

Université de Montréal

**Étude de l'association du réticulum
endoplasmique lisse marqué par le récepteur du
facteur autocrine de motilité avec les
mitochondries**

Par

Hélène Genty

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc)

Juillet 2003

© Hélène Genty, 2003



W
4
U58
2003
V. 157

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'association du réticulum
endoplasmique lisse marqué par le récepteur du
facteur autocrine de motilité avec les
mitochondries**

Présenté par :

Hélène Genty

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Lucie Parent, PhD

Directeur de recherche : Ivan Robert Nabi, PhD

Membre du jury : Jacques Paiement, PhD

Mémoire accepté le :

'if we knew what we were doing, it wouldn't be called research.'
Albert Einstein

Résumé

Dans les cellules eucaryotes, deux organites largement étudiées présentent des sites de contact, et cette association a une importance fonctionnelle significative : il s'agit du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Le rôle de ces zones de proximité et les paramètres qui les régulent sont encore mal connus. Cependant, récemment, l'utilisation des aequorines ou d'autres protéines recombinantes a permis d'identifier l'implication de cette association dans l'homéostasie et la signalisation calcique.

Ce projet de maîtrise porte sur la caractérisation de l'association des mitochondries avec le sous-domaine du réticulum endoplasmique lisse défini par la présence du récepteur du facteur autocrine de motilité (AMF-R) dans les cellules MDCK intactes.

Dans les cellules MDCK intactes, en utilisant l'ionophore de calcium ionomycine, l'inhibiteur des pompes SERCA thapsigargine, et la sonde calcique Fura-2-AM, nous avons étudié l'influence des niveaux calciques cytosoliques et internes au réticulum endoplasmique sur l'association du réticulum endoplasmique lisse avec les mitochondries. Nous avons montré que l'association était dépendante du calcium cytosolique selon une courbe en cloche, avec un minimum centré autour de 100 nM. Cette association est au contraire indépendante des réserves calciques du réticulum endoplasmique. Nos travaux ont aussi montré que le réticulum endoplasmique rugueux n'est pas affecté par les variations du calcium cytosolique, mais qu'il existe une corrélation entre la proximité du réticulum endoplasmique lisse avec les mitochondries, et sa continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux.

Mots-clefs : récepteur du facteur autocrine de motilité, réticulum endoplasmique lisse, mitochondries, sous-domaine, calcium, réserves calciques, ionomycine, thapsigargine, Fura-2-AM

Summary

In eukaryotic cells, sites of close contacts between the endoplasmic reticulum and mitochondria have been observed and described for over half a century, but we are only beginning to understand the significance of this association and the parameters involved in its regulation. However, recently, the extensive use of aequorins and other recombinant proteins has shed a new light on the implication of the proximity of the two organelles in calcium homeostasis and signalling.

This project was aimed to better characterize the association of mitochondria with a subdomain of the endoplasmic reticulum (ER) enriched in the autocrine motility factor receptor protein (AMF-R), in intact MDCK cells.

Using the calcium ionophore ionomycin, the SERCA pump inhibitor thapsigargin, and the calcium probe Fura-2-AM, we were able to modulate cytosolic and intra-ER calcium levels and determine their relative influence on the mitochondria-associated smooth ER organization. We showed that the proximity of the two compartments was dependent on the cytosolic calcium concentration in a biphasic manner, with a minimum centered around 100 nM, and was independent from the intra-ER calcium pool. Our work also showed that although the rough ER was not affected by cytosolic calcium increases, smooth ER proximity to mitochondria was correlated with its continuity with the rough ER.

Keywords : autocrine motility factor receptor, smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, subdomain, calcium, calcium pool, ionomycin, thapsigargin, Fura-2-AM

Remerciements

Tout d'abord, je n'aurais pas entrepris d'effectuer une maîtrise sans mes parents qui m'ont donné le goût des connaissances, transmis leurs encouragements et leur envie d'aller plus loin : je leur en suis extrêmement reconnaissante.

Bien que la biologie m'ait depuis longtemps intéressée, ce sont mes professeurs de biologie du secondaire, notamment Mme Boden et M. Leleu qui l'ont rendu aussi passionnante à mes yeux : je les remercie pour leur enthousiasme communicatif et leurs conseils avisés.

Surtout, je souhaite exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr Ivan Robert Nabi pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Toujours disponible et accessible, ses conseils et ses encouragements qui m'ont non seulement guidée, mais aussi grandement motivée durant mon travail.

L'article présenté dans ce mémoire n'aurait pu aboutir sans le Dr Rémy Sauvé qui a activement contribué à son écriture. Il nous a en outre permis d'effectuer les mesures de calcium dans son laboratoire, et nous a éclairé de son expertise dans le domaine du calcium. Nous l'en remercions vivement.

Tout au long de mon séjour au sein du laboratoire du Dr Nabi, je me suis trouvée chanceuse de pouvoir travailler dans un environnement de travail aussi sympathique et motivant. J'adresse un grand merci à tous mes collègues de travail : Anaïck, Hao, Jianguo, Laurence, Marilyn, Mohammad, Patrick, Phuong, Thao, Zongjian.

L'apprentissage des techniques de laboratoire, les présentations ou la réalisation de posters n'auraient pu avoir lieu sans l'excellente aide technique et les conseils de Mme Ginette Guay, M. Michel Lauzon, et M. Jean Léveillé. Je remercie également tout le

personnel administratif du département de pathologie et biologie cellulaire de l'université de Montréal pour leur soutien.

