could be made with the MM39 and CF-KM4 cell lines (non-CF and CF tracheal gland cell lines, respectively; unpublished data).

This demonstrated that the *F508del-CFTR* mutation is not responsible for the observed Palmitate accumulation *per se*.

The Palmitate accumulation within PC could be the result of hypoxia

To account for the discrepancies between the CFBE41o⁻ cell line and freshly isolated bronchial epithelial cells from CF patient lungs in terms of their lipid composition, we hypothesized that hypoxia could be the link between the disease and the observed Palmitate accumulation. Indeed, CF respiratory airways are obstructed by a thick layer of viscous mucus, which deprives the epithelial cells of oxygen (31). This process could result in the inactivation of the oxygen-dependent enzymes that desaturate FA (32), resulting in SFA accumulation within the cells. To test this hypothesis, the expression of the hypoxia-inducible factor 1 α (*HIF1 α*), a transcription factor activated by the decrease in oxygen availability (33), was determined in freshly isolated cells from CF and non-CF patient lungs (Fig. 2A). Interestingly, *HIF1 α* expression levels were significantly higher in CF patient cells compared to the non-CF ones, therefore reinforcing our original hypothesis.

In a next step, we tried to recreate the hypoxia conditions *in vitro*, by growing 16HBE14o⁻ and CFBE41o⁻ cells in a hypoxia chamber, where oxygen was totally replaced by nitrogen for 48 h (Fig. 2C and 2D). Lipids were extracted from the cells and analyzed by ESI-MS (detailed PC compositions are given in Supplemental Table E2). To get a more quantitative vision, the saturation rate (SR), corresponding to the ratio of the characteristic PC(32:0) over PC(36:2) species (Fig. 1) was calculated from the mass spectra obtained. The analyses revealed that the SR was 4-fold higher in hypoxia than under normoxia for both cell lines. In other words, oxygen scarcity resulted in Palmitate accumulation within PC species. However, the SR obtained under hypoxia were not as spectacular as the ones observed in freshly isolated CF cells (Fig. 2B). These discrepancies are likely related to: *i*) lower PC(32:0) levels in both cell lines grown under normoxia, compared to non-CF patient cells (Fig. 1E), and *ii*) a short-term incubation in the hypoxia chamber which may not fully mimic the chronic hypoxia that CF patients are subjected to

Altogether, if these experiments clearly demonstrated that hypoxia could account for the Palmitate accumulation observed *in vivo*, the use of a hypoxia chamber to mimic the CF PC pattern in the CFBE41o⁻ cell line showed important limitations.

Exogenous Palmitate supply can be used to mimic the PC pattern observed in vivo

We therefore developed an alternative strategy, already used with mammalian β -cells (26), to accumulate palmitate within PC of CFBE41o⁻ cells. BSA-conjugated Palmitate was added to

the CFBE41o⁻ cell cultures at a final concentration of 1 mM, for 16 h, before lipid extraction and analysis by ESI-MS. As shown on Figure 3A, CFBE41o⁻ cells incubated with 1% BSA displayed a non CF-like PC profile (Fig. 1A). In contrast, when incubated with 1% BSA-1 mM Palmitate, PC(32:0) became the major, if not the only, PC species in CFBE41o⁻ cells. These data indicate that exogenous Palmitate can be efficiently incorporated within PC, but that 1 mM Palmitate is too high to reproduce the freshly isolated CF cell PC pattern.

Therefore, various BSA-conjugated Palmitate concentrations, ranging from 0 to 1 mM Palmitate, were tested. Characteristic PC profiles obtained with representative Palmitate concentrations (Fig. 3A) showed that PC(32:0) species levels increased with Palmitate concentration in the medium (detailed PC compositions are given in Supplemental Table E3). More generally, increasing the exogenous Palmitate supply resulted in an increase of the saturated species (Fig. 3B, DB=0), at the expense of the mono- and diunsaturated species (Fig. 3B; DB=1 and DB=2, respectively). To find the concentration which could mimic the CF PC pattern at best, we compared the DB=0 obtained for each tested concentration with the one obtained for CF patients (Fig. 3C). 100 μ M Palmitate resulted in a PC profile matching at best the CF PC pattern.

High PC saturation rates induce apoptosis in bronchial epithelial cells

Both in yeast and β cells, Palmitate accumulation has been shown to induce apoptosis (21, 34). To evaluate whether this could be also the case for bronchial epithelial cells, CFBE41o⁻ cells were incubated with the same Palmitate concentrations as the ones used for the PC profile study, and apoptosis induction was monitored by an ELISA test. Apoptosis was significantly induced from a Palmitate concentration of 250 μ M (Fig. 4A, left panel). Interestingly, the addition of 50 μ M Oleate, an UFA, was enough to alleviate this palmitate-induced apoptosis (Fig. 4A, right panel).

PC(32:0), the major PC species when CFBE41o⁻ cells were incubated with 250 μ M Palmitate (Fig. 3A), decreased dramatically when 50 μ M Oleate was added in combination with Palmitate (Fig. 4B, left panel). Moreover, CFBE41o⁻ cells incubated with Oleate alone displayed an increase in PC(36:2) amounts (Fig. 4B, right panel), compared to the BSA control (Fig. 3A). These data show that Oleate addition to CFBE41o⁻ cells, cultured in the presence of Palmitate, induces a remodeling of the PC profile with the decrease of PC(32:0) species.

Interestingly, the 100 μ M Palmitate concentration, which results in a PC pattern similar to the one encountered in CF patients, did not induce apoptosis in CFBE41o⁻ cells (Fig. 4A). In yeast and in β cells, apoptosis induction by SFA is paralleled by UPR induction (21, 35). In mammalian cells, UPR is composed of three independent pathways: IRE1 (inositol requiring

1), ATF6 (activating transcription factor 6) and PERK (protein kinase like ER kinase). PERK, which is the preferential target of SFA toxicity in β -cells, phosphorylates the α -subunit of the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) after activation by an ER stress. Thus, the phosphorylation rate of eIF2 α can be used as a marker of the SFA-induced ER stress (26, 34-36). As shown on Figure 4C, incubation of CFBE41o⁻ cells with 100 μ M Palmitate resulted in a slight but significant increase of the phosphorylation rate of eIF2 α , as compared to the control (BSA), suggesting that, at this Palmitate concentration, the PERK pathway is already induced. However, 50 μ M Oleate addition failed to fully alleviate eIF2 α phosphorylation by Palmitate (Fig. 4C).

Effects of exogenous Palmitate supply on corrected F508del-CFTR activity

Thereafter, we hypothesized that Palmitate accumulation within PC of CF patient cells could alter F508del-CFTR trafficking correction by pharmacological agents. Figure 5A shows a representative iodide efflux trace obtained for the study of the F508del-CFTR activity. Without treatment with miglustat, F508del-CFTR could not reach the plasma membrane and the relevant iodide efflux was close to zero. After treatment with miglustat, iodide efflux was restored, but was 35% lower when cells were incubated with Palmitate (Fig. 5B). The same decrease in F508del-CFTR activity after Palmitate treatment was observed with isoLAB, another F508del-CFTR trafficking corrector (37) (unpublished data). This Palmitate effect was not specific for F508del-CFTR activity. Indeed, the activity of Cl_{Ca} and Cl_{swell} channels,

two other plasma membrane chloride channels, displayed 30%- and 15%-decreases, respectively, after CFBE41o⁻ cells incubation with palmitate (Fig. 5C).

In yeast, we have already shown that Oleate can alleviate Palmitate impacts on protein trafficking (38). We therefore measured the F508del-CFTR activity, after treatment with Palmitate and/or Oleate and correction with miglustat. Unfortunately, an addition of 50 μ M Oleate, a concentration sufficient to relieve apoptosis induction (Fig. 4), failed to restore a maximal iodide efflux in CFBE41o⁻ cells under Palmitate treatment (unpublished data). Higher concentrations of Oleate also failed to restore the maximal F508del-CFTR activity (unpublished data).

Discussion

In the present study, we show that Palmitate accumulates within PC from freshly isolated CF bronchial epithelial cells, but not in the corresponding CFBE41o⁺ cell line under standard culture conditions (Fig. 1). This Palmitate accumulation could be the consequence of hypoxia (Fig. 2), but the culture the CFBE41o⁺ cells in a hypoxia chamber did not allow to fully recapitulate the Saturation Rate (SR) of PC from freshly isolated CF cells. Then, we developed an alternative strategy and showed that incubation of CFBE41o⁺ cells with 100 μ M Palmitate resulted in a PC profile that appeared fairly similar to the one encountered with CF patients (Fig. 3). This Palmitate concentration did not appear obviously toxic to the cells, but resulted in an ER stress (Fig. 4). These data suggest, if extrapolated to the epithelial airway cells from CF patients, that CF cells display a lipointoxication-like phenotype.

UPR induction in CF is a controversial subject. Some studies demonstrated an atypical UPR induction in CF, characterized by the lack of the PERK-eIF2 α induction (39, 40), while others showed the absence of ER stress in CF cells (41). However, if these studies were performed on very different cell types, ranging from CF primary cultured cells to heterozygote CF cell lines, they have a common point: all the cells were cultured in a “classical” medium, such as the one we used for the CFBE41o⁺ cells without Palmitate treatment, which results in PC profiles that are quite different from the one encountered in CF patient cells when collected and manipulated just after the surgery (Fig. 1).

We therefore propose, based on the results presented in this study, that UPR induction is not related to *F508del-CFTR* expression *per se*, but to secondary alterations in the cellular lipid composition (lipointoxication) related to hypoxia.

A very interesting point is the role of Palmitate in β -cell death and its relevance to the etiology of Type 2 diabetes. As already mentioned, such as demonstrated here for epithelial cells, β -cell exposure to long chain SFA, including Palmitate, results in ER stress (34, 35), which can ultimately lead to cell death by apoptosis. This process is believed to contribute to the decrease of the β cell mass, leading to a deficient insulin secretion and therefore the development of Type 2 diabetes (42). In CF, with the advancing patient age, the most common comorbidity is cystic fibrosis-related diabetes (CFRD) (43). It has been shown in CFRD β -cells an abnormal Cl^- channel function leading to thick viscous secretions obstructing the exocrine pancreas, and a significantly reduced percentage of insulin-producing cells within islets (44-47). The data presented in this study may shed a new light on the underlying mechanisms. Indeed, one may assume that hypoxia-driven Palmitate accumulation may well be a crucial determinant for β -cell dysfunction in CFRD.

We also show that increasing the SR of PC has a significant impact on *F508del-CFTR* trafficking correction by miglustat. Indeed, the incubation of CFBE41o⁻ cells with 100 μM Palmitate results in the decrease of *F508del-CFTR* iodide efflux, reflecting the Cl^- current. To account for this observation, we can formulate two hypotheses, which may be not exclusive

one to the other: the decrease in Cl^- current could be due to alterations in trafficking correction of the F508del-CFTR protein to the plasma membrane due to general impacts of saturated PL on the secretory pathway, or to a loss of function of the corrected protein. High saturated PL levels impact membrane properties in many ways. First, they tend to decrease membrane fluidity/increase membrane order, which is not compatible with most of the cellular processes that require high membrane dynamics, such as protein translocation/folding in the ER (21). Second, they tend to increase bilayer thickness, which should match the thickness of the hydrophobic membrane-spanning regions of an integral protein to avoid exposure of hydrophobic residues to water, a phenomenon known as hydrophobic-mismatch (for review, see (48)). As a consequence, increasing membrane thickness may have dramatic consequences on the folding, and therefore the trafficking and/or function, of membrane-embedded proteins such as the CFTR channel. Finally, PL shape itself modulates important biophysical parameters, including membrane curvature and lipid packing (22). As shown on Fig. 1E, PC species containing two SFA display a cylindrical shape ($\text{DB}=0$, Fig. 1E) while PC containing two UFA display an overall conical shape ($\text{DB}=2$, Fig. 1E). Therefore, Palmitate accumulation within PC species is expected to shift the shape of the overall PC population from conical to rather cylindrical (Fig. 1E). Conical lipids are required to form areas of positive and negative curvature, and therefore SFA-related conical-PL depletion is expected to alter membrane bending. Moreover, conical lipid deprivation also results in increased lipid packing which alters the recruitment of loose lipid packing-sensing proteins required for

optimal budding, to nascent vesicles (22). Altogether, these processes could account for a global disruption of the entire secretory pathway.

Overall, SFA accumulation within membrane PL is expected to have very broad and general impacts on membrane-embedded proteins in the CF cell. Relevantly, we could show in this study that several Cl channels, including the corrected F508del-CFTR, are impacted either in their trafficking and/or function under SFA accumulation, with, as a consequence, a significant decrease in iodide efflux (Fig. 5). This strongly suggests that human CF bronchial epithelial cells are lipointoxicated by SFA, a process that ought to be considered for the development of future therapeutic strategies.

To conclude, if understanding the precise impacts of SFA on F508del-CFTR trafficking and/or function will require further work, such as the analysis of the delivery of the mutant form to the plasma-membrane under SFA accumulation in overexpressing models, data presented in this study may bring some new explanations concerning the discrepancies between *in vitro* and *in vivo* effects of correctors. We propose that hypoxia-related SFA accumulation impacts on membrane properties could be an important bottleneck for F508del-CFTR trafficking correction by pharmacological means in clinical trials. Relieving lipointoxication in CF cells may well be a way to synergize corrector effects and optimize their therapeutic action.

Acknowledgements

We are very grateful to Wassim Kaaki (Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Poitiers, France) for excellent technical assistance with electrospray ionization mass spectrometry. And we also thank Pr. Pierre Bonnette (Hôpital Foch, Suresnes, France) for access to human CF lung samples.

For Review Only

References

1. Strandvik B. Fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;83:121-129.
2. Anderson D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *Am J Dis Child*. 1938;56:344-399.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-1073.
4. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-1065.
5. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. Defective intracellular transport and processing of cftr is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990;63:827-834.
6. Zhang F, Kartner N, Lukacs GL. Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta f508 cftr. *Nat Struct Biol* 1998;5:180-183.
7. Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 2002;277:11709-11714.
8. Andersson C, Roomans GM. Activation of deltaf508 cftr in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and cpx. *Eur Respir J* 2000;15:937-941.
9. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the f508del-cftr protein processing defect in vitro by the investigational drug vx-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18843-18848.
10. Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H, Becq F. Rescue of functional delf508-cftr channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* 2006;580:2081-2086.
11. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (buphenyl) in deltaf508-homozygous cystic fibrosis patients: Partial restoration of nasal epithelial cftr function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:484-490.
12. McCarty NA, Standaert TA, Teresi M, Tuthill C, Launspach J, Kelley TJ, Milgram LJ, Hilliard KA, Regelmann WE, Weatherly MR, Aitken ML, Konstan MW, Ahrens RC. A phase i randomized, multicenter trial of cpx in adult subjects with mild cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002;33:90-98.
13. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, De Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, Rosenbluth DB, Rubenstein RC, Schechter MS, Botfield M, Ordonez CL, Spencer-Green GT, Vernillet L, Wisseh S, Yen K, Konstan MW. Results of a phase iia study of vx-809, an investigational cftr corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the f508del-cftr mutation. *Thorax* 2012;67:12-18.
14. Leonard A, Lebecque P, Dingemans J, Leal T. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *J Cyst Fibros* 2012;11:231-236.
15. Kuo PT, Huang NN, Bassett DR. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 1962;60:394-403.
16. Underwood BA, Denning CR, Navab M. Polyunsaturated fatty acids and tocopherol levels in patients with cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1972;203:237-247.
17. Freedman SD, Blanco PG, Shea JC, Alvarez JG. Analysis of lipid abnormalities in cf mice. *Methods Mol Med* 2002;70:517-524.

18. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, Laposata M, Alvarez JG, O'Sullivan BP. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* 2004;350:560-569.
19. Guerrero IC, Astarita G, Jais JP, Sands D, Nowakowska A, Colas J, Sermet-Gaudelus I, Schuereberg M, Piomelli D, Edelman A, Ollero M. A novel lipidomic strategy reveals plasma phospholipid signatures associated with respiratory disease severity in cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2009;4:e7735.
20. Deguil J, Pineau L, Rowland Snyder EC, Dupont S, Beney L, Gil A, Frapper G, Ferreira T. Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape. *Traffic* 2011;12:349-362.
21. Pineau L, Colas J, Dupont S, Beney L, Fleurat-Lessard P, Berjeaud JM, Berges T, Ferreira T. Lipid-induced ER stress: Synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic* 2009;10:673-690.
22. Payet LA, Pineau L, Snyder ECR, Colas J, Moussa A, Vannier B, Bigay J, Clarhaut J, Becq F, Berjeaud JM, Vandebrouck C, Ferreira T. Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties. *Traffic*;in press.
23. Bertrand J, Boucherle B, Billet A, Melin-Heschel P, Dannhoffer L, Vandebrouck C, Jayle C, Routaboul C, Molina MC, Decout JL, Becq F, Norez C. Identification of a novel water-soluble activator of wild-type and f508del CFTR: Gpact-11a. *Eur Respir J* 2010;36:311-322.
24. Ehrhardt C, Collnot EM, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim KJ, Lehr CM. Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: Characterisation of the human bronchial epithelial cell line cfbe41o. *Cell Tissue Res* 2006;323:405-415.
25. Andersson C, Al-Turkmani MR, Savaille JE, Alturkmani R, Katrangi W, Cluette-Brown JE, Zaman MM, Laposata M, Freedman SD. Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res* 2008;49:1692-1700.
26. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to ins-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2006;147:3398-3407.
27. Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, LeBaron FN. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 1951;191:833-841.
28. Potiron VA, Sharma G, Nasarre P, Clarhaut JA, Augustin HG, Gemmill RM, Roche J, Drabkin HA. Semaphorin sema3f affects multiple signaling pathways in lung cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:8708-8715.
29. Fresquet F, Clement R, Norez C, Sterlin A, Melin P, Becq F, Kitzis A, Thoreau V, Bilan F. Orphan missense mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: A three-step biological approach to establishing a correlation between genotype and phenotype. *J Mol Diagn* 2011;13:520-527.
30. Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C. Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous f508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic* 2006;7:562-573.
31. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002;109:317-325.
32. Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1394:3-15.
33. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551-578.
34. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P,

- Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. Initiation and execution of lipotoxic er stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 2008;121:2308-2318.
35. Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 2008;197:553-563.
36. Dhayal S, Morgan NG. Structure-activity relationships influencing lipid-induced changes in eif2alpha phosphorylation and cell viability in brin-bd11 cells. *FEBS Lett* 2011;585:2243-2248.
37. da Cruz FP, Newberry S, Jenkinson SF, Wormald MR, Butters TD, Alonzi DS, Nakagawa S, Becq F, Norez C, Nash RJ, Kato A, Fleet GW. 4-c-me-dab and 4-c-me-lab - enantiomeric alkyl-branched pyrrolidine iminosugars - are specific and potent alpha-glucosidase inhibitors; acetone as the sole protecting group. *Tetrahedron Lett* 2011;52:219-223.
38. Pineau L, Bonifait L, Berjeaud JM, Alimardani-Theuil P, Berges T, Ferreira T. A lipid-mediated quality control process in the golgi apparatus in yeast. *Mol Biol Cell* 2008;19:807-821.
39. Nanua S, Sajjan U, Keshavjee S, Hershenson MB. Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:135-143.
40. Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA, Falsafi R, Wang S, Hsu K, Chilvers MA, Hogg JC, Hancock RE, Turvey SE. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 mapk-mediated innate immune responses. *J Immunol* 2012;189:5467-5475.
41. Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C, Tseng J, Do J, Huang N, Machen TE. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and deltaf508cftr on inflammatory response, er stress, and ca2+ of airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L1250-1260.
42. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102-110.
43. Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B, Thomas W. Cystic fibrosis-related diabetes: Current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes Care* 2009;32:1626-1631.
44. Iannucci A, Mukai K, Johnson D, Burke B. Endocrine pancreas in cystic fibrosis: An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1984;15:278-284.
45. Abdul-Karim FW, Dahms BB, Velasco ME, Rodman HM. Islets of langerhans in adolescents and adults with cystic fibrosis. A quantitative study. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:602-606.
46. Soejima K, Landing BH. Pancreatic islets in older patients with cystic fibrosis with and without diabetes mellitus: Morphometric and immunocytologic studies. *Pediatr Pathol* 1986;6:25-46.
47. Kelly A, Moran A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 2013;12:318-331.
48. Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 2003;1612:1-40.

Figure legends

Figure 1: PC profiles of CF and non-CF cells

Positive ion mass spectra specific for molecular species of PC. Lipids were extracted from bronchial epithelial cells of A) non-CF or B) CF patient lungs, and from C) non-CF and D) CF bronchial epithelial cell lines. The total carbon chain length (x) and number of carbon-carbon double bonds (y) of the main PC molecular species are indicated (x:y). A. U., arbitrary unit. E) The relative percentage of saturated (DB=0) versus monounsaturated (DB=1) and diunsaturated (DB=2) species were calculated from the mass spectra. Values are means \pm SD of at least three independent measurements. Schematic representations of the major PC species are included.

Figure 2: Relationship between PC saturation rate and hypoxia

A) *HIF1 α* expression in non CF and CF patient bronchial epithelial cells, expressed as a percentage of *GAPDH*, used as a standard. Each point represents the mean of three determinations for one patient sample. Saturation rate (SR) of B) patient cells, C) non-CF and C) CF bronchial epithelial cell lines after incubation or not into a hypoxia chamber without oxygen during 48 hours. SR corresponds to the ratio PC(32:0)/PC(36:2), calculated from the mass spectra. Each point represents the mean of three determinations for one patient or one passage. The *P*value was calculated by a two-tailed *t* test, using Graphpad Prism 6 software. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$. Means \pm SEM are indicated.

Figure 3: Effects of exogenous Palmitate intake on the fatty acyl content of PC

A) Positive ion mass spectra specific for molecular species of PC extracted from CFBE41o⁻ cells after incubation with 1% BSA, 100 μ M Palmitate, 250 μ M Palmitate or 1 mM Palmitate

during 16 h. The total carbon chain length (x) and number of carbon-carbon double bonds (y) of the main PC molecular species (x:y) are indicated. A. U., arbitrary unit. B) Relative percentage of saturated (DB=0) versus monounsaturated (DB=1) and diunsaturated (DB=2) species of CFBE410⁺ after incubation with Palmitate at the indicated concentrations, were calculated from the mass spectra. C) Relative percentage of saturated PC species of CFBE410⁺ cells after incubation with Palmitate concentrations ranged from 0 to 1 mM. Values are means \pm SD of at least three independent measurements. Schematic representations of the major PC species are included.

Figure 4: Effects of fatty acyl content of PC on apoptosis induction

A) Apoptosis quantification in CFBE410⁺ cells after incubation with Palmitate (left) and with Palmitate and/or Oleate (right), during 16 h, using the cell death detection ELISA^{PLUS} kit (Roche). The *P*value was calculated by a One-way ANOVA test, using Graphpad Prism 6 software ****: $P < 0.0001$; ns, no significant difference compared to the control (BSA). B) Positive ion mass spectra specific for molecular species of PC from CFBE410⁺ cells after incubation with 250 μ M Palmitate + 50 μ M Oleate and with 50 μ M Oleate during 16 h. The total carbon chain length (x) and number of carbon-carbon double bonds (y) of the main PC molecular species (x:y) are indicated. A. U., arbitrary unit. Schematic representations of the major PC species are also included. C) Phosphorylation rate of eIF2 α , an ER stress marker. Left: representative western blot of total protein extracts from CFBE410⁺ cells after treatment with Palmitate and/or oleate. Right: quantification of eIF2 α phosphorylation as ratios of P-eIF2 α versus total eIF2 α , assuming a value of 1 for the ratio determined from the control (BSA). All values, obtained from at least three independent experiments, were normalized to a loading control (β tubulin).

Figure 5: Effects of fatty acyl content of PC on CF channels activity

A) Representative traces of iodide efflux curves obtained after stimulation of the F508del-CFTR activity by Forskoline (Fsk, 10 μ M) + Genistein (Gst, 30 μ M) in CFBE41o⁻ cells incubated or not with 100 μ M Palmitate, and treated with 100 μ M miglustat during 2 h. B) Histograms show the mean relative rate of F508del-CFTR activity corrected or not by miglustat after treatment with Palmitate ($n=4$). C) Histograms show the mean relative rate of Cl_{swell} after its stimulation by an osmotic choc, and Cl_{Ca} after its stimulation by the calcium ionophore A23187 (1 μ M) in CFBE41o⁻ cells treated or not with Palmitate ($n=4$). Means \pm SEM are indicated. The P value was calculated by a two-tailed t test, using Graphpad Prism 6 software. *: $p<0.05$. **: $p<0.01$. ***: $p<0.001$. ns: no significant difference compared to the control BSA.