Je remercie sincèrement les membres de mon jury : les Dr Lucie Parent et Dr Jacques Paiement, pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de ce mémoire. Leur révision de ce travail contribue ainsi à son amélioration.

Enfin, Michel et mes amis de Montréal ont grandement participé à l'aboutissement de ce projet : tant par leur amitié et leur soutien moral que par les discussions ayant trait à leur propre expérience durant leurs maîtrises. Leur rigueur et leur curiosité scientifiques sont pour moi des exemples et une source de motivation supplémentaire.

Table des Matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Summary</i>	<i>iii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>iv</i>
<i>Table des Matières</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>viii</i>
1 Introduction	1
1.1 Le Réticulum Endoplasmique (RE)	1
1.1.1 Le RE rugueux	2
1.1.1.1 Morphologie	2
1.1.1.2 Fonctions	2
1.1.1.3 Sous-domaines	3
1.1.2 Le RE de transition	3
1.1.3 Le RE lisse	4
1.1.3.1 Morphologie	4
1.1.3.2 Fonctions	4
1.1.3.3 Sous-domaines	5
1.2 Les Mitochondries	6
1.2.1 Morphologie	6
1.2.2 Fonctions	7
1.2.2.1 Source de vie ...	7
1.2.2.2 ... Et de mort	8
1.2.3 Le réseau mitochondrial : résultante d'une dynamique de fission et fusion	9
1.2.4 Des mitochondries hétérogènes	10
1.2.5 Interdépendance mitochondries/cellule	11
1.3 L'association RE – Mitochondries	12
1.3.1 Observations	12
1.3.2 Fonctions	13
1.3.2.1 Transfert de lipides	13
1.3.2.2 Apoptose	13
1.3.2.3 Homéostasie et signalisation calcique	15
a. Le réticulum endoplasmique : un réservoir de calcium	15
b. Une réserve de calcium hétérogène	15
c. Le réticulum endoplasmique participe à la signalisation calcique	16
d. Le RE régule le calcium cytosolique au moyen de protéines responsables du flux calcique	16
e. Le niveau de calcium cytosolique affecte la morphologie du RE	18
f. Le calcium à l'interface RE/mitochondries	20
g. Les mitochondries contrôlent les signaux calciques du RE	21

1.4. Le Récepteur du Facteur Autocrine de Motilité (AMF-R)	22
1.4.1. Localisation et caractérisation des tubules AMF-R	22
1.4.2. Tubules AMF-R et Mitochondries	23
1.4.3. L'endocytose de l'AMF	24
1.4.4. AMF-R et motilité cellulaire.	24
1.4.5. AMF-R et malignité tumorale	25
1.4.6. AMF-R et ERAD	25
2 Objectifs	27
3 Article	28
4 Discussion	29
4.1 Résumé et discussion des résultats obtenus	29
4.1.1 Le REI marqué par l'AMF-R est spécifiquement affecté par les changements de niveau calcique cytosolique	29
4.1.2 L'association REI-mitochondries est maintenue à faible ou à forte concentration calcique dans les cellules MDCK intactes	29
4.1.3 Le calcium intraluménal ne semble pas impliqué dans la régulation de l'association REI-mitochondries	30
4.1.4 Une relation REI-mitochondries ou RER-REI-mitochondries ?	31
4.2 La régulation de l'association RE lisse/mitochondries	31
4.2.1 La voie de signalisation de la protéine kinase C	31
4.2.2 Les microtubules sont-elles nécessaires à la mise en place de l'association RE lisse-mitochondries ?	32
4.2.3 Association RE lisse-mitochondries lors de concentrations calciques élevées et apoptose	33
4.2.4 Les concentrations calciques mesurées reflètent-elles la réalité ?	34
4.3 Les rôles potentiels du réticulum lisse marqué par l'AMF-R	35
4.3.1 Le réticulum endoplasmique lisse de l'AMF-R : un sous-domaine distinct sensible au calcium	35
4.3.2 Le compartiment de l'AMF-R et le maintien de l'intégrité des mitochondries	36
4.3.3 Le cycle de l'AMF-R	37
4.3.4 Les tubules AMF-R comme porte de sortie du ERAD ?	37
4.3.5 L'AMF-R : un inhibiteur de l'apoptose ?	38
4.4 Le domaine de l'AMF-R et les MAMs	39
4.4.1 MAM et ubiquitination	39
4.4.2 MAM et signalisation calcique	40
4.4.3 L'AMF-R et la phosphatidylcholine	40
5 Conclusion	41
6 Bibliographie	42

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMF	Facteur autocrine de motilité
AMF-R	Récepteur du facteur autocrine de motilité
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
CM	Calcium et magnésium
CN	Calnexine
CSB	Tampon stabilisateur de microtubules
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EPMA	Electron probe x-ray microanalysis
HSP	Heat Shock Protein
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
InsP ₃ R	Récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate
MAM	Membrane associée aux mitochondries
MDCK	Madin Darby Canin Kidney Cells
MVB	Corps multivésiculaires
NLK	Neuroleukine
PBS	Solution saline tamponnée en phosphate
PE	Phosphatidyléthanolamine
PGI	Isomérase de phosphoglucose
PS	Phosphatidylsérine

RE	Réticulum endoplasmique
REI	Réticulum endoplasmique lisse
REr	Réticulum endoplasmique rugueux
REt	Réticulum endoplasmique de transition
RyR	Récepteur à la ryanodine
SERCA	Pompe calcique du réticulum sarco-/endoplasmique
Tg	Thapsigargine
VDAC	Canal anionique dépendant du voltage

1 Introduction

1.1 Le Réticulum Endoplasmique (RE)

Porter, le premier, donna son nom au réticulum endoplasmique (RE) en 1953, alors qu'il mettait au point la méthode de fixation par le tétroxide d'osmium pour la microscopie électronique (Porter, 1953). Il fut frappé par son aspect réticulaire, c'est-à-dire en forme de filet, étendu dans tout le cytoplasme. Le RE est en effet une organelle présente dans toutes les cellules eucaryotes, et la plus importante source de membrane des cellules. Il existe un intéressant paradoxe à propos de cette organelle : il semblerait qu'elle constitue à la fois un réseau continu (des protéines de fusion localisées dans la lumière du RE sont capables de diffuser dans tout le réseau (Cole et al., 1996; Subramanian and Meyer, 1997)), mais possèdent aussi des sous-domaines fonctionnels spécialisés enrichis en certaines protéines. Le RE est le site principal de synthèse des protéines, des glycoprotéines et des lipides de la cellule. On distingue trois types de RE qui se différencient par leur morphologie et leurs fonctions : le RE rugueux (REr), transitionnel (REt), et lisse (REl), eux-mêmes subdivisibles en sous-domaines. Nous tenons à mentionner que l'excellente revue de littérature concernant le RE par Otto Baumann et Bernd Walz (2001) nous a été d'une aide précieuse pour la rédaction de ce chapitre, et nous en recommandons la lecture pour de plus amples informations (Baumann and Walz, 2001).

1.1.1 Le RE rugueux

1.1.1.1. Morphologie

Le RER existe en continuité avec l'enveloppe nucléaire et doit son nom à la présence de nombreux ribosomes à sa surface qui lui confèrent *de visu* un aspect granuleux. Également, la présence de ribosomes influence la morphologie du réticulum, puisque sa structure est altérée dans des levures présentant des mutations pour la localisation des ribosomes (Prinz et al., 2000). La morphologie du RER varie grandement selon les types cellulaires et leur état physiologique. Par exemple, le RER des cellules ayant une activité sécrétrice élevée est constitué de citernes plates empilées les unes sur les autres, comme c'est le cas dans les cellules exocrines du pancréas. Cette configuration optimise le rapport surface/volume du RE, ce qui permet la synthèse d'un plus grand nombre de protéines dans le même laps de temps (Baumann and Walz, 2001).

1.1.1.2. Fonctions

La présence de ribosomes n'est pas qu'un attribut morphologique, mais caractérise la principale fonction du RER : la synthèse protéique cotraductionnelle. En effet, le complexe ribosome-polypeptide en formation est acheminé vers le RER grâce à la liaison de la particule de reconnaissance du signal (*Signal Recognition Particle* ou SRP) avec son récepteur (Rapoport et al., 1996). A ce niveau, la protéine en cours de synthèse passe alors vers la lumière du RER grâce à la formation d'un pore de 2 à 6 nm de diamètre dont les composantes principales sont le complexe Sec61p, et les protéines TRAM et TRAP (Matlack et al., 1998).

Suite à leur synthèse, les protéines poursuivent leur repliement et leur maturation dans le RE. Elles acquièrent leur configuration tridimensionnelle grâce à des protéines dites chaperonnes qui semblent être plus concentrées au niveau du RE rugueux (Opas et al., 1991) ; les protéines BiP/Grp78, endoplasmine/Grp74, calnexine et calréticuline en font partie (Baumann and Walz, 2001). La calnexine notamment est une protéine membranaire de type I qui lie les protéines monoglycosylées par son domaine luminal (Bergeron et al., 1998; Hebert et al., 1995).

1.1.1.3. Sous-domaines

Au sein du RER, on distingue des domaines caractérisés par l'enrichissement en telle ou telle protéine : nous les appelons sous-domaines.

Des travaux utilisant l'hybridation *in situ* ont montré que la localisation des ARN messagers au niveau du RER variait selon le type de protéines pour lesquelles ils codent (Trembleau and Bloom, 1996). Il semblerait donc que l'hétérogénéité des protéines dans la lumière du RE et leur destination soient déterminées dès leur traduction. Cela donne lieu à une hétérogénéité de la composition protéique de la lumière du RE ; c'est le cas pour les protéines liant le calcium comme nous l'exposerons plus loin (paragraphe 1.3.2.3.). À ce propos, il est intéressant de remarquer que la plupart des protéines liant le calcium jouent aussi le rôle de chaperonne. En conséquence, les protéines « chaperonnées » sont aussi distribuées inégalement dans le RER.

1.1.2 Le RE de transition

Après avoir été synthétisées et correctement repliées, les protéines qui ne sont pas destinées à rester dans le RE sont acheminées vers l'appareil de Golgi dans des vésicules. Un autre domaine du RE est spécialisé dans ces tâches : il s'agit du REt,

composé à la fois de réticulum lisse et rugueux (Palade, 1975). Les vésicules formées à l'aide du complexe cytosolique COPII bourgeonnent à partir d'extrémités de REI émergeant du RE rugueux (Bannykh et al., 1996), et fusionnent par la suite pour former le compartiment intermédiaire Golgi-RE ou ERGIC (*ER-Golgi Intermediate Compartment*) (Hauri et al., 2000; Kappeler et al., 1997). Lorsque des protéines destinées à rester dans le RE en sorte par erreur, elles sont reconduites vers leur lieu de résidence à l'aide de vésicules entourées de la protéine COP I (Aridor et al., 1995).