Figure 1

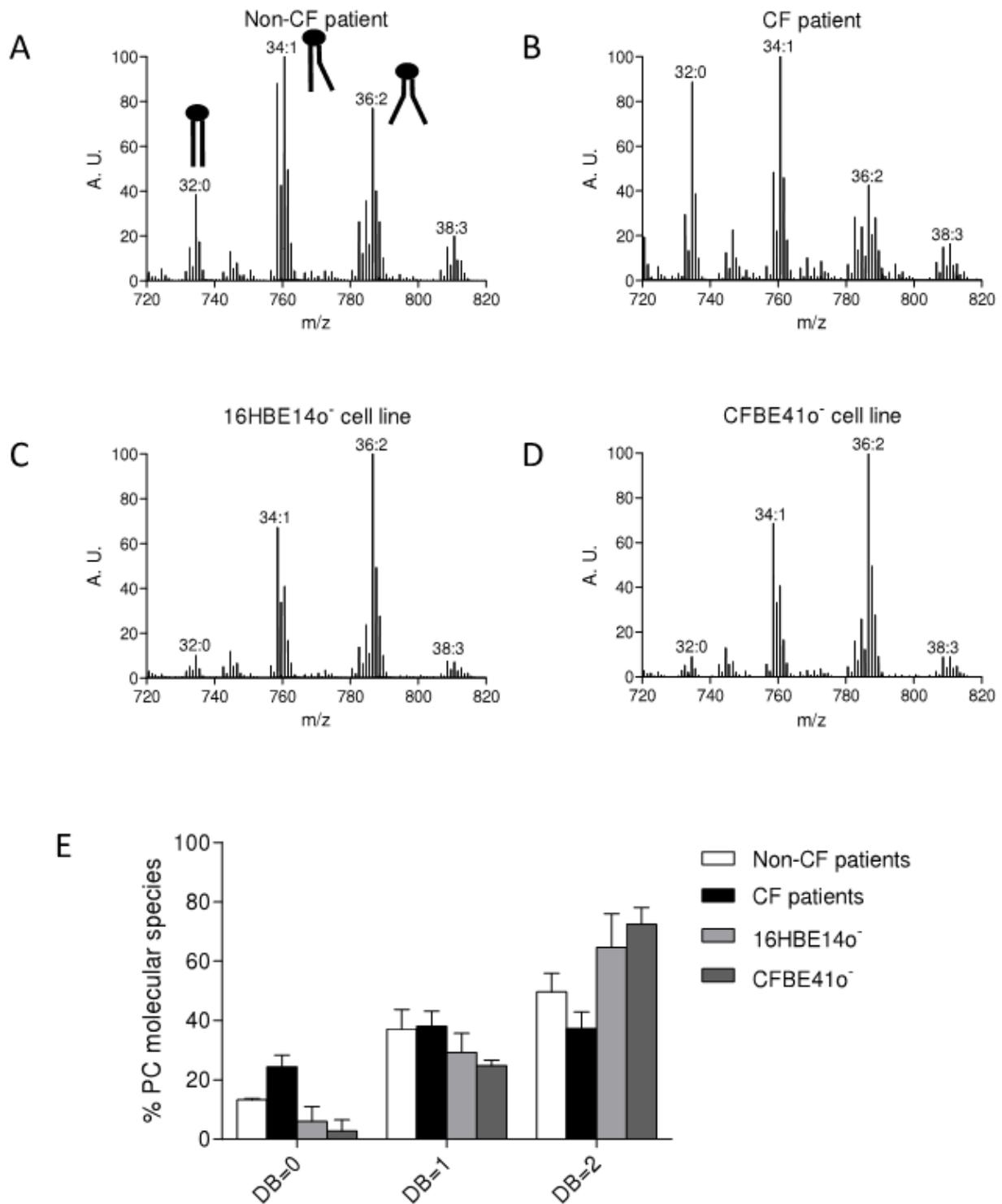


Figure 2

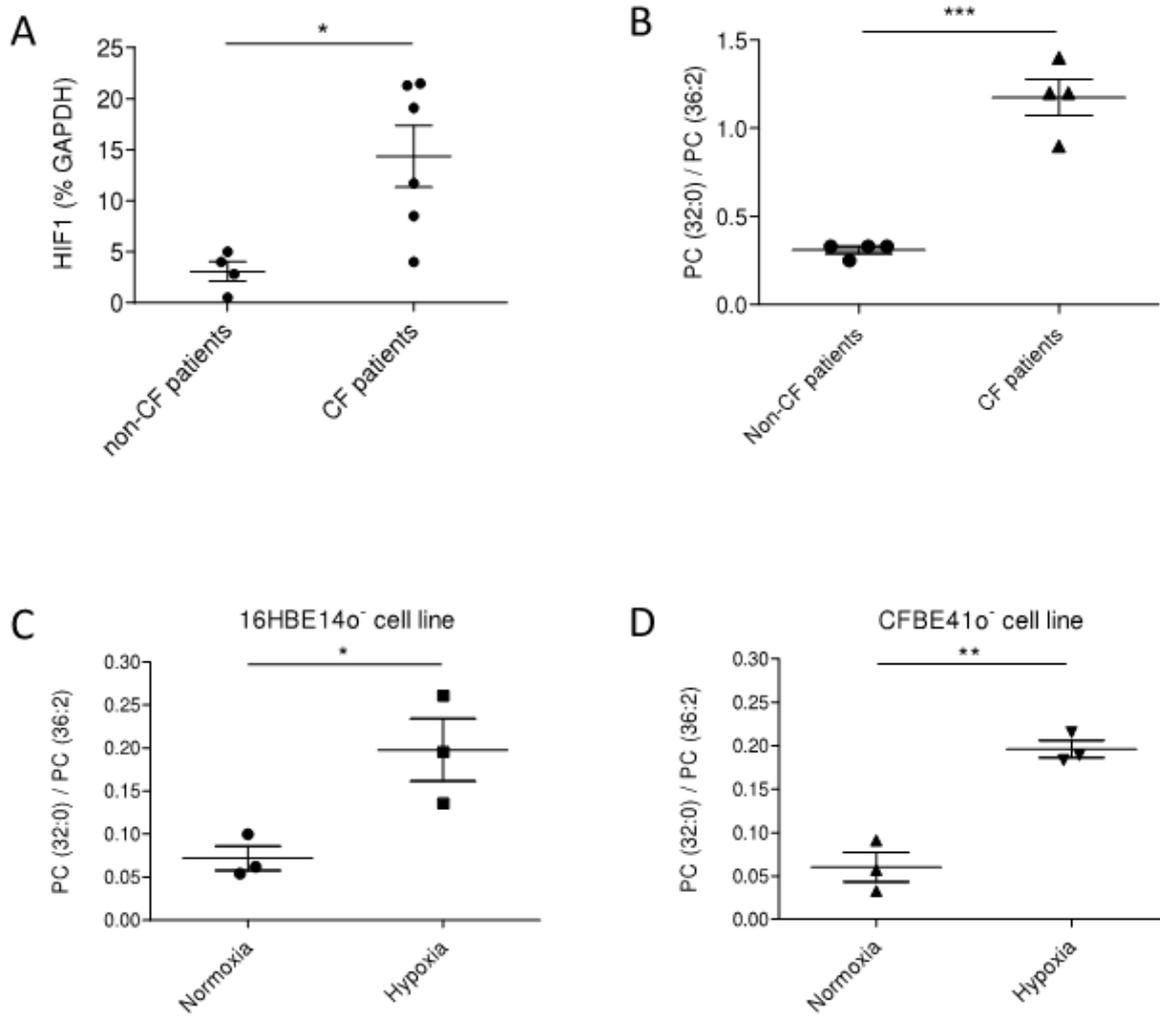


Figure 3

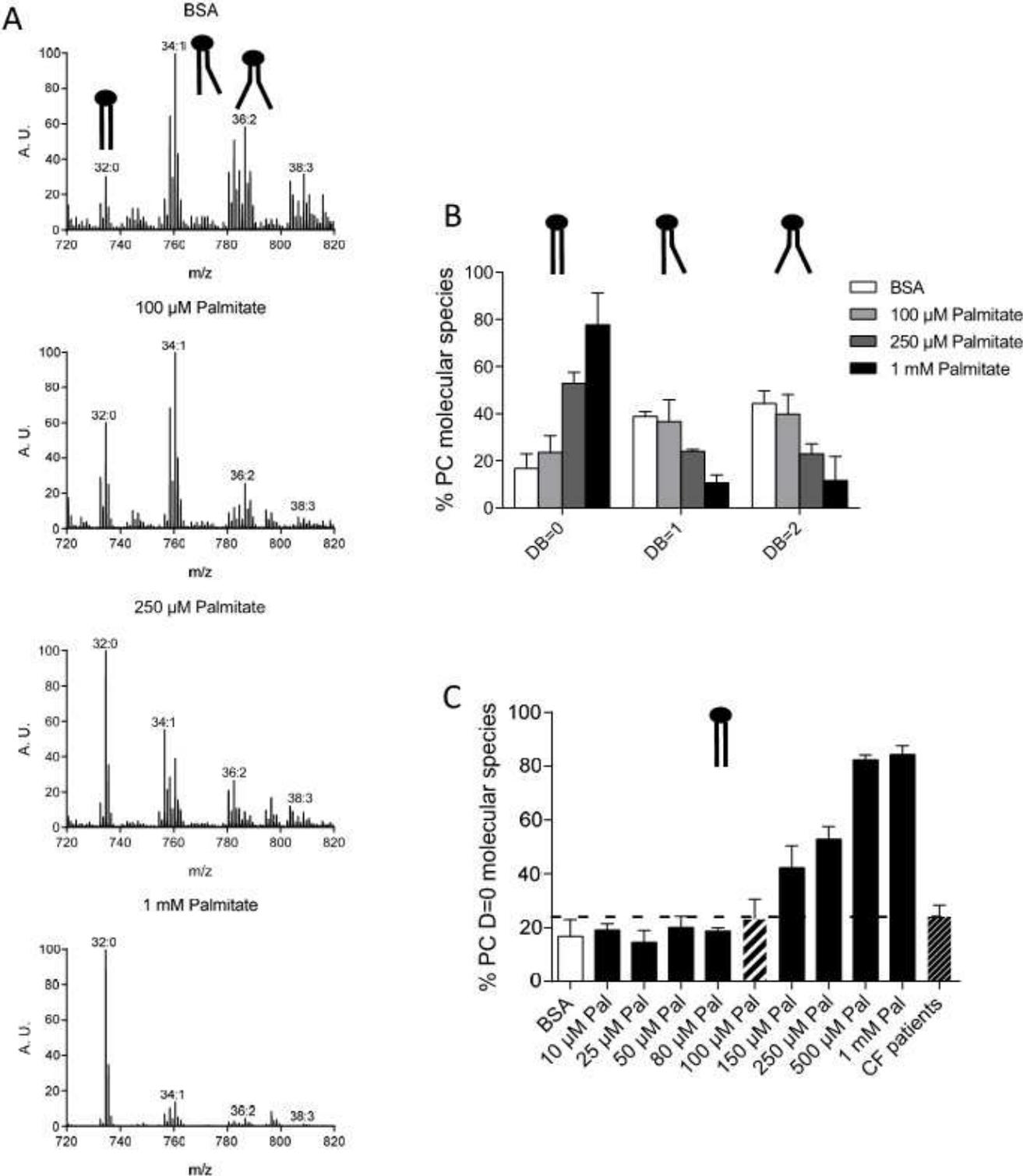


Figure 4

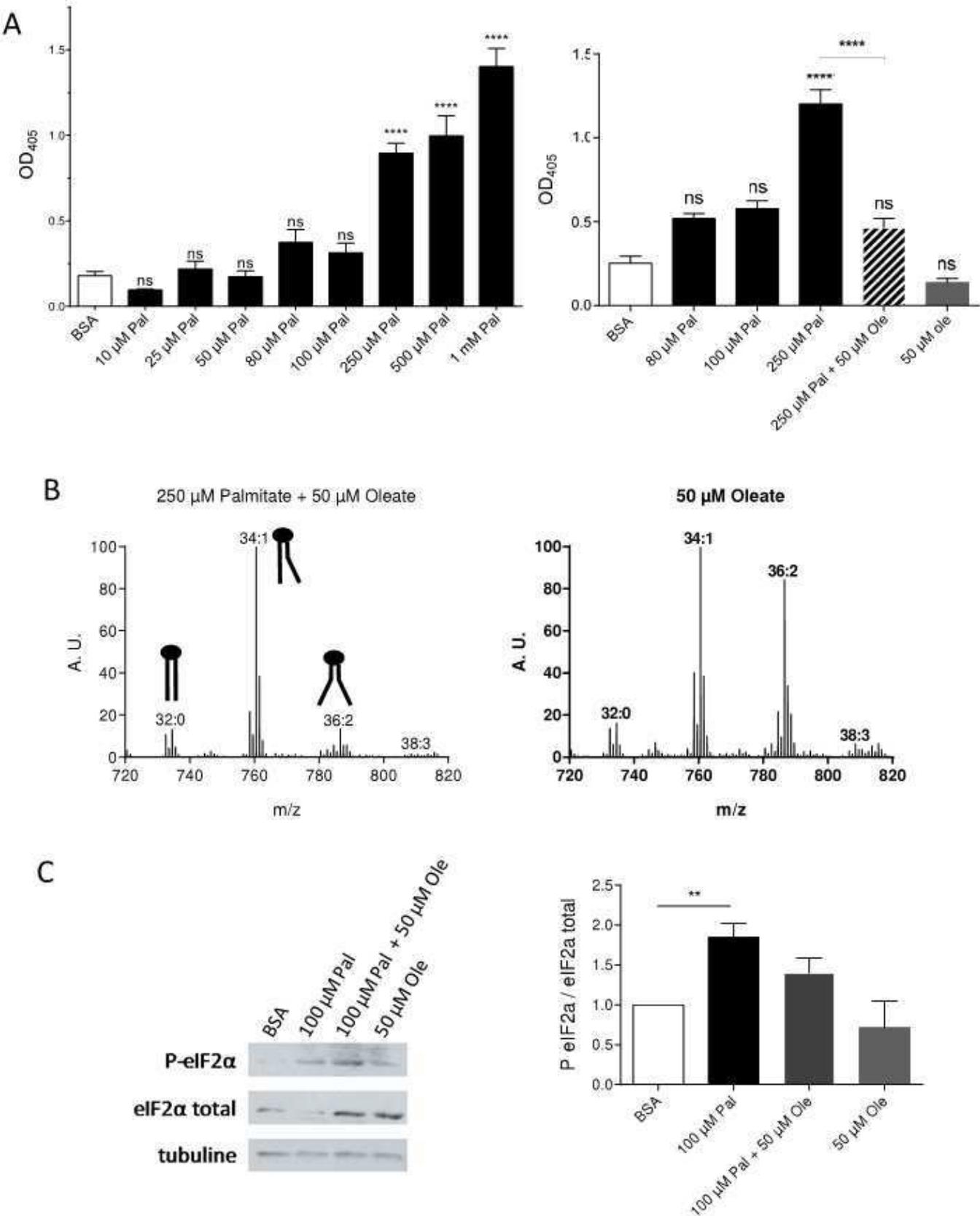
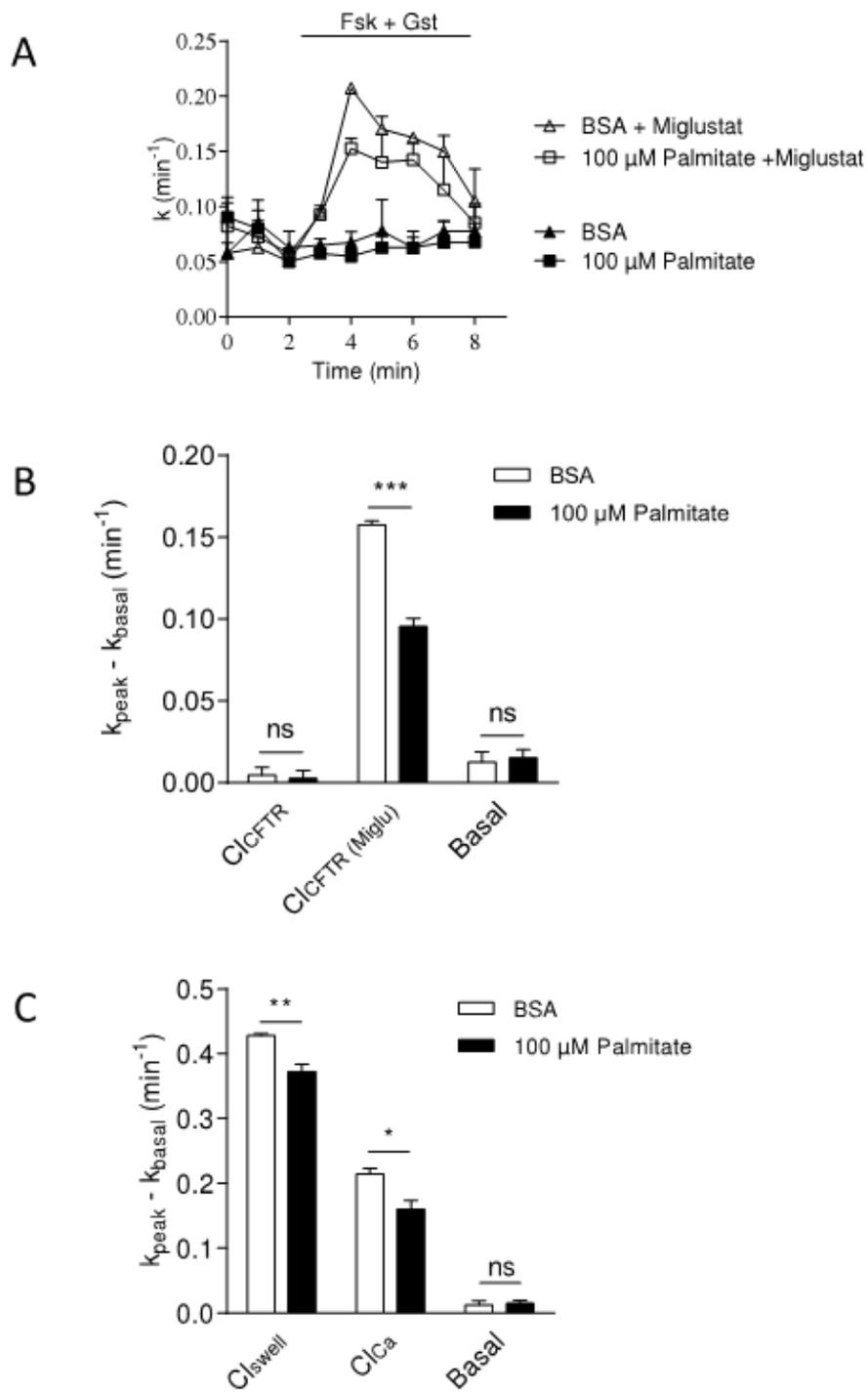


Figure 5



Supplemental table E1: PC composition of CF and non-CF cells

Results are percentage of PC means \pm SD, obtained from the mass spectra of at least three independent experiments.

PC	(30:0)	(30:1)	(32:0)	(32:1)	(34:0)	(34:1)	(34:2)	(36:1)	(36:2)	(36:3)	(38:2)	(38:3)
m/z [M+H] ⁺	706	704	734	732	762	760	758	788	786	784	814	812
Non-CF patients	0.7 \pm 1.1	1.8 \pm 1.7	8.5 \pm 0.8	2.7 \pm 2.4	4.1 \pm 1.2	23.8 \pm 8.0	15.8 \pm 7.1	8.8 \pm 3.3	15.9 \pm 2.1	8.8 \pm 3.0	2.8 \pm 0.8	6.4 \pm 2.6
CF patients	1.80 \pm 2.2	3.39 \pm 1.4	18.37 \pm 3.3	4.48 \pm 1.6	4.31 \pm 0.2	24.14 \pm 2.1	10.94 \pm 1.4	6.10 \pm 2.5	10.27 \pm 2.1	8.23 \pm 3.5	2.04 \pm 1.4	5.92 \pm 2.1
16HBE14o ⁻	0 \pm 0	0 \pm 0	3.1 \pm 0.8	0.9 \pm 1.3	1.2 \pm 1.7	13.6 \pm 1.5	24.5 \pm 2.1	11.1 \pm 1.6	38.2 \pm 3.2	4.9 \pm 0.02	0 \pm 0	2.5 \pm 0.05
CFBE41o ⁻	0 \pm 0	0 \pm 0	1.6 \pm 2.3	0.9 \pm 1.3	1.1 \pm 1.5	13.0 \pm 2.0	25.8 \pm 2.0	10.8 \pm 1.5	40.0 \pm 6.5	5.2 \pm 0.7	0 \pm 0	1.6 \pm 2.2

Supplemental table E2: PC composition of 16HBE14o⁻ and CFBE41o⁻ cells after incubation in a hypoxia chamber

Results are percentage of PC means \pm SD, obtained from the mass spectra of three independent experiments.