1.1.3 Le RE lisse

1.1.3.1. Morphologie

Le REI est ainsi appelé par opposition au RER car sa surface est dépourvue de ribosomes, et apparaît donc plus lisse en microscopie électronique (Alberts, 2002).

1.1.3.2. Fonctions

Tout d'abord, le REI participe à la synthèse des lipides et du cholestérol. Dans des cellules privées de cholestérol, le REI prolifère sous forme de RE crystalloïde, un sous-type de REI formé de tubules lisses assemblés de manière hexagonales, et l'enzyme HMG CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase) y est surexprimée comparativement aux conditions contrôles et au RER (Chin et al., 1982; Pathak et al., 1986). L'enzyme HMG CoA réductase étant l'enzyme catalysant l'étape limitante de la cinétique de la synthèse de cholestérol, ces études montrent un rôle pour le REI dans la production de cette molécule.

Ensuite, le REI des cellules spécialisées dans la synthèse de stéroïdes (cellules surrénales corticales, cellules de Leydig) est très développé, indiquant son rôle dans leur production (Fawcett, 1981).

Également, le REI est impliqué dans la signalisation calcique : c'est le cas par exemple des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique des cellules du muscle squelettique dont les réserves calciques sont nécessaires à la contraction musculaire (Jorgensen et al., 1982), ou du réticulum lisse des bourgeons synaptiques des neurones de Purkinje impliqué dans la transmission synaptique (Martone et al., 1993). Il a été proposé que l'enrichissement du REI en canaux calciques cause alors un encombrement stérique ne permettant pas la présence de ribosomes à la surface du RE (Baumann and Walz, 2001).

Le REI des épines dendritiques de cellules de l'hippocampe, de par certaines continuités avec la membrane plasmique, serait impliqué dans le recyclage de la membrane des synapses (Spacek and Harris, 1997).

Enfin, un rôle du REI pourrait être le métabolisme du glycogène. En effet, il existe une proximité du REI avec les particules de glycogène, et des enzymes impliquées dans la transformation du glycogène se trouvent associées aux membranes de REI (al-Habori, 1995; Margolis et al., 1979).

1.1.3.3. sous-domaines

Il existe de nombreux sous-domaines du REI spécialisés dans la signalisation calcique.

Comme nous venons de le mentionner, un sous-domaine du REI est le réticulum sarcoplasmique (SR), lui-même subdivisible en SR longitudinal et SR terminal. Une

grande quantité de pompes calciques SERCA se trouve dans la membrane du SR longitudinal où elles pompent le calcium cytosolique, alors que le SR terminal est enrichi en canaux calciques récepteurs à la ryanodine (RyR) qui relâchent les ions calciques vers les tubules T de la membrane plasmique (Jorgensen et al., 1982).

Dans les cellules neuronales, la répartition différentielle de canaux calciques ou de protéines liant le calcium permet la création de sous-domaines spécialisés dans la relâche et le stockage du calcium (Takei et al., 1992). Ainsi, dans les cellules de Purkinje, un enrichissement du REI en canaux calciques récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃R) est responsable de la formation de réserves calciques sous la forme de citernes empilées (Takei et al., 1994).

Enfin, un autre sous-domaine du REI est défini par la présence du récepteur du facteur autocrine de motilité que nous présenterons plus loin (paragraphe 1.4.), et dont la fonction est encore mal comprise (Wang et al., 1997).

1.2 Les Mitochondries

1.2.1. Morphologie

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Elles sont entourées par deux membranes : la membrane mitochondriale interne (MMI) et la membrane mitochondriale externe (MME), séparées par l'espace intramitochondrial, qui entourent la matrice mitochondriale. La membrane externe est perméable à de petites molécules jusqu'à 5 kDa chargées *via* les pores formés par la protéine VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel* ou porine) ; elle est donc perméable à l'ADP/ATP. La MMI est moins perméable, mais laisse passer l'eau,

l'oxygène et le carbone. La membrane interne possède de multiples circonvolutions appelées crêtes augmentant la surface d'échange entre matrice et espace intramitochondrial. La matrice mitochondriale renferme les enzymes du cycle de Krebs, certains éléments comme l'eau, l'oxygène, de dioxyde de carbone ainsi que des intermédiaires métaboliques et l'ADN mitochondrial, codant pour une partie des protéines mitochondriales (Alberts, 2002).

1.2.2. Fonctions

Les rôles des mitochondries sont pour le moins paradoxaux. En effet, ces organites jouent un rôle central à la fois dans la survie et la mort des cellules, et plusieurs de leurs protéines sont impliquées dans ces deux fonctions (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003).

1.2.2.1. Source de vie ...

Les mitochondries sont le lieu de plusieurs procédés nécessaires à la survie des cellules : l'oxydation des acides gras, le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, et une partie du cycle de l'urée (Alberts, 2002).

Également, les mitochondries jouent un rôle critique dans les cellules eucaryotes puisqu'elles produisent la grande majorité de l'énergie dont elles ont besoin sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Les réactions de phosphorylation oxydantes produisant l'ATP ont lieu dans la membrane interne des mitochondries. Elles impliquent un transport d'électrons à travers une série de protéines membranaires, reliées entre elles par les protéines ubiquinone et cytochrome c. L'énergie des électrons est transformée en gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne grâce à l'activité de pompage des protons de la chaîne respiratoire. Enfin, ce potentiel électrochimique

permet la synthèse de l'ATP grâce à la synthase de l'ATP : la F_0F_1 -ATPase (Alberts, 2002).

Le calcium est nécessaire au métabolisme des mitochondries. Denton et McCormack démontrèrent les premiers la dépendance au calcium de trois enzymes mitochondriales (les déshydrogénases de pyruvate, de NAD^+ -isocitrate, et de 2-oxoglutarate) (Denton and McCormack, 1980). Ces trois enzymes catalysent la formation de la NADH qui fait partie de la chaîne respiratoire et est donc un point de contrôle du métabolisme mitochondrial. Denton et McCormack proposèrent, ainsi que d'autres chercheurs, que l'entrée de calcium dans les mitochondries module la production d'ATP en fonction des besoins de la cellule (Denton and McCormack, 1980; Denton and McCormack, 1985; Denton and McCormack, 1990). Rizzuto *et col.* confirmèrent leur hypothèse en montrant une nette augmentation de la NADH due à l'augmentation du calcium calcique mitochondrial (Rizzuto et al., 1994). Plus récemment, Jouaville *et col.* montrèrent que l'élévation de calcium mitochondrial causait une augmentation de la production d'ATP (Jouaville et al., 1999). L'apport de calcium aux mitochondries a donc un impact direct sur leur métabolisme. De plus, le patron de signalisation de calcium étant hétérogène, cela permettrait une modulation spatio-temporelle fine de la production d'ATP en fonction des besoins de la cellule (Kennedy et al., 1999).

1.2.2.2. ... Et de mort

Des protéines impliquées dans la synthèse de l'ATP prennent part dans les cascades de signalisation de la mort cellulaire programmée, aussi appelée apoptose. L'apoptose caractérise la série d'évènements qui a lieu en cas de problème majeur dans

la cellule et par laquelle cette dernière provoque sa propre destruction : ce processus conduit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui sont ensuite dégradés par les macrophages (Alberts, 2002). Les protéines principalement exécutrices de l'apoptose sont les caspases, des protéases spécifiques cystéine-acide aspartique (Alnemri et al., 1996), et une cascade de signalisation déclenchée par l'activation des caspases implique les mitochondries dans l'apoptose (Susin et al., 1997). En réponse à des signaux de morts (des *death signals*), plusieurs facteurs sont libérés des mitochondries. Il s'agit par exemple du cytochrome c et de Smac/DIABLO. Leur relâche mène à l'activation de la caspase-9 (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Les modes d'induction et de régulation de l'apoptose au niveau des mitochondries n'ont pas obtenu de consensus, et, à l'instar de Mayer et Oberbauer, nous pensons qu'il existe probablement plusieurs alternatives en fonction du stimulus apoptotique (Mayer and Oberbauer, 2003).

1.2.3. Le réseau mitochondrial : résultante d'une dynamique de fission et fusion

Si les mitochondries apparaissent comme des structures isolées rondes ou tubulaires dans la plupart des cellules en coupe, leur observation après reconstruction tridimensionnelle révèle en fait un réseau interconnecté. Cette connection pourrait jouer un rôle dans la communication intracellulaire et la répartition de l'ATP dans la cellule (Kaasik et al., 2003). De nombreuses études ont souligné le lien qui existe entre la morphologie et le positionnement des mitochondries et le cytosquelette (Drubin et al., 1993; Heggeness et al., 1978; Martz et al., 1984), et en particulier avec les microtubules (Ball and Singer, 1982; Soltys and Gupta, 1992). L'importance de l'intégrité des

microtubules pour le positionnement des mitochondries a été montrée chez deux mutants de levure dont les microtubules étaient affectées (Yaffe et al., 1996). De plus, les techniques d'imagerie de cellules vivantes ont révélé le caractère hautement dynamique de ce réseau. Il semblerait que la constante réorganisation du réticulum mitochondrial soit le résultat d'un équilibre entre événements de fusion et de fission (Yang and Yu, 2003). Des protéines participant à la fusion des mitochondries chez les mammifères ont été identifiées : il s'agit des protéines mitofusines (Mfn1 et Mfn2), homologues des GTPases *fuzzy onions* (Fzo) de la Drosophile (Hales and Fuller, 1997; Santel and Fuller, 2001). La *dynamamin-related protein 1* (Drp1), quant à elle, est impliquée dans la fission (Otsuga et al., 1998; Pitts et al., 1999; Smirnova et al., 1998), ainsi que Fis1p (Shaw and Nunnari, 2002). De récents travaux ont confirmé la fusion des mitochondries chez les cellules de mammifères, et ont montré que la fusion des mitochondries dépendait du potentiel de la membrane mitochondriale interne (Ishihara et al., 2003; Legros et al., 2002; Mattenberger et al., 2003), mais qu'elle serait indépendante du cytosquelette (Mattenberger et al., 2003).

1.2.4. Des mitochondries hétérogènes

Si la présence de mitochondries dans la cellule sous forme de réseau a été montrée, cela ne veut pas dire pour autant que toutes les mitochondries soient en permanence fusionnées et donc équivalentes. D'ailleurs, l'idée d'une continuité des membranes mitochondriales externes et la nécessité de l'apport d'énergie à toute la cellule ne sont pas en contradiction avec des matrices mitochondriales discrètes. Cependant, les fusions mitochondriales permettent la réparation du matériel génétique

lorsque des mutations du matériel génétique mitochondrial surviennent (Nakada et al., 2001; Ono et al., 2001).