PC	(30:0)	(30:1)	(32:0)	(32:1)	(34:0)	(34:1)	(34:2)	(36:1)	(36:2)	(36:3)	(38:2)	(38:3)
m/z [M+H] ⁺	706	704	734	732	762	760	758	788	786	784	814	812
16HBE14o ⁻ hypoxia	1.2 \pm 1.6	2.4 \pm 0.3	4.9 \pm 1.6	2.5 \pm 0.5	3.2 \pm 0.3	18.7 \pm 2.5	22.9 \pm 2.1	9.4 \pm 2.0	25.4 \pm 3.1	5.6 \pm 1.1	0.9 \pm 1.3	3.0 \pm 1.4
CFBE41o ⁻ hypoxia	1.3 \pm 1.8	2.8 \pm 0.4	4.9 \pm 0.6	2.6 \pm 0.04	3.4 \pm 0.8	17.3 \pm 0.3	22.1 \pm 3.3	10.2 \pm 1.4	26.1 \pm 2.5	6.1 \pm 1.3	0.7 \pm 1.0	2.5 \pm 0.6

Supplemental table E3: PC composition of CFBE410⁻ cells after incubation with different palmitate concentrations

Results are percentage of PC means \pm SD, obtained from the mass spectra of at least three independent experiments.

PC	(30:0)	(30:1)	(32:0)	(32:1)	(34:0)	(34:1)	(34:2)	(36:1)	(36:2)	(36:3)	(38:2)	(38:3)
m/z [M+H] ⁺	706	704	734	732	762	760	758	788	786	784	814	812
CFBE410 ⁻ BSA	1.3 \pm 1.9	1.0 \pm 1.4	6.1 \pm 1.5	3.9 \pm 0.6	3.7 \pm 0.4	26.3 \pm 4.1	16.6 \pm 2.2	7.8 \pm 0.02	15.2 \pm 2.2	9.7 \pm 3.2	2.0 \pm 0.1	4.2 \pm 0.7
CFBE410 ⁻ 10 μ M Pal	1.0 \pm 1.4	0 \pm 0	13.5 \pm 4.1	4.9 \pm 0.3	4.6 \pm 0.5	29.4 \pm 2.1	15.1 \pm 1.0	6.9 \pm 0.1	11.7 \pm 2.7	7.7 \pm 1.6	0.9 \pm 1.3	2.9 \pm 0.2
CFBE410 ⁻ 25 μ M Pal	0.8 \pm 1.2	0 \pm 0	10.5 \pm 0.4	5.8 \pm 0.1	4.7 \pm 0.5	33.6 \pm 1.2	18.9 \pm 1.4	5.8 \pm 0.1	10.3 \pm 0.5	6.4 \pm 0.4	0 \pm 0	2.2 \pm 0.1
CFBE410 ⁻ 50 μ M Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	13.6 \pm 1.9	7.0 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	30.8 \pm 2.2	20.5 \pm 1.2	6.3 \pm 0.1	10.4 \pm 0.5	4.4 \pm 0.8	0 \pm 0	2.3 \pm 0.2
CFBE410 ⁻ 80 μ M Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	14.6 \pm 0.9	8.2 \pm 0.03	4.8 \pm 0.2	33.0 \pm 0.4	20.3 \pm 0.6	5.3 \pm 0.3	8.6 \pm 0.5	4.3 \pm 0.6	0 \pm 0	0 \pm 0
CFBE410 ⁻ 100 μ M Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	15.8 \pm 2.6	8.7 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4	31.1 \pm 0.9	21.7 \pm 0.7	4.9 \pm 0.02	8.6 \pm 1.0	4.0 \pm 0.3	0 \pm 0	0.6 \pm 1.0
CFBE410 ⁻ 150 μ M Pal	1.0 \pm 1.3	0 \pm 0	37.2 \pm 9.6	5.0 \pm 2.2	4.1 \pm 0.1	16.7 \pm 4.1	13.4 \pm 2.0	2.8 \pm 0.6	4.5 \pm 0.6	13.0 \pm 1.3	0 \pm 0	2.4 \pm 0.1
CFBE410 ⁻ 250 μ M Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	52.4 \pm 1.3	7.0 \pm 0.1	3.5 \pm 0.4	16.9 \pm 1.0	13.7 \pm 0.5	0 \pm 0	3.5 \pm 0.1	3.0 \pm 0.04	0 \pm 0	0 \pm 0
CFBE410 ⁻ 500 μ M Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	82.4 \pm 1.8	0 \pm 0	0 \pm 0	10.0 \pm 1.0	7.6 \pm 0.8	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
CFBE410 ⁻ 1 mM Pal	0 \pm 0	0 \pm 0	77.7 \pm 13.4	0.8 \pm 1.6	0 \pm 0	9.9 \pm 2.1	7.8 \pm 2.9	0 \pm 0	0 \pm 0	3.8 \pm 7.5	0 \pm 0	0 \pm 0

Résultats complémentaires de la deuxième publication

La comparaison des profils de PC des individus non-CF fumeurs et non-fumeurs renforce l'hypothèse de l'hypoxie comme facteur induisant l'augmentation du taux de saturation des PC chez les patients CF.

Dans cette deuxième publication, nous avons montré que le taux de saturation des PC des cellules de patients CF était plus élevé que celui des patients non-CF. Pour expliquer cette différence de profil lipidique entre les deux populations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de palmitate dans les PC viendrait d'une perte de fonction des enzymes désaturant les AGS en AGI suite à une hypoxie. Cette hypothèse a été renforcée par i) la mesure du taux d'expression de *HIF1 α* , plus élevé chez les patients CF, ii) la culture en chambre hypoxique augmentant le taux de saturation des PC, mais aussi par iii) une observation que nous avons pu faire sur les profils de PC des individus non-CF.

En effet, parmi les individus non-CF que nous avons étudiés, deux populations se distinguaient : les fumeurs et les non-fumeurs. Nous avons comparé les profils de PC obtenus à partir des cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées de patients non-CF fumeurs et non-fumeurs, par MS. Les taux de saturation, correspondant au rapport PC(32:0)/PC(36:2) et calculés à partir des spectres obtenus, sont présentés dans la Figure 39.

De façon surprenante, parmi les individus non-CF, les fumeurs et les non-fumeurs ne présentent pas le même profil de PC reflété par le taux de saturation des PC. En effet, les fumeurs présentent un taux de saturation presque dix fois plus élevé que celui des patients non-fumeurs, indiquant une accumulation de palmitate dix fois plus élevée chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Les fumeurs voient leurs bronches obstruées par les dépôts de goudron apporté par la fumée de cigarette (Graham *et al.*, 1963). Cette obstruction crée une hypoxie, qui pourrait, tout comme le ferait le mucus épais et visqueux dans les bronches de patients CF, désactiver les enzymes oxygène-dépendantes désaturant les AGS et donc résulter en l'accumulation de palmitate dans les PC.

Cependant, il est important de noter que les taux de saturation observés chez les patients non-CF fumeurs sont également bien au-delà (environ 2,5 fois supérieurs) de ceux observés chez les patients CF. En effet, le phénotype des patients CF, d'un point de vue du profil de PC, est intermédiaire entre les profils de patients non-CF non-fumeurs et non-CF fumeurs. Pour expliquer cet état intermédiaire nous avons émis l'hypothèse selon laquelle il y aurait des degrés d'hypoxie différents chez ces trois populations. En effet, l'hypoxie est peu ou pas présente chez les patients non-CF non-fumeurs. Chez les patients non-CF fumeurs, elle est causée par l'accumulation de goudron dans les bronches, alors que chez les patients CF, elle résulte de l'accumulation de mucus. Si le goudron ne peut être évacué des bronches des patients non-CF fumeurs, les bronches des patients CF sont quotidiennement désencombrées de leur mucus par des séances de kinésithérapie respiratoire. L'hypoxie serait moins importante chez les patients CF comparés aux patients non-CF fumeurs, ce qui pourrait expliquer les taux de saturation plus bas chez les patients CF.

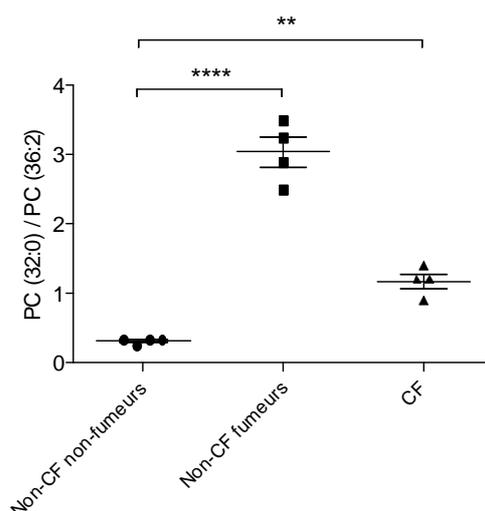


Figure 39 : Taux de saturation des PC des cellules de patients CF et non-CF

Les rapports PC(32:0)/PC(36:2) ont été calculés à partir des spectres de masse obtenus pour les cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées de poumons provenant de patients CF, et de patients non-CF fumeurs et non-fumeurs. **** : $p < 0,0001$; ** : $p < 0,01$.

L'augmentation du taux de saturation des PC altère également l'activité calcique des cellules CF.

Dans cette deuxième publication, nous avons également montré que l'augmentation du taux de saturation des PC des CFBE410⁻ par l'ajout de palmitate exogène altérait l'activité du F508del-CFTR corrigé, mais aussi de deux autres canaux chlorure présents à la membrane

plasmique : Cl_{swell} et Cl_{Ca} . Ces résultats suggèrent que les PC saturés affectent de façon générale l'activité des protéines membranaires, et dans le cas qui nous intéresse, des canaux ioniques.

La mucoviscidose est également associée à une dérégulation de l'homéostasie calcique. En effet, il a été montré au sein de notre équipe que la déplétion des stocks calciques du RE (induite par l'inhibition des pompes SERCA) ainsi que la mobilisation calcique globale (induite par l'ATP, voir chapitre Matériel et Méthodes, VI- C- Mesure de l'activité calcique intracellulaire) étaient plus élevées dans les cellules CF comparées aux non-CF (Antigny *et al.*, 2009; Antigny *et al.*, 2008). Néanmoins, la correction du trafic de F508del-CFTR puis l'utilisation de l'inhibiteur 172 du CFTR ont permis de montrer que la simple présence de F508del-CFTR à la membrane plasmique permettait de restaurer une mobilisation calcique normale (Antigny *et al.*, 2008). Dans ce contexte et dans le but de caractériser au mieux notre modèle CFBE410⁻ amélioré en termes de composition lipidique, nous avons étudié, dans une expérience préliminaire, les effets de l'augmentation du taux de saturation des PC sur l'activité calcique globale (Figure 40) et la déplétion des stocks calciques du RE (Figure 41).

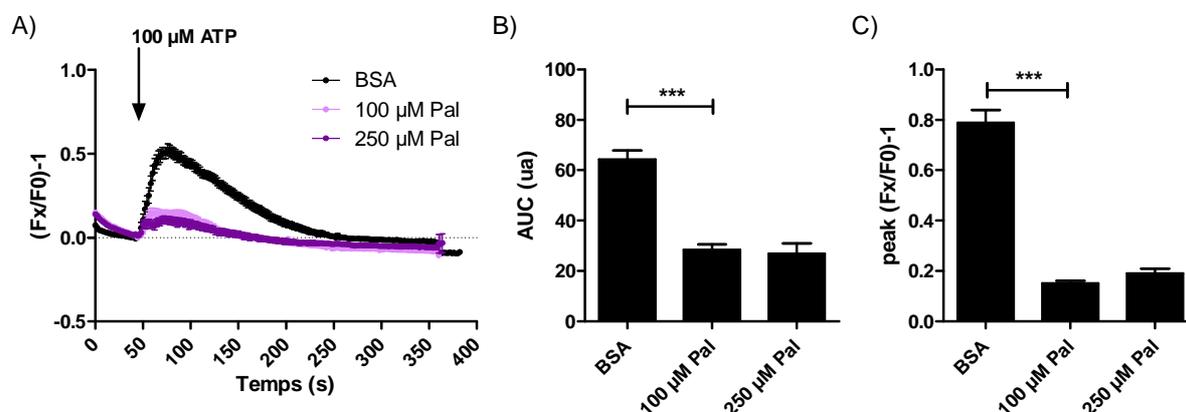


Figure 40 : Mobilisation calcique globale

Les CFBE410⁻ ont été pré-incubées avec ou sans palmitate (BSA) pendant 16 h. L'influx calcique global a été induit par 100 µM d'ATP puis visualisé grâce à la sonde Fluo-4-AM par microscopie à fluorescence. A) Tracés représentant l'évolution de la fluorescence de la sonde Fluo-4-AM en fonction du temps. B) Histogramme représentant les aires sous courbes calculées à partir des tracés précédents. C) Histogramme représentant l'intensité des pics obtenue à partir des tracés. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM d'au moins 71 cellules, obtenues sur deux expériences indépendantes. ua : unité arbitraire. *** : $p < 0,001$. ** : $p < 0,01$.

La mobilisation calcique globale, induite par l'ATP, a été mesurée dans les CFBE410⁻ après leur incubation avec du palmitate (voir chapitre Matériel et Méthodes, I- C- 3- Incubation des cellules avec des acides gras). Les tracés représentant les variations de fluorescence de la sonde Fluo-4-AM (Figure 40A) ont permis de calculer les pics de

fluorescence reflétant principalement l'influx de calcium dans la cellule par les canaux calciques localisés à la membrane plasmique (Figure 40C), et les aires sous courbes reflétant l'ensemble de la mobilisation de calcium (provenant de l'extérieur de la cellule et des réserves stockées dans le RE, Figure 40B).

L'intensité des pics de fluorescence diminue d'environ 5 fois dès l'ajout de 100 μM de palmitate dans les CFBE410⁻, traduisant une forte altération de l'influx calcique provenant de l'extérieur de la cellule par l'augmentation du taux de saturation des PC dans les CFBE410⁻ (Figure 40C). Les aires sous courbe (Figure 40B) montrent que l'ajout du palmitate diminue de moitié l'influx calcique global dans les CFBE410⁻. Cette baisse de l'influx calcique global dans les CFBE410⁻ après incubation avec du palmitate semble essentiellement attribuée à l'altération de l'entrée de calcium extracellulaire. Ces résultats montrent que l'activité des canaux calciques localisés à la membrane plasmique, tout comme les canaux chlorure, est altérée par l'augmentation du taux de saturation des PC.

Dans une autre expérience préliminaire, nous nous sommes intéressés à l'influence du taux de saturation des PC des CFBE410⁻ sur la déplétion des stocks calciques du RE, induite dans un milieu ne contenant pas de calcium par la thapsigargine qui inhibe les pompes SERCA. Comme décrit précédemment, les tracés représentant les variations de fluorescence de la sonde Fluo-4-AM (Figure 41A) ont permis de calculer les aires sous courbes reflétant les réserves calciques du RE (figure 41B) et les pics de fluorescence reflétant l'intensité maximale du flux calcique intracellulaire (Figure 41C).

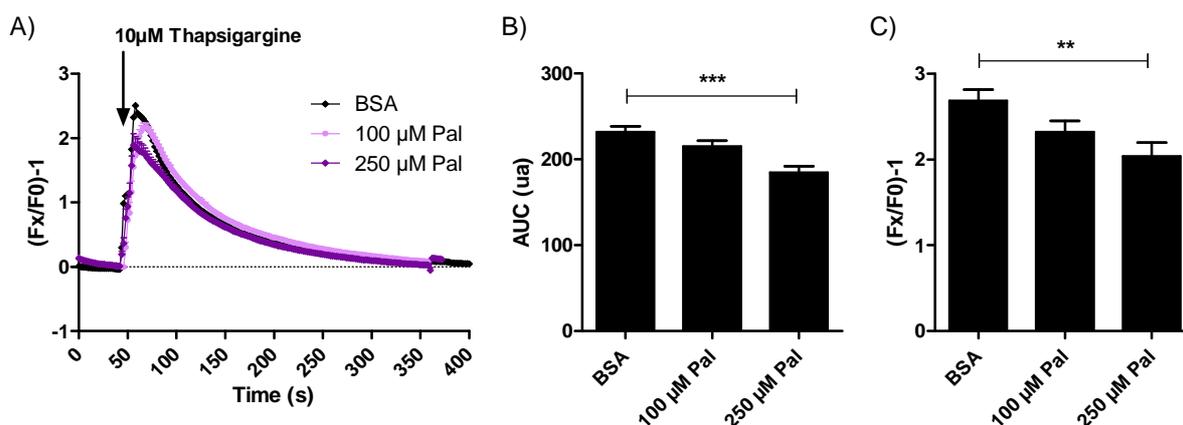


Figure 41 : Déplétion des stocks calciques après incubation avec du palmitate

Les CFBE410⁻ ont été pré-incubées avec ou sans palmitate (BSA) pendant 16 h. L'inhibition des pompes SERCA a été induite par 10 μM de thapsigargine et l'influx calcique a été visualisé grâce à la sonde Fluo-4-AM par microscopie à fluorescence. A) Tracés représentant l'évolution de la fluorescence de la sonde Fluo-4-AM en fonction du temps. Histogrammes représentant B) les aires sous courbes et C) l'intensité des pics, calculés à partir des tracés. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM obtenus avec au moins 60 cellules. ua : unité arbitraire. *** : $p < 0,001$. ** : $p < 0,01$.

Les intensités des pics de calcium (Figure 41C) et les réserves calciques du RE (Figure 41B) diminuent peu à peu avec l'augmentation de la concentration en palmitate utilisée. Ces résultats montrent que l'augmentation du taux de saturation des PC des CFBE41o⁻ altère la déplétion des stocks calciques du RE. Il semblerait que l'augmentation du taux de saturation des PC entraîne une diminution du stock calcique mobilisable dans les CFBE41o⁻.

Cette diminution des stocks calciques du RE en présence d'AGS a également été montrée dans les cellules β (Gwiazda *et al.*, 2009) et les cellules hépatiques (Wei *et al.*, 2009) mais les mécanismes responsables de cette réduction des stocks ne sont pas connus. Néanmoins, nous pouvons formuler trois hypothèses : ces réserves calciques seraient diminuées i) par une altération de l'influx de calcium dans la lumière du RE, la pompe SERCA étant inhibée par les AGS (Li *et al.*, 2004), ii) par une fuite du calcium luminal vers le cytoplasme de la cellule, ce qui pourrait rendre compte de l'induction de l'apoptose, iii) par une diminution de la quantité de calcium libre dans le RE, celui-ci pouvant être complexé à des protéines luminales, telles que les chaperonnes, dont il est un cofacteur connu.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les AGS altèrent l'ensemble de la voie de sécrétion. En modulant la fluidité des membranes (Deguil *et al.*, 2011), ils perturbent le trafic des protéines à la sortie du RE (Preston *et al.*, 2009), entraînant une surcharge protéique dans ce compartiment et le déclenchement de l'UPR en réponse à ce stress (Pineau *et al.*, 2009). Cette réponse, si elle est maintenue peut conduire à l'apoptose des cellules (Pineau *et al.*, 2009). Les AGS perturbent également le trafic des protéines à la sortie de l'appareil de Golgi (Pineau *et al.*, 2008). Les AGS entrent dans la composition d'espèces lipidiques plus complexes que sont les céramides/sphingolipides et les PL saturés. L'attribution des rôles de ces deux types de lipides dans les perturbations de la voie de sécrétion, ainsi que l'étude des mécanismes moléculaires de la formation des vésicules en cas d'accumulation d'AGS chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été les premiers objectifs de ces trois années de thèse.

Ainsi, dans un premier article, nous avons pu montrer que les céramides/sphingolipides interviennent dans les étapes précoces de la voie de sécrétion mais aussi au niveau transcriptionnel (Payet *et al.*, 2013b). En effet, ces espèces sont impliquées dans la régulation négative des gènes de transporteurs membranaires mais aussi dans l'induction de l'UPR au niveau du RE. Nous avons également montré que les PL saturés intervenaient plus tardivement dans la voie de sécrétion et notamment dans la formation des vésicules au niveau du TGN (Payet *et al.*, 2013b). Ces résultats sont résumés dans la Figure 42.

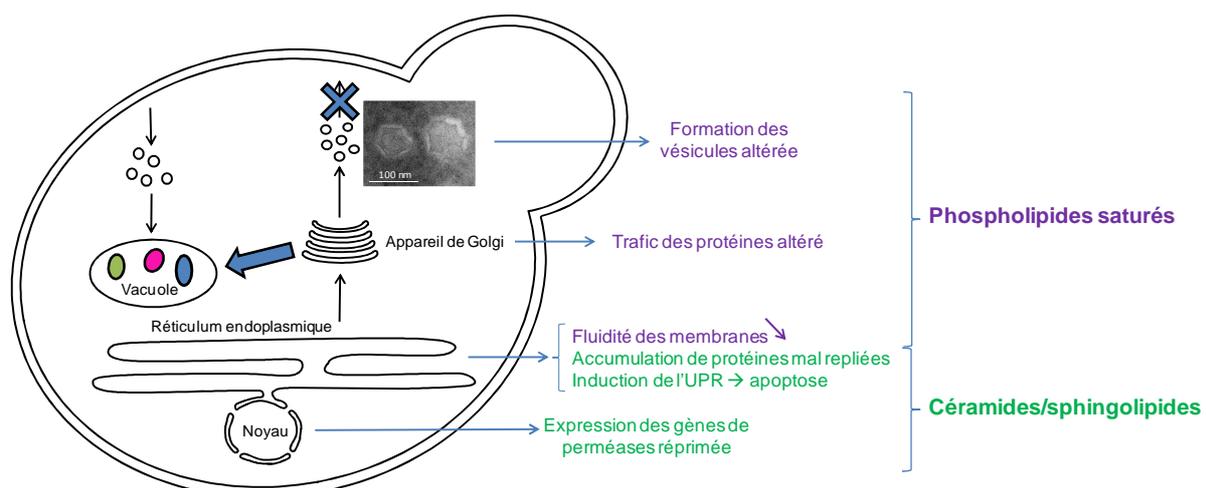


Figure 42 : Schéma récapitulatif des effets des AGS sur la voie de sécrétion

Les acides gras saturés (AGS) ont des impacts tout au long de la voie de sécrétion. Les céramides/sphingolipides affectent la voie de sécrétion précoce par la répression de l'expression des gènes de perméases et le déclenchement de l'UPR (Unfolded Protein Response). Les phospholipides saturés, quant à eux, interviennent plus tard dans la voie de sécrétion en altérant la formation des vésicules de sécrétion et donc le trafic des perméases à la membrane plasmique. Celles-ci sont dirigées vers la vacuole pour dégradation.

Les vésicules de sécrétion sont beaucoup moins nombreuses lorsque des AGS s'accumulent, et adoptent une forme polygonale, contrairement à une structure normalement sphérique. Grâce à notre collaboration avec le Dr Joelle Bigay de l'Université de Sophia Antipolis, nous avons pu préciser les mécanismes moléculaires responsables de l'altération de la formation des vésicules. En effet, il était connu que les protéines de la famille ArfGAP1 devaient être recrutées afin de désactiver la protéine Arf, et induire la dépolymérisation du manteau COP I pour finaliser le processus de vésiculation (Tanigawa *et al.*, 1993). La fixation d'ArfGAP1 sur la vésicule en formation se fait grâce à un motif ALPS (Bigay *et al.*, 2005; Mesmin *et al.*, 2007). Ce motif se structure en une hélice α amphiphile qui, pour s'ancrer dans la bicouche, nécessite un écartement suffisant des têtes polaires des PL (« loose lipid packing »). Ceci peut être obtenu, soit par augmentation de la courbure, soit par augmentation du taux de lipides coniques (e.g. PL contenant des AGMI *cis*) (Bigay *et al.*, 2003). En accord avec ces données, nous avons pu montrer dans notre étude que les liposomes formés *in vitro* à partir de PC saturées n'étaient pas capables de recruter Gcs1p, l'homologue levurien d'ArfGAP1, et ceci malgré une courbure importante. Ce mécanisme altérerait le processus de vésiculation *in vivo*, ce qui contribuerait à la réduction du nombre de vésicules formées en condition d'accumulation d'AGS.

Ces résultats apportent une vue d'ensemble des phénomènes associés à la lipotoxicité liée aux AGS dans l'étiologie du diabète de type 2. Si l'accumulation d'AGS avait été corrélée avec la mort ou le dysfonctionnement des cellules β par un trafic des protéines réduit entre le RE et l'appareil de Golgi (Preston *et al.*, 2009), l'induction de l'UPR puis de l'apoptose (Diakogiannaki *et al.*, 2008; Pineau and Ferreira, 2010), et l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Hagman *et al.*, 2005), les espèces lipidiques mises en jeu dans ces différents processus n'avaient pas été clairement identifiées. Il avait été montré, aussi bien chez la levure que dans des cellules de mammifères, que des taux élevés de céramides pouvaient, en plus de leur propriétés proapoptotiques, induire la mort des cellules par une régulation négative des transporteurs de nutriments (Skrzypek *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001; Guenther *et al.*, 2008). Dans notre étude, nous avons montré que Hxt4p, l'homologue des transporteurs humains de glucose GLUT, faisait partie des perméases régulées négativement par les taux élevés de céramides en accumulation d'AGS. Nous avons également montré que les PL saturés altéraient la formation des vésicules et donc le trafic des perméases jusqu'à la membrane plasmique (Payet *et al.*, 2013b). Ceci suggère que, dans les cellules β pancréatiques, les PL saturés en diminuant la quantité de vésicules de sécrétion formées, et les

céramides en réduisant le taux d'expression des transporteurs de glucose (et par conséquent la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Anderson and Long, 1947)), pourraient agir de façon synergique sur l'installation de l'hyperglycémie dans les diabètes de type 2, en conduisant à l'épuisement progressif de ces cellules.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude par la purification et la caractérisation des vésicules de forme polygonale formées en condition d'accumulation d'AGS. En effet, si l'analyse effectuée sur les lipides totaux a montré une augmentation du taux de saturation des PL, le contenu phospholipidique spécifique de ces vésicules n'a pas encore pu être déterminé. Sachant que l'accumulation d'AGS ne bloque pas le trafic de toutes les protéines intégrées de la membrane plasmique (nous avons cité l'exemple de Pma1p (Pineau *et al.*, 2008) chez *Saccharomyces cerevisiae* ; chapitre Introduction, III- C- Trafic des protéines membranaires), il serait également intéressant de déterminer le type de protéines cargos transportées par ces vésicules. Cependant, ce travail nécessite d'identifier préalablement des marqueurs protéiques qui leur soit spécifiques afin de pouvoir les « immunopurifier » et les analyser. Fur4p et Pma1p, dont le trafic n'est pas altéré de la même façon par l'accumulation d'AGS, figurent parmi les marqueurs potentiels que nous pourrions tester. Il serait également possible, une fois les protéines marqueurs identifiées, de déterminer la nature de ces vésicules, à savoir s'il s'agit de vésicules de type HDSV ou LDSV (décrites dans le chapitre Introduction, II- B- 3- Transport vésiculaire vers la membrane plasmique). Sachant que Pma1p est une protéine cargo des vésicules de type LDSV, il est possible que Fur4p soit une protéine cargo des vésicules HDSV ou qu'elle soit transportée par une sous-population de LDSV, différente de celle acheminant Pma1p vers la membrane plasmique.

Le diabète de type 2 est une maladie qui se manifeste tardivement. Avec l'allongement de l'espérance de vie des individus souffrant de la mucoviscidose, une autre forme de diabète s'est développée. Il s'agit du diabète lié à la mucoviscidose ou CFRD. La mucoviscidose, ou du moins celle causée par les mutations de classe II telles que *F508del-CFTR*, résulte de l'altération du trafic de la protéine mutante. Nous nous sommes demandés quel pouvait être le lien entre l'altération de la fonctionnalité de la voie de sécrétion et le développement de diabète dans le contexte de la mucoviscidose. Suite à l'étude menée chez la levure, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le contenu lipidique membranaire pourrait corrélérer ces deux faits. C'est pourquoi, dans un second article, et pour la toute première fois, nous avons

caractérisé le contenu phospholipidique des membranes des cellules épithéliales bronchiques fraîchement dissociées à partir de prélèvements de poumons de patients homozygotes pour la mutation *F508del-CFTR* (Payet *et al.*, 2013a).

Lorsque nous avons comparé le contenu phospholipidique des cellules épithéliales bronchiques provenant d'échantillons de poumons de patients CF à ceux des patients non-CF, contrairement à ce que nous avons pu lire dans la littérature, l'effet majoritaire ne portait pas sur des variations des taux de PL contenant des AGPI, mais plutôt sur une augmentation significative de l'espèce de PC(32:0), contenant deux palmitates, chez les patients CF. Nous avons également montré que cette accumulation de palmitate dans les PC serait liée à une hypoxie, qui est généralement observée chez ces patients, du fait de l'obstruction des bronches par un mucus épais, visqueux et difficile à éliminer. Afin d'étudier les conséquences cellulaires de cette accumulation de PC(32:0) dans les membranes, nous avons décidé de travailler sur la lignée cellulaire correspondante CFBE41o⁻. Cependant, cette lignée ne subissant pas les mêmes contraintes physiques que les bronches dans le corps des patients, ne présentait pas le même profil phospholipidique que les cellules fraîchement dissociées. Les conditions hypoxiques étant trop difficiles à mettre en œuvre de façon routinière, nous avons opté pour l'apport exogène de palmitate afin de mimer le profil phospholipidique des patients CF, ce que nous avons obtenu avec l'apport de 100 μ M de palmitate (Payet *et al.*, 2013a).