L'hétérogénéité des mitochondries, ne serait-ce que des matrices, est nécessaire pour plusieurs événements cellulaires. Par exemple, dans les cellules acineuses du pancréas les mitochondries répondent à la relâche calcique de la région granulaire de manière différente selon leur localisation cellulaire. Stimulées par l'acétylcholine, la concentration calcique des mitochondries de la région périgranulaire augmente significativement plus que celle des mitochondries de la zone basolatérale des cellules acineuses (Park et al., 2001). Il apparaît que les mitochondries de la région périgranulaire formeraient en fait une barrière délimitant le signal calcique - ce qui expliquerait le phénomène sus-mentionné - et moduleraient l'activation des canaux calciques RyR (Récepteurs à la Ryanodine). Cela présenterait l'intérêt de confiner l'élévation du calcium cytosolique dans la région de sécrétion dépendante du calcium (Park et al., 2001; Straub et al., 2000; Tinel et al., 1999). De plus, l'augmentation de la concentration calcique préférentiellement dans les mitochondries périgranulaires permettrait une production d'ATP accrue dans cette région, disponible pour la sécrétion (Voronina et al., 2002).

1.2.5. Interdépendance mitochondries/cellule

Si les mitochondries possèdent leur propre ADN, elles n'en sont pas moins dépendantes des autres organites pour leur activité. Les mitochondries dépendent du reste de la cellule pour plusieurs raisons. Tout d'abord leur ADN ne leur permet pas de synthétiser la totalité de leurs protéines : la plupart sont importées à partir du cytosol (Truscott et al., 2003). Également, certains lipides lui sont fournis (Voelker, 2003). Ces

dépendances pourraient expliquer la proximité signalée à de nombreuses reprises par la littérature des mitochondries avec le réticulum endoplasmique.

1.3. L'association RE - Mitochondries

1.3.1. Observations

Leur étonnante et fréquente proximité fut rapportée pour la première fois dans la littérature par Edward Dempsey en 1953 à partir d'observations en microscopie électronique (Dempsey, 1953). Des sites de contacts entre la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane externe des mitochondries ont été observés en microscopie électronique (Franke and Kartenbeck, 1971; Montisano et al., 1982; Morre et al., 1971). Par tomographie électronique, un site de contact de 14 nM de diamètre a même été identifié (Perkins et al., 1997).

De plus, d'autres études soutiennent l'idée d'un contact physique entre ces deux organites. Notamment, une fraction du RE copurifie avec les mitochondries (Lewis and Tata, 1973; Shore and Tata, 1977), et enfin une membrane associée aux mitochondries et provenant du RE est impliquée dans le transfert de phospholipides entre les deux organites (voir paragraphe 1.3.2.1. ci-dessous) (Vance, 1990). Concernant leur dynamique, des études laissent penser que le RE soit nécessaire pour maintenir le réseau mitochondrial, mais l'inverse n'est pas certain puisque des mutations changeant la structure mitochondriale n'affectent pas le réticulum (Prinz et al., 2000).

1.3.2. Fonctions

1.3.2.1. Transfert de lipides

La majorité des phospholipides finissent d'être synthétisés dans la membrane du RE, puis sont exportés vers les membranes des autres organites (Vance and Vance, 1988). La phosphatidyléthanolamine fait exception à la règle puisqu'elle peut aussi être synthétisée dans les mitochondries par décarboxylation de la phosphatidylsérine (Dennis and Kennedy, 1972). Cependant, une fraction membranaire présentant des homologies avec le RE a été isolée en association avec les mitochondries : la *Mitochondria-Associated Membrane* (MAM) (Vance, 1990), et cette fraction est impliquée dans le transfert de la phosphatidylsérine (PS) vers les mitochondries (Shiao and Vance, 1995). Ce transfert nécessite la présence d'une protéine mitochondriale (Shiao et al., 1998). Le même phénomène a été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Achleitner et al., 1999). Ces études montrent donc que si l'étape finale de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine a bien lieu au niveau des mitochondries, cette étape se fait en étroite collaboration avec un domaine du RE.

De plus, les MAMs sont enrichies en enzyme responsable de la conversion de la PE des mitochondries en phosphatidylcholine (PC), la PE *N*-methyltransferase-2 (PEMT2) (Cui et al., 1993). Également, la MAM contient des enzymes de biosynthèse des glycosphingolipides et semble donc être un domaine privilégié d'apport de glycosphingolipides en provenance du RE aux mitochondries (Ardail et al., 2003).

1.3.2.2. Apoptose

La mort cellulaire programmée est un autre exemple de phénomène suggérant une interaction entre mitochondries et RE. Les mitochondries jouent un rôle central dans