Grâce à ces nouvelles conditions de culture des CFBE41o⁻, nous permettant de mimer le profil lipidique des patients CF, nous avons pu montrer que les cellules épithéliales de bronche CF n'étaient pas apoptotiques mais en situation de stress du RE (Payet *et al.*, 2013a). Ces résultats sont intéressants puisque l'induction de l'UPR dans les cellules CF est sujette à controverse. En effet, les avis sont contradictoires sur la question. Certaines équipes ont montré une induction atypique de l'UPR dans la mucoviscidose, dans laquelle la voie PERK ne serait pas induite (Nanua *et al.*, 2006; Blohmke *et al.*, 2012). D'autres ont montré l'absence totale de stress du RE dans les cellules CF (Hybiske *et al.*, 2007). Cependant, ces études ont été effectuées sur différents types cellulaires. Nanua et ses collaborateurs (2006) ont travaillé à partir de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques, collectées après une transplantation. Hybiske *et al.* (2007), quant à eux, ont utilisé des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques mais également deux lignées cellulaires : les CF15 (cellules épithéliales nasales, homozygotes pour *F508del-CFTR*) et les HeLa (dérivées de cellules cancéreuses du col de l'utérus, n'exprimant pas *CFTR*) transfectées avec *CFTR* ou *F508del-*

CFTR. Enfin, Blomke et ses collaborateurs (2012) ont manipulé la lignée cellulaire IB3-1 (cellules épithéliales bronchiques, *F508del-CFTR/W1282X-CFTR*). Néanmoins, ces trois études possèdent un point commun : tous ces types cellulaires ont été cultivés dans des conditions de normoxie, qui n'engendrent pas, dans notre modèle, d'accumulation d'AGS dans les PL. Les différences dans l'intensité de l'UPR observées dans ces études sont probablement liées à des variations des taux d'expression de *F508del-CFTR*, qui est un substrat de l'ERAD, en fonction du modèle cellulaire considéré. A partir des résultats obtenus dans notre étude, nous proposons un autre mode d'induction de l'UPR dans la mucoviscidose, qui serait relié, non pas à une accumulation d'une forme mal repliée du *CFTR* dans le RE, mais à une perturbation indirecte de l'homéostasie lipidique cellulaire, résultant de l'hypoxie.

Notre étude apporte de nouveaux éléments de réflexion concernant le développement du CFRD. En effet, il a été montré que l'exposition chronique des cellules β au palmitate induisait un stress du RE (Cunha *et al.*, 2008; Diakogiannaki *et al.*, 2008) pouvant conduire à la mort de ces cellules. Ce processus cellulaire contribue à la diminution de la masse de cellules β , conduisant à une sécrétion d'insuline insuffisante et au développement du diabète de type 2. Dans les cellules β mucoviscidosiques, il a été montré que le fonctionnement anormal du *CFTR* induisait l'obstruction des canaux pancréatiques, à cause de la trop grande viscosité du mucus, et de la réduction du pourcentage de cellules β (Iannucci *et al.*, 1984; Abdul-Karim *et al.*, 1986; Soejima and Landing, 1986; Kelly and Moran, 2013). Nous pouvons légitimement penser qu'une baisse de la capacité respiratoire chez les patients CF devrait provoquer, au-delà des cellules épithéliales bronchiques, une accumulation d'AGS dans d'autres types cellulaires, dont les cellules β pancréatiques. Ceci pourrait constituer un facteur déterminant du dysfonctionnement des cellules β dans le CFRD. Dans ce contexte, il serait pertinent de caractériser le contenu phospholipidique des cellules β de patients CF afin de confirmer notre hypothèse. Cependant, si l'obtention et l'analyse de cellules épithéliales bronchiques sont rendues possibles par la fréquence relative des transplantations pulmonaires chez les patients CF, des prélèvements pancréatiques ne seront probablement réalisables que *post-mortem*.

La culture des CFBE41o⁻ en présence de palmitate nous a également permis de montrer que l'augmentation du taux de saturation des PC altérait la correction du trafic de *F508del-CFTR* par miglustat (Payet *et al.*, 2013a). Cette molécule (Leonard *et al.*, 2012), tout comme le 4-PBA (Rubenstein and Zeitlin, 1998), le CPX (McCarty *et al.*, 2002) ou le VX-

809 (Clancy *et al.*, 2012) a été testée en essai clinique mais n'a pas généré d'améliorations significatives chez les patients traités. Selon notre hypothèse, les divergences observées pourraient être la conséquence d'une sous-estimation des impacts des perturbations de l'homéostasie lipidique dans les lignées cellulaires *in vitro*. Trois hypothèses non exclusives, illustrées dans la Figure 43, peuvent être émises pour expliquer les effets de l'accumulation des AGS sur la diminution de l'activité du F508del-CFTR corrigé par miglustat : i) une altération de la correction du trafic, ii) une diminution de la stabilité de la protéine F508del-CFTR corrigée à la membrane plasmique, iii) ou une baisse dans la fonctionnalité du canal corrigé.

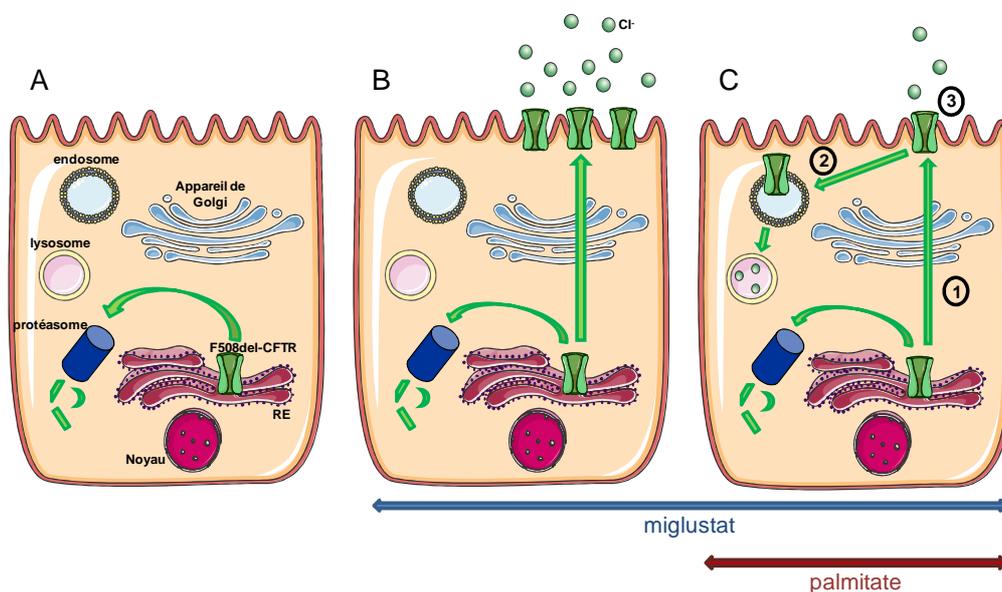


Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets du palmitate sur la voie de sécrétion de F508del-CFTR corrigé
 A) Dans la cellule mucoviscidose, le F508del-CFTR ne passe pas contrôle qualité du réticulum endoplasmique (RE) et est envoyé au protéasome pour dégradation. B) Le miglustat peut restaurer le trafic à la membrane plasmique du F508del-CFTR et donc la sécrétion d'ions chlorure (Cl⁻). En présence de palmitate, l'activité du F508del-CFTR corrigé par le miglustat est altérée. Trois hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette baisse d'activité : 1) le palmitate aurait un impact sur le trafic de F508del-CFTR, il y en aurait donc moins à la membrane plasmique, 2) le palmitate jouerait sur la stabilité de la protéine à la membrane plasmique, cette dernière serait donc plus vite internalisée, 3) le palmitate affecterait directement l'activité de la protéine en modulant sa conformation à la membrane plasmique.

Afin d'aborder ces différents points plus avant, la lignée cellulaire que nous utilisons actuellement présente des limitations. En effet, il serait préférable d'utiliser un modèle cellulaire dans lequel le F508del-CFTR serait surexprimé, de sorte à pouvoir le détecter plus aisément et analyser de façon plus fine sa localisation cellulaire et sa fonctionnalité par des techniques de biochimie et de biologie cellulaire (ubiquitination de surface, pulse chase, immunomarquage...). Cependant, il faudra considérer dans ce cas, que ces modèles de

surexpression nous éloignerons des conditions physiologiques retrouvées chez les patients CF.

Si nos hypothèses sont exactes, diminuer les effets des PL saturés sur l'activité du F508del-CFTR corrigé pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique afin d'améliorer le traitement des patients CF par les correcteurs pharmacologiques existants. Par exemple, il a déjà été montré que l'oléate pouvait corriger les effets des AGS sur la voie de sécrétion dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Pineau *et al.*, 2008; Pineau *et al.*, 2009) et dans les cellules β (Dhayal and Morgan, 2011). Forts de ces observations, nous avons donc envisagé qu'un co-traitement composé d'un correcteur et d'une source d'AGI pourrait constituer une solution efficace pour optimiser les traitements actuels. Cependant, dans la cellule mucoviscidose, nous avons montré que l'oléate, bien qu'il corrige les effets de l'augmentation du taux de saturation des PL sur l'apoptose, ne palliait pas complètement les impacts sur l'UPR, et qu'il ne restaurait pas l'activité du F508del-CFTR corrigé (Payet *et al.*, 2013a).

Nous avons conscience que notre modèle d'apport exogène de palmitate présente certaines limitations, et qu'il pourrait introduire des biais dans nos expérimentations. En effet, si ce modèle nous permet de mimer le profil phospholipidique des patients CF, il nous éloigne quelque peu de la physiologie de la pathologie. Plus spécifiquement, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cette augmentation du taux de saturation chez les patients résulterait d'une inhibition des désaturases des AG par une carence en oxygène : il s'agirait donc d'une accumulation endogène d'AGS. Dans la poursuite de ce travail, nous allons donc nous concentrer sur le développement d'un modèle plus proche de cette situation physiologique. En prenant l'exemple de notre modèle *hem1* Δ , nous avons alors tenté de bloquer la synthèse de l'hème dans les CFBE41o⁻ par utilisation d'un inhibiteur spécifique : le succinyl-acétone (Zhang and Gerhard, 2009). Malheureusement, l'utilisation de cette molécule n'a pas eu d'impact sur le contenu en AG des PL. Une alternative que nous envisageons aujourd'hui consisterait à inhiber directement la désaturase majoritaire des AGS chez l'homme : l'enzyme SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase-1) (Matsui *et al.*, 2012).

A plus long terme, nous concentrerons nos efforts sur la recherche de molécules pouvant corriger les effets des AGS, de façon plus complète et efficace que l'oléate. L'ensemble des données présentées dans ce manuscrit suggère que l'impact le plus amont et le plus direct des AGS concerne la modulation des propriétés biophysiques des membranes cellulaires, avec pour conséquence une altération de la fonctionnalité des organelles. Nous

soupçonnons donc que les molécules les plus efficaces pourraient être de nature lipidique ou, tout du moins, lipophiles, et présenter une structure de type conique. L'utilisation couplée des modèles levurien et humain est actuellement en cours dans le laboratoire pour le criblage de molécules présentant de telles propriétés.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

References

- Abdul-Karim, F.W., B.B. Dahms, M.E. Velasco, and H.M. Rodman. 1986. Islets of Langerhans in adolescents and adults with cystic fibrosis. A quantitative study. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 110:602-606.
- Allen, S.J., A.R. Curran, R.H. Templer, W. Meijberg, and P.J. Booth. 2004. Controlling the folding efficiency of an integral membrane protein. *Journal of molecular biology*. 342:1293-1304.
- Ames, G.F., C.S. Mimura, and V. Shyamala. 1990. Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS microbiology reviews*. 6:429-446.
- Anderson, E., and J.A. Long. 1947. The effect of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. *Endocrinology*. 40:92-97.
- Andersson, C., and G.M. Roomans. 2000. Activation of deltaF508 CFTR in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX. *Eur Respir J*. 15:937-941.
- Antigny, F., N. Girardin, D. Raveau, M. Frieden, F. Becq, and C. Vandebrouck. 2009. Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion*. 9:232-241.
- Antigny, F., C. Norez, F. Becq, and C. Vandebrouck. 2008. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell calcium*. 43:175-183.
- Araki, E., S. Oyadomari, and M. Mori. 2003. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)*. 228:1213-1217.
- Aridor, M. 2007. Visiting the ER: the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Advanced drug delivery reviews*. 59:759-781.
- Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, A. Shevchenko, and K. Simons. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:3254-3259.
- Baukrowitz, T., T.C. Hwang, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 1994. Coupling of CFTR Cl⁻ channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron*. 12:473-482.
- Bigay, J., J.F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, and B. Antonny. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO journal*. 24:2244-2253.
- Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau, and B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*. 426:563-566.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*. 7:1513-1523.
- Bishop, W.R., and R.M. Bell. 1985. Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter. *Cell*. 42:51-60.
- Blohmke, C.J., M.L. Mayer, A.C. Tang, A.F. Hirschfeld, C.D. Fjell, M.A. Sze, R. Falsafi, S. Wang, K. Hsu, M.A. Chilvers, J.C. Hogg, R.E. Hancock, and S.E. Turvey. 2012. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. *J Immunol*. 189:5467-5475.
- Boslem, E., J.M. Weir, G. Macintosh, N. Sue, J. Cantley, P.J. Meikle, and T.J. Biden. 2013. Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry*.

- Botelho, A.V., T. Huber, T.P. Sakmar, and M.F. Brown. 2006. Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical journal*. 91:4464-4477.
- Bowie, J.U. 2005. Solving the membrane protein folding problem. *Nature*. 438:581-589.
- Breuer, W., N. Kartner, J.R. Riordan, and Z.I. Cabantchik. 1992. Induction of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry*. 267:10465-10469.
- Browman, D.T., M.E. Resek, L.D. Zajchowski, and S.M. Robbins. 2006. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *Journal of cell science*. 119:3149-3160.
- Brown, D.A., and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*. 14:111-136.
- Brown, D.A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *The Journal of biological chemistry*. 275:17221-17224.
- Campana, V., D. Sarnataro, C. Fasano, P. Casanova, S. Paladino, and C. Zurzolo. 2006. Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*. 119:433-442.
- Carson, M.R., S.M. Travis, and M.J. Welsh. 1995. The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *The Journal of biological chemistry*. 270:1711-1717.
- Casavola, V., R.J. Turner, C. Guay-Broder, K.A. Jacobson, O. Eidelman, and H.B. Pollard. 1995. CPX, a selective A1-adenosine-receptor antagonist, regulates intracellular pH in cystic fibrosis cells. *The American journal of physiology*. 269:C226-233.
- Cheng, S.H., R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, C.R. O'Riordan, and A.E. Smith. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 63:827-834.
- Chung, N., C. Mao, J. Heitman, Y.A. Hannun, and L.M. Obeid. 2001. Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. 276:35614-35621.
- Clancy, J.P., S.M. Rowe, F.J. Accurso, M.L. Aitken, R.S. Amin, M.A. Ashlock, M. Ballmann, M.P. Boyle, I. Bronsveld, P.W. Campbell, K. De Boeck, S.H. Donaldson, H.L. Dorkin, J.M. Dunitz, P.R. Durie, M. Jain, A. Leonard, K.S. McCoy, R.B. Moss, J.M. Pilewski, D.B. Rosenbluth, R.C. Rubenstein, M.S. Schechter, M. Botfield, C.L. Ordonez, G.T. Spencer-Green, L. Vernillet, S. Wisseh, K. Yen, and M.W. Konstan. 2012. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 67:12-18.
- Clark, M.R. 2011. Flippin' lipids. *Nature immunology*. 12:373-375.
- Cohen, B.E., G. Lee, K.A. Jacobson, Y.C. Kim, Z. Huang, E.J. Sorscher, and H.B. Pollard. 1997. 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine and other xanthines differentially bind to the wild-type and delta F508 first nucleotide binding fold (NBF-1) domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*. 36:6455-6461.
- Cornelius, F., Y.A. Mahmoud, and H.R. Christensen. 2001. Modulation of Na,K-ATPase by associated small transmembrane regulatory proteins and by lipids. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 33:415-423.
- Coste, T.C., M. Armand, J. Lebacq, P. Lebecque, P. Wallemacq, and T. Leal. 2007. An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clinical biochemistry*. 40:511-520.

- Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter. 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 73:1197-1206.
- Cox, J.S., and P. Walter. 1996. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 87:391-404.
- Cozens, A.L., M.J. Yezzi, K. Kunzelmann, T. Ohrui, L. Chin, K. Eng, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe, and D.C. Gruenert. 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 10:38-47.
- Cunha, D.A., P. Hekerman, L. Ladriere, A. Bazarra-Castro, F. Ortis, M.C. Wakeham, F. Moore, J. Rasschaert, A.K. Cardozo, E. Bellomo, L. Overbergh, C. Mathieu, R. Lupi, T. Hai, A. Herchuelz, P. Marchetti, G.A. Rutter, D.L. Eizirik, and M. Cnop. 2008. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *Journal of cell science*. 121:2308-2318.
- Dawes, I.W., and I.D. Hardie. 1974. Selective killing of vegetative cells in sporulated yeast cultures by exposure to diethyl ether. *Mol Gen Genet*. 131:281-289.
- Dbaibo, G.S., and Y.A. Hannun. 1998. Signal transduction and the regulation of apoptosis: roles of ceramide. *Apoptosis*. 3:317-334.
- de Almeida, S.F., G. Picarote, J.V. Fleming, M. Carmo-Fonseca, J.E. Azevedo, and M. de Sousa. 2007. Chemical chaperones reduce endoplasmic reticulum stress and prevent mutant HFE aggregate formation. *The Journal of biological chemistry*. 282:27905-27912.
- De Vizia, B., V. Raia, C. Spano, C. Pavlidis, A. Coruzzo, and M. Alessio. 2003. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. *Jpen*. 27:52-57.
- Deguil, J., L. Pineau, E.C. Rowland Snyder, S. Dupont, L. Beney, A. Gil, G. Frapper, and T. Ferreira. 2011. Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 12:349-362.
- Denning, G.M., L.S. Ostedgaard, S.H. Cheng, A.E. Smith, and M.J. Welsh. 1992a. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *The Journal of clinical investigation*. 89:339-349.
- Denning, G.M., L.S. Ostedgaard, and M.J. Welsh. 1992b. Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *The Journal of cell biology*. 118:551-559.
- Dhayal, S., and N.G. Morgan. 2011. Structure-activity relationships influencing lipid-induced changes in eIF2alpha phosphorylation and cell viability in BRIN-BD11 cells. *FEBS letters*. 585:2243-2248.
- Diakogiannaki, E., H.J. Welters, and N.G. Morgan. 2008. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *The Journal of endocrinology*. 197:553-563.
- Dickson, R.C. 1998. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annual review of biochemistry*. 67:27-48.
- Dickson, R.C., C. Sumanasekera, and R.L. Lester. 2006. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in lipid research*. 45:447-465.
- Doring, G. 1996. Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Allergy Immunol*. 7:63-66.
- Drin, G., J. Bigay, and B. Antonny. 2009. [Regulation of vesicular transport by membrane curvature]. *Med Sci (Paris)*. 25:483-488.

- Durieu, I., E. Vericel, D. Guichardant, H. Roth, J.P. Steghens, J. Draï, R.N. Josserand, E. Fontaine, M. Lagarde, and G. Bellon. 2007. Fatty acids platelets and oxidative markers following intravenous n-3 fatty acids administration in cystic fibrosis: An open pilot observational study. *J Cyst Fibros.* 6:320-326.
- Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (New York, N.Y.)* 286:1882-1888.
- Farinha, C.M., J. King-Underwood, M. Sousa, A.R. Correia, B.J. Henriques, M. Roxo-Rosa, A.C. Da Paula, J. Williams, S. Hirst, C.M. Gomes, and M.D. Amaral. 2013. Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. *Chemistry & biology.* 20:943-955.
- Ferreira, T., A.B. Mason, M. Pypaert, K.E. Allen, and C.W. Slayman. 2002. Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H⁺-ATPase reveals two checkpoints. *The Journal of biological chemistry.* 277:21027-21040.
- Ferreira, T., M. Regnacq, P. Alimardani, C. Moreau-Vauzelle, and T. Berges. 2004. Lipid dynamics in yeast under haem-induced unsaturated fatty acid and/or sterol depletion. *The Biochemical journal.* 378:899-908.
- Fewell, S.W., K.J. Travers, J.S. Weissman, and J.L. Brodsky. 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual review of genetics.* 35:149-191.
- Folch, J., I. Ascoli, M. Lees, J.A. Meath, and F.N. LeBaron. 1951. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *The Journal of biological chemistry.* 191:833-841.
- Freedman, S.D., P.G. Blanco, M.M. Zaman, J.C. Shea, M. Ollero, I.K. Hopper, D.A. Weed, A. Gelrud, M.M. Regan, M. Laposata, J.G. Alvarez, and B.P. O'Sullivan. 2004. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *The New England journal of medicine.* 350:560-569.
- Gadsby, D.C., and A.C. Nairn. 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiological reviews.* 79:S77-S107.
- Gelman, M.S., E.S. Kannegaard, and R.R. Kopito. 2002. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry.* 277:11709-11714.
- Gibson, L.E., and R.E. Cooke. 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 23:545-549.
- Graham, S., S. Crouch, M.L. Levin, and F.G. Bock. 1963. Variations in Amounts of Tobacco Tar Retrieved from Selected Models of Smoking Behavior Simulated by Smoking Machine. *Cancer research.* 23:1025-1030.
- Gruenert, D.C., M. Willems, J.J. Cassiman, and R.A. Frizzell. 2004. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J Cyst Fibros.* 3 Suppl 2:191-196.
- Gruner, S.M. 1985. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 82:3665-3669.
- Guan, X.L., I. Riezman, M.R. Wenk, and H. Riezman. 2010. Yeast lipid analysis and quantification by mass spectrometry. *Methods in enzymology.* 470:369-391.
- Guenther, G.G., E.R. Peralta, K.R. Rosales, S.Y. Wong, L.J. Siskind, and A.L. Edinger. 2008. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105:17402-17407.
- Guerrera, I.C., G. Astarita, J.P. Jais, D. Sands, A. Nowakowska, J. Colas, I. Sernet-Gaudelus, M. Schuerenberg, D. Piomelli, A. Edelman, and M. Ollero. 2009. A novel lipidomic

- strategy reveals plasma phospholipid signatures associated with respiratory disease severity in cystic fibrosis patients. *PLoS one*. 4:e7735.
- Guilbault, C., G. Wojewodka, Z. Saeed, M. Hajduch, E. Matouk, J.B. De Sanctis, and D. Radzioch. 2009. Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 41:100-106.
- Gunderson, K.L., and R.R. Kopito. 1994. Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane regulator channel gating. *The Journal of biological chemistry*. 269:19349-19353.
- Guo, L., D. Zhou, K.M. Pryse, A.L. Okunade, and X. Su. 2010. Fatty acid 2-hydroxylase mediates diffusional mobility of Raft-associated lipids, GLUT4 level, and lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 285:25438-25447.
- Gurunathan, S., D. David, and J.E. Gerst. 2002. Dynamin and clathrin are required for the biogenesis of a distinct class of secretory vesicles in yeast. *The EMBO journal*. 21:602-614.
- Gwiazda, K.S., T.L. Yang, Y. Lin, and J.D. Johnson. 2009. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296:E690-701.
- Hagman, D.K., L.B. Hays, S.D. Parazzoli, and V. Poirout. 2005. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*. 280:32413-32418.
- Hampton, R.Y. 2000. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol*. 10:R518-521.
- Hannun, Y.A., and R.M. Bell. 1989. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science (New York, N.Y.)*. 243:500-507.
- Hanrahan, J.W., H.M. Sampson, and D.Y. Thomas. 2013. Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis. *Trends in pharmacological sciences*. 34:119-125.
- Harding, H.P., and D. Ron. 2002. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*. 51 Suppl 3:S455-461.
- Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 397:271-274.
- Harsay, E., and A. Bretscher. 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *The Journal of cell biology*. 131:297-310.
- Harsay, E., and R. Schekman. 2002. A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *The Journal of cell biology*. 156:271-285.
- Heberle, F.A., J.T. Buboltz, D. Stringer, and G.W. Feigenson. 2005. Fluorescence methods to detect phase boundaries in lipid bilayer mixtures. *Biochimica et biophysica acta*. 1746:186-192.
- Hechtberger, P., E. Zinser, R. Saf, K. Hummel, F. Paltauf, and G. Daum. 1994. Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 225:641-649.
- Heda, G.D., M. Tanwani, and C.R. Marino. 2001. The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. 280:C166-174.
- Hong, H., and L.K. Tamm. 2004. Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:4065-4070.

- Hrafnsdottir, S., J.W. Nichols, and A.K. Menon. 1997. Transbilayer movement of fluorescent phospholipids in *Bacillus megaterium* membrane vesicles. *Biochemistry*. 36:4969-4978.
- Hubbard, V.S., G.D. Dunn, and P.A. di Sant'Agnes. 1977. Abnormal fatty-acid composition of plasma-lipids in cystic fibrosis. A primary or a secondary defect? *Lancet*. 2:1302-1304.
- Hui, S.W., and A. Sen. 1989. Effects of lipid packing on polymorphic phase behavior and membrane properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:5825-5829.
- Hwang, T.C., G. Nagel, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 1994. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:4698-4702.
- Hybiske, K., Z. Fu, C. Schwarzer, J. Tseng, J. Do, N. Huang, and T.E. Machen. 2007. Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia. *American journal of physiology*. 293:L1250-1260.
- Hyde, S.C., P. Emsley, M.J. Hartshorn, M.M. Mimmack, U. Gileadi, S.R. Pearce, M.P. Gallagher, D.R. Gill, R.E. Hubbard, and C.F. Higgins. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 346:362-365.
- Iannucci, A., K. Mukai, D. Johnson, and B. Burke. 1984. Endocrine pancreas in cystic fibrosis: an immunohistochemical study. *Human pathology*. 15:278-284.
- Illek, B., H. Fischer, G.F. Santos, J.H. Widdicombe, T.E. Machen, and W.W. Reenstra. 1995. cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *The American journal of physiology*. 268:C886-893.
- Ish-Horowitz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic acids research*. 9:2989-2998.
- Jacobson, K.A., C. Guay-Broder, P.J. van Galen, C. Gallo-Rodriguez, N. Melman, M.A. Jacobson, O. Eidelman, and H.B. Pollard. 1995. Stimulation by alkylxanthines of chloride efflux in CFPAC-1 cells does not involve A1 adenosine receptors. *Biochemistry*. 34:9088-9094.
- Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 444:840-846.
- Karaskov, E., C. Scott, L. Zhang, T. Teodoro, M. Ravazzola, and A. Volchuk. 2006. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology*. 147:3398-3407.
- Kaufman, R.J. 2004. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences*. 29:152-158.
- Kelly, A., and A. Moran. 2013. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros*. 12:318-331.
- Killian, J.A. 1998. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1376:401-415.
- Kim, Y.E., M.S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, and F. Ulrich Hartl. 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*. 82:323-355.
- Klemm, R.W., C.S. Ejsing, M.A. Surma, H.J. Kaiser, M.J. Gerl, J.L. Sampaio, Q. de Robillard, C. Ferguson, T.J. Proszynski, A. Shevchenko, and K. Simons. 2009. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology*. 185:601-612.

- Kubota, K., Y. Niinuma, M. Kaneko, Y. Okuma, M. Sugai, T. Omura, M. Uesugi, T. Uehara, T. Hosoi, and Y. Nomura. 2006. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *Journal of neurochemistry*. 97:1259-1268.
- Kunzelmann, K., M. Briel, R. Schreiber, S. Ricken, R. Nitschke, and R. Greger. 1998. No evidence for direct activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. *Cell Physiol Biochem*. 8:185-193.
- Kuo, P.T., N.N. Huang, and D.R. Bassett. 1962. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *The Journal of pediatrics*. 60:394-403.
- Lee, A.G. 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et biophysica acta*. 1612:1-40.
- Lee, A.G. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1666:62-87.
- Lee, M.C., L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazzola, and R. Schekman. 2005. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*. 122:605-617.
- Leonard, A., P. Lebecque, J. Dingemans, and T. Leal. 2012. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *J Cyst Fibros*. 11:231-236.
- Li, Y., M. Ge, L. Ciani, G. Kuriakose, E.J. Westover, M. Dura, D.F. Covey, J.H. Freed, F.R. Maxfield, J. Lytton, and I. Tabas. 2004. Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 279:37030-37039.
- Lloyd-Still, J.D., C.A. Powers, D.R. Hoffman, K. Boyd-Trull, L.A. Lester, D.C. Benisek, and L.M. Arterburn. 2006. Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 22:36-46.
- Los, D.A., and N. Murata. 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et biophysica acta*. 1394:3-15.
- Luo, J., M.D. Pato, J.R. Riordan, and J.W. Hanrahan. 1998. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *The American journal of physiology*. 274:C1397-1410.
- Ma, T., J.R. Thiagarajah, H. Yang, N.D. Sonawane, C. Folli, L.J. Galiotta, and A.S. Verkman. 2002. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *The Journal of clinical investigation*. 110:1651-1658.
- Mall, M., M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber, and K. Kunzelmann. 1998. The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *The Journal of clinical investigation*. 102:15-21.
- Mall, M., M. Bleich, J. Kuehr, M. Brandis, R. Greger, and K. Kunzelmann. 1999. CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *The American journal of physiology*. 277:G709-716.
- Mall, S., R. Broadbridge, R.P. Sharma, A.G. Lee, and J.M. East. 2000. Effects of aromatic residues at the ends of transmembrane alpha-helices on helix interactions with lipid bilayers. *Biochemistry*. 39:2071-2078.