l'apoptose comme nous l'avons mentionné plus haut (paragraphe 1.2.2.2.). Cependant, le RE n'est pas laissé pour compte et son intervention dans ce processus rejoint la voie mitochondriale. Par exemple, une de ses protéines membranaires, BAP31 joue un rôle dans l'apoptose. BAP31 est une protéine membranaire ubiquitaire de 28 kDa (Adachi et al., 1996; Mosser et al., 1994) enrichie dans le RE (Annaert et al., 1997; Ng et al., 1997), et est un substrat préférentiel des caspases initiateuses 8 et 1 (Ng et al., 1997). Des cellules épithéliales humaines (KB) mutantes, résistantes au clivage de BAP31 par les caspases, sont résistantes à l'apoptose lorsqu'elle est induite par la liaison de Fas à son récepteur (Nguyen et al., 2000). Les événements caractéristiques de l'apoptose au niveau des mitochondries, tels que la relâche de cytochrome c ou la perte du potentiel électrochimique mitochondrial, n'ont pas lieu dans ces cellules (Nguyen et al., 2000). Tout récemment, l'interférence RE-mitochondries dans le phénomène d'apoptose en ce qui concerne BAP31 a été précisé par Breckenridge *et col.* qui ont montré que le clivage de BAP31 au niveau du RE par la caspase 8 provoquait une relâche de calcium du réticulum, accompagnée par une augmentation du niveau calcique dans les mitochondries, ce qui entraînait leur fission, et la libération de cytochrome c (Breckenridge et al., 2003).

En outre, BAP31 peut s'associer à Bcl-2 (Ng et al., 1997), une autre protéine impliquée dans l'apoptose, présente à la fois dans l'enveloppe nucléaire, le RE et les mitochondries (Germain and Shore, 2003; Krajewski et al., 1993). Certaines équipes rapportent même une localisation plus spécifique au niveau du REI et de la membrane mitochondriale interne (Gotow et al., 2000).

1.3.2.3. Homéostasie et signalisation calcique

a. Le réticulum endoplasmique : un réservoir de calcium

Le RE est la plus importante réserve de calcium des cellules. De nombreuses techniques ont été utilisées pour mesurer la concentration calcique au sein du RE. Les principales sont la microscopie électronique comme l'*electron probe X-ray analysis* ou EPMA (Ho et al., 2003; Somlyo et al., 1985), l'utilisation d'indicateurs de calcium fluorescents tels que les molécules Fluo-3 (Pojoga and Hilderman, 2003), Fura-2 (Wang et al., 2000), ou de protéines recombinantes comme les aequorines qui présentent l'avantage de pouvoir être dirigées plus spécifiquement que les indicateurs de calcium vers un compartiment cellulaire (Alvarez and Montero, 2002; Montero et al., 1997). La mesure du niveau de calcium libre dans la lumière du RE par ces deux dernières techniques donne des valeurs comprises entre 100 μM et 5 mM (Alvarez and Montero, 2002; Meldolesi and Pozzan, 1998). Mais la plupart du calcium contenu dans le RE y est présent en liaison avec des protéines (*calcium binding proteins*), ayant une faible affinité et une grande capacité de liaison avec ce cation. Il existe une grande variété de ces protéines liant le calcium dans la lumière du RE. Elles permettent de diminuer la concentration libre de calcium intra-luménale et donc le gradient contre lequel les pompes calciques doivent transporter le calcium à l'intérieur du RE (Baumann and Walz, 2001).

b. Une réserve de calcium hétérogène

Bien que la lumière du RE soit en grande partie continue (Park et al., 2000), la répartition des protéines liant le calcium n'y est pas homogène (Meldolesi and Pozzan,

1998; Papp et al., 2003) : le contenu en calcium du RE est par conséquent également hétérogène (Alvarez and Montero, 2002; Montero et al., 1997; Papp et al., 2003; Pozzan et al., 1994). La concentration des protéines de liaison du calcium dans certains domaines permettrait de localiser le calcium à proximité de sites de relâche via des interactions protéines-protéines avec les canaux calciques (Camacho and Lechleiter, 1995). En particulier, la calréticuline est une protéine liant une grande partie du calcium du RE. Elle colocaliserait possiblement avec le canal calcique récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃R), et il a été montré dans les cellules HeLa surexprimant la calréticuline qu'elle liait spécifiquement le calcium dans les réserves calciques du RE sensibles à l'IP₃ (Bastianutto et al., 1995).

c. Le réticulum endoplasmique participe à la signalisation calcique

L'hétérogénéité du RE en calcium et son caractère hautement dynamique (Lee and Chen, 1988) sont nécessaires à son rôle de signalisation puisqu'ils lui permettent de générer des signaux calciques locaux dans certains domaines cellulaires comme c'est le cas au cours de la phagocytose (Stendahl et al., 1994).

d. Le RE régule le calcium cytosolique au moyen de protéines responsables du flux calcique

Le RE constitue une réserve et une source de calcium pour la cellule, et donc régule le calcium cytosolique. L'échange de calcium entre le cytoplasme et la lumière du RE a lieu grâce à la présence, dans la membrane du RE, de protéines permettant ou facilitant plus ou moins sélectivement le passage des ions calciques à travers la membrane du RE : on appelle ces protéines des canaux calciques si elles ne nécessitent pas de consommation d'énergie, ou des pompes calciques dans le cas où leur fonctionnement

requiert l'apport d'énergie sous forme d'ATP (Alberts, 2002). Un premier type de ces protéines dans le RE sont les pompes SERCAs (pour *Sarco-/Endoplasmic Reticulum Calcium pumps*), des hydrolases de l'ATP responsables du transport actif du calcium cytosolique vers la lumière du RE. Dix membres de cette famille de protéines ont été identifiés pour l'instant (Martin et al., 2002).