- Mander, A., S. Langton-Hewer, W. Bernhard, J.O. Warner, and A.D. Postle. 2002. Altered phospholipid composition and aggregate structure of lung surfactant is associated with impaired lung function in young children with respiratory infections. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 27:714-721.
- Marchal, C., S. Dupre, and D. Urban-Grimal. 2002. Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. *Journal of cell science*. 115:217-226.
- Matsui, H., T. Yokoyama, K. Sekiguchi, D. Iijima, H. Sunaga, M. Maniwa, M. Ueno, T. Iso, M. Arai, and M. Kurabayashi. 2012. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes. *PloS one*. 7:e33283.
- McCarty, N.A., T.A. Standaert, M. Teresi, C. Tuthill, J. Launspach, T.J. Kelley, L.J. Milgram, K.A. Hilliard, W.E. Regelman, M.R. Weatherly, M.L. Aitken, M.W. Konstan, and R.C. Ahrens. 2002. A phase I randomized, multicenter trial of CPX in adult subjects with mild cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 33:90-98.
- McKarney, C., M. Everard, and T. N'Diaye. 2007. Omega-3 fatty acids (from fish oils) for cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD002201.
- Mesmin, B., G. Drin, S. Levi, M. Rawet, D. Cassel, J. Bigay, and B. Antonny. 2007. Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry*. 46:1779-1790.
- Mironov, A.A., G.V. Beznoussenko, R.S. Polishchuk, and A. Trucco. 2005. Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochimica et biophysica acta*. 1744:340-350.
- Moran, A., J. Dunitz, B. Nathan, A. Saeed, B. Holme, and W. Thomas. 2009. Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes care*. 32:1626-1631.
- Mori, K., T. Kawahara, H. Yoshida, H. Yanagi, and T. Yura. 1996. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*. 1:803-817.
- Mori, K., W. Ma, M.J. Gething, and J. Sambrook. 1993. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 74:743-756.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 115:377-388.
- Nanua, S., U. Sajjan, S. Keshavjee, and M.B. Hershenson. 2006. Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 343:135-143.
- Norez, C., S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, and F. Becq. 2006. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS letters*. 580:2081-2086.
- O'Keeffe, A.H., J.M. East, and A.G. Lee. 2000. Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF. *Biophysical journal*. 79:2066-2074.
- Ollero, M., G. Astarita, I.C. Guerrero, I. Sermet-Gaudelus, S. Trudel, D. Piomelli, and A. Edelman. 2011. Plasma lipidomics reveals potential prognostic signatures within a cohort of cystic fibrosis patients. *Journal of lipid research*. 52:1011-1022.
- Osborne, A.R., T.A. Rapoport, and B. van den Berg. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:529-550.
- Ozcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A.H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L.H. Glimcher, and G.S. Hotamisligil. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*. 306:457-461.

- Paolisso, G., P.A. Tataranni, J.E. Foley, C. Bogardus, B.V. Howard, and E. Ravussin. 1995. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. 38:1213-1217.
- Pasyk, E.A., and J.K. Foskett. 1995. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 270:12347-12350.
- Payet, L.A., L. Kadri, S. Giraud, C. Norez, J.M. Berjeaud, C. Jayle, S. Mirval, F. Becq, C. Vandebrouck, and T. Ferreira. 2013a. Cystic fibrosis airway cells are lipointoxicated by hypoxia-related palmitate accumulation. *in press*.
- Payet, L.A., L. Pineau, E.C. Snyder, J. Colas, A. Moussa, B. Vannier, J. Bigay, J. Clarhaut, F. Becq, J.M. Berjeaud, C. Vandebrouck, and T. Ferreira. 2013b. Saturated fatty acids alter the late secretory pathway by modulating membrane properties. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*.
- Pedemonte, N., and L.J. Galiotta. 2012. Pharmacological Correctors of Mutant CFTR Mistrafficking. *Frontiers in pharmacology*. 3:175.
- Pencharz, P.B., and P.R. Durie. 2000. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 19:387-394.
- Pilot, J.D., J.M. East, and A.G. Lee. 2001. Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of Escherichia coli. *Biochemistry*. 40:8188-8195.
- Pineau, L., L. Bonifait, J.M. Berjeaud, P. Alimardani-Theuil, T. Berges, and T. Ferreira. 2008. A lipid-mediated quality control process in the Golgi apparatus in yeast. *Molecular biology of the cell*. 19:807-821.
- Pineau, L., J. Colas, S. Dupont, L. Beney, P. Fleurat-Lessard, J.M. Berjeaud, T. Berges, and T. Ferreira. 2009. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 10:673-690.
- Pineau, L., and T. Ferreira. 2010. Lipid-induced ER stress in yeast and beta cells: parallel trails to a common fate. *FEMS yeast research*. 10:1035-1045.
- Potiron, V.A., G. Sharma, P. Nasarre, J.A. Clarhaut, H.G. Augustin, R.M. Gemmill, J. Roche, and H.A. Drabkin. 2007. Semaphorin SEMA3F affects multiple signaling pathways in lung cancer cells. *Cancer research*. 67:8708-8715.
- Preston, A.M., E. Gurisik, C. Bartley, D.R. Laybutt, and T.J. Biden. 2009. Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia*. 52:2369-2373.
- Rapoport, T.A. 2008. Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *The FEBS journal*. 275:4471-4478.
- Rapoport, T.A., V. Goder, S.U. Heinrich, and K.E. Matlack. 2004. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends in cell biology*. 14:568-575.
- Riordan, J.R. 2008. CFTR function and prospects for therapy. *Annual review of biochemistry*. 77:701-726.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B.S. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins, and L.C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*. 245:1066-1073.
- Robertson, R.P., J. Harmon, P.O. Tran, and V. Poitout. 2004. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 53 Suppl 1:S119-124.

- Robinson, M., P.P. Poon, C. Schindler, L.E. Murray, R. Kama, G. Gabriely, R.A. Singer, A. Spang, G.C. Johnston, and J.E. Gerst. 2006. The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Molecular biology of the cell*. 17:1845-1858.
- Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui, and F.S. Collins. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)*. 245:1059-1065.
- Rubenstein, R.C., M.E. Egan, and P.L. Zeitlin. 1997. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *The Journal of clinical investigation*. 100:2457-2465.
- Rubenstein, R.C., and P.L. Zeitlin. 1998. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 157:484-490.
- Saibil, H.R. 2008. Chaperone machines in action. *Current opinion in structural biology*. 18:35-42.
- Sato, K., and A. Nakano. 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS letters*. 581:2076-2082.
- Schneider, R., B. Brugger, R. Sandhoff, G. Zellnig, A. Leber, M. Lampl, K. Athenstaedt, C. Hrastnik, S. Eder, G. Daum, F. Paltauf, F.T. Wieland, and S.D. Kohlwein. 1999. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *The Journal of cell biology*. 146:741-754.
- Schroder, M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci*. 65:862-894.
- Schultz, B.D., R.A. Frizzell, and R.J. Bridges. 1999a. Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX. *The Journal of membrane biology*. 170:51-66.
- Schultz, B.D., A.K. Singh, D.C. Devor, and R.J. Bridges. 1999b. Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiological reviews*. 79:S109-144.
- Sevier, C.S., and C.A. Kaiser. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:836-847.
- Shaw, A.S. 2006. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nature immunology*. 7:1139-1142.
- Shen, J., X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes. 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell*. 3:99-111.
- Shen, X., K. Zhang, and R.J. Kaufman. 2004. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of chemical neuroanatomy*. 28:79-92.
- Sheppard, D.N., and M.J. Welsh. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews*. 79:S23-45.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569-572.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 1:31-39.
- Skrzypek, M.S., M.M. Nagiec, R.L. Lester, and R.C. Dickson. 1998. Inhibition of amino acid transport by sphingoid long chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. 273:2829-2834.

- Soejima, K., and B.H. Landing. 1986. Pancreatic islets in older patients with cystic fibrosis with and without diabetes mellitus: morphometric and immunocytologic studies. *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association*. 6:25-46.
- Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:504-513.
- Starling, A.P., J.M. East, and A.G. Lee. 1995. Effects of phospholipid fatty acyl chain length on phosphorylation and dephosphorylation of the Ca(2+)-ATPase. *The Biochemical journal*. 310 (Pt 3):875-879.
- Starling, A.P., Y.M. Khan, J.M. East, and A.G. Lee. 1994. Characterization of the single Ca(2+)-binding site on the Ca(2+)-ATPase reconstituted with short- or long-chain phosphatidylcholines. *The Biochemical journal*. 304 (Pt 2):569-575.
- Stewart, J.C. 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical biochemistry*. 104:10-14.
- Surma, M.A., C. Klose, R.W. Klemm, C.S. Ejsing, and K. Simons. 2011. Generic sorting of raft lipids into secretory vesicles in yeast. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 12:1139-1147.
- Surma, M.A., C. Klose, and K. Simons. 2012. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochimica et biophysica acta*. 1821:1059-1067.
- Tanigawa, G., L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, J.B. Helms, and J.E. Rothman. 1993. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology*. 123:1365-1371.
- Tate, M.W., E.F. Eikenberry, D.C. Turner, E. Shyamsunder, and S.M. Gruner. 1991. Nonbilayer phases of membrane lipids. *Chemistry and physics of lipids*. 57:147-164.
- Teichgraber, V., M. Ulrich, N. Endlich, J. Riethmuller, B. Wilker, C.C. De Oliveira-Munding, A.M. van Heeckeren, M.L. Barr, G. von Kurthy, K.W. Schmid, M. Weller, B. Tummler, F. Lang, H. Grassme, G. Doring, and E. Gulbins. 2008. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature medicine*. 14:382-391.
- Tierney, K.J., D.E. Block, and M.L. Longo. 2005. Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophysical journal*. 89:2481-2493.
- Trombetta, E.S., and A.J. Parodi. 2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annual review of cell and developmental biology*. 19:649-676.
- Underwood, B.A., C.R. Denning, and M. Navab. 1972. Polyunsaturated fatty acids and tocopherol levels in patients with cystic fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 203:237-247.
- Van den Berg, B., W.M. Clemons, Jr., I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S.C. Harrison, and T.A. Rapoport. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. 427:36-44.
- van den Brink-van der Laan, E., J.A. Killian, and B. de Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et biophysica acta*. 1666:275-288.
- Van Goor, F., S. Hadida, P.D. Grootenhuys, B. Burton, J.H. Stack, K.S. Straley, C.J. Decker, M. Miller, J. McCartney, E.R. Olson, J.J. Wine, R.A. Frizzell, M. Ashlock, and P.A. Negulescu. 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:18843-18848.

- Vashist, S., W. Kim, W.J. Belden, E.D. Spear, C. Barlowe, and D.T. Ng. 2001. Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *The Journal of cell biology*. 155:355-368.
- Veret, J., N. Coant, E.V. Berdyshev, A. Skobeleva, N. Therville, D. Bailbe, I. Gorshkova, V. Natarajan, B. Portha, and H. Le Stunff. 2011. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells. *The Biochemical journal*. 438:177-189.
- Wandinger, S.K., K. Richter, and J. Buchner. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry*. 283:18473-18477.
- Wei, Y., D. Wang, C.L. Gentile, and M.J. Pagliassotti. 2009. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 331:31-40.
- Weir, G.C., and S. Bonner-Weir. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53 Suppl 3:S16-21.
- Welsh, M.J. 2010. Targeting the basic defect in cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*. 363:2056-2057.
- Welsh, M.J., and A.E. Smith. 1995. Cystic fibrosis. *Scientific American*. 273:52-59.
- White, N.M., D. Jiang, J.D. Burgess, I.R. Bederman, S.F. Previs, and T.J. Kelley. 2007. Altered cholesterol homeostasis in cultured and in vivo models of cystic fibrosis. *American journal of physiology*. 292:L476-486.
- Wiechelmann, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*. 175:231-237.
- Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K.C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J.R. Yankaskas, S. Randell, R.C. Boucher, and G. Doring. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation*. 109:317-325.
- Yoshida, H., M. Oku, M. Suzuki, and K. Mori. 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of cell biology*. 172:565-575.
- Yoshida, H., A. Uemura, and K. Mori. 2009. pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell structure and function*. 34:1-10.
- Zhang, J.X., I. Braakman, K.E. Matlack, and A. Helenius. 1997. Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Molecular biology of the cell*. 8:1943-1954.
- Zhang, S., and G.S. Gerhard. 2009. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target. *PloS one*. 4:e7472.
- Zinser, E., C.D. Sperka-Gottlieb, E.V. Fasch, S.D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*. 173:2026-2034.

Effets des acides gras saturés sur la voie de sécrétion. Relation avec la mucoviscidose

Résumé : Les acides gras saturés (AGS) altèrent la fonctionnalité des organites dans de nombreux types cellulaires. Il a été proposé que ce processus, également nommé lipointoxication, puisse être responsable de plusieurs pathologies humaines telles que le diabète de Type 2.

Au niveau cellulaire, l'accumulation d'AGS est associée à une augmentation du taux de saturation des phospholipides (PL) membranaires, les composants majoritaires des membranes des organites, mais également du taux de céramides, impliqués dans l'induction de l'apoptose.

Dans une première partie de ce travail, nous avons étudié, chez le modèle cellulaire simple *Saccharomyces cerevisiae*, la contribution relative des PL saturés et des céramides à la cytotoxicité des AGS. Nous avons pu démontrer que les céramides agissaient à des étapes précoces de la voie de sécrétion, alors que les PL saturés impactaient des étapes plus tardives en altérant en particulier la formation de vésicules de sécrétion.

Parallèlement, nous avons également constaté que le taux d'AGS était significativement augmenté dans les PL membranaires des patients atteints d'une maladie génétique, la mucoviscidose. La mutation la plus fréquente responsable de cette maladie, résulte en la rétention de la protéine correspondante dans le réticulum endoplasmique. Des molécules pharmacologiques, capables de corriger le trafic de la protéine à sa destination finale ont été isolées *in vitro*, mais des limitations importantes ont pu être observées lors des tests cliniques. Nous proposons dans le présent manuscrit que la lipointoxication liée aux AGS pourrait être un écueil important à l'utilisation des correcteurs actuels pour le traitement de la mucoviscidose.

Mots clés : palmitate, phospholipides, céramides/sphingolipides, stress du RE, apoptose, formation des vésicules, trafic des protéines, diabète de type 2, diabète lié à la mucoviscidose.

Abstract: Saturated fatty acids (SFA) have been reported to alter organelle integrity in many cell types. This process, also known as lipotoxicity, has been proposed to be responsible for several human pathologies such as type 2 diabetes.

At the cellular level, SFA accumulation is associated with an increase of the saturation rate of membrane phospholipids (PL), the major components of organelle membranes, and an increase of ceramides levels, implicated in apoptosis induction.

In the first part of this work, we took advantage of a simple yeast-based model to study the relative contributions of saturated PL and ceramides to SFA cytotoxicity. We demonstrated that ceramides act early in the secretory pathway, while saturated PL impact the later steps, and particularly the formation of secretory vesicles.

In parallel, we observed that SFA amounts were significantly increased in the membrane PL of cystic fibrosis (CF) patient cells. The most common mutation responsible for this genetic disease results in the retention of the corresponding protein in the endoplasmic reticulum. Pharmacological agents, which correct the mistrafficking of the protein, have been isolated *in vitro*, but they did not show significant improvements in clinical trials. We propose in the present manuscript, that SFA-related lipointoxication could be an important bottleneck for the use of these pharmacological agents in clinical trials.

Keywords: palmitate, phospholipids, ceramides/sphingolipids, ER stress, apoptosis, vesicular budding, protein trafficking, type 2 diabetes, CFRD (Cystic Fibrosis Related Diabetes).