Une seconde protéine – un canal calcique cette fois-ci - permet la sortie de calcium vers le cytosol ; il s'agit de l'InsP₃R ou Récepteur de l'Inositol 1,4,5-trisPhosphate. Son activation dépend de sa stimulation par l'IP₃ (Inositol 1,4,5-trisPhosphate), et est également sensible au taux de calcium cytosolique et intraluménal (Kaftan et al., 1997; Patel et al., 1999) : son ouverture est potentialisée par de faibles taux de calcium cytosolique jusqu'à 200-300 nM (Bezprozvanny et al., 1991; Iino, 1990), et diminuée par de plus fortes concentrations (Hirata et al., 1984; Iino, 1990), alors que sa sensibilité à l'IP₃ va de paire avec la concentration calcique intraluménale (Missiaen et al., 1992; Missiaen et al., 1991). Son équivalent au niveau du réticulum sarcoplasmique est le RyR (Berridge, 1997; Chen et al., 1997) dont la réponse au calcium est elle aussi biphasique (*bell-shaped*) avec une activation maximale autour de 1-100 μM (Bezprozvanny et al., 1991).

Lorsque l'activation des canaux calciques tels que l'InsP₃R et le RyR est causée par le calcium, ce phénomène porte le nom de relâche de calcium induite par le calcium ou CICR (*Calcium Induced Calcium Release*).

Enfin, la baisse du niveau de calcium du RE entraîne l'entrée de calcium à la membrane plasmique, via les PMCAs (ou *Plasma Membrane Calcium channels*). Ce

phénomène est connu sous le terme d'entrée capacitive de calcium ou CCE (*Capacitive Calcium Entry*) (Putney and McKay, 1999).

e. Le niveau de calcium cytosolique affecte la morphologie du RE

Le rapport du RE au calcium est à double sens : ils s'influencent réciproquement. En effet, de nombreuses études ont montré que des modifications du niveau calcique cytosolique affecte la morphologie du RE (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997; Terasaki et al., 1996; Wang et al., 2000). Le fait que le RE non seulement régule la concentration calcique cytosolique, mais aussi soit affecté par le niveau de calcium intracellulaire reflète le fait que le calcium constitue pour le RE à la fois une donnée entrante et sortante (*input et output signal*) via les canaux calciques.

Chez les échinodermes, l'élévation du calcium cytosolique est associée à une perte de continuité du RE lors de la fertilisation (Terasaki et al., 1996). Ce phénomène ne se produit cependant pas uniquement lors de la fertilisation dans ce type de cellules, puisqu'une réorganisation du RE survient lors de l'augmentation du calcium cytosolique provoquée artificiellement dans d'autres lignées cellulaires (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). Dans ces travaux, les chercheurs ont utilisé la drogue ionomycine pour induire une augmentation du calcium cytosolique. L'ionomycine a été extraite de la bactérie *Streptomyces conglobatus* et possède des propriétés antibiotiques (Liu et al., 1978). Mais il a rapidement été mis en évidence que l'ionomycine était également un ionophore de calcium, et c'est principalement pour cette fonction qu'elle est à présent utilisée en recherche : sa présence permet l'équilibration des concentrations calciques de part et d'autre des membranes biologiques (Liu and Hermann, 1978). Une autre drogue dont l'application permet de varier le calcium cytosolique a été employée

par ces deux groupes : il s'agit de la thapsigargine. Cette substance a été isolée à partir de la plante *Thapsia garganica* (Patkar et al., 1979) et s'est avérée être un inhibiteur spécifique des pompes calciques du RE (Thastrup et al., 1990). La relâche calcique du RE étant permise, mais non sa récupération, les cellules soumises à un traitement à la thapsigargine voient leur niveau calcique cytosolique augmenter (Thastrup et al., 1990).

Subramanian *et col.* tout comme Pedrosa Ribeiro *et col.* utilisèrent les drogues ionomycine et thapsigargine pour moduler le niveau calcique cytosolique de leurs cellules (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). Les deux équipes observèrent une réorganisation du RE suite à l'application de la drogue ionomycine en présence de calcium extracellulaire, mais seuls les seconds trouvèrent que la thapsigargine induisait le même effet. Il n'a pas été déterminé si cette différence venait d'un écart de l'augmentation du calcium cytosolique suite au traitement par la thapsigargine entre les deux types cellulaires (Subramanian et col. n'ont pas suivi la concentration calcique cytosolique au cours de leurs traitements), ni si les réserves calciques intra-RE influençaient la structure de cette organite. Il est à remarquer que, jusqu'à présent, les études mettant en évidence un remaniement de la morphologie du RE dû aux variations du calcium cytosolique avaient en fait pour objet d'étude le RER et non le REI (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997; Terasaki et al., 1996), et à notre connaissance il n'y a pas eu d'études portant sur le comportement de l'association RE - mitochondries - pourtant les partenaires privilégiés de la signalisation calcique du RE – au cours de ces phénomènes.

f. Le calcium à l'interface RE/mitochondries

Les phénomènes d'échange de calcium entre le RE et les mitochondries constituent des événements de signalisation qui ont été largement étudiés. Rizzuto *et col.* ont montré que, lorsque stimulés par l'IP₃, les canaux calciques InsP₃R du RE génèrent des microdomaines de concentration calcique supérieure à la moyenne cytosolique, et qu'une augmentation du niveau calcique mitochondrial s'en suit (Rizzuto et al., 1993). Les mitochondries sont sensibles à l'augmentation de calcium induite par la stimulation de ces canaux, plutôt qu'à une augmentation générale du calcium cytosolique, et cela entraîne la stimulation de leur métabolisme (Rizzuto et al., 1994).

Il a été montré que les pompes SERCAs étaient situées préférentiellement en proximité des mitochondries (Csordas and Hajnoczky, 2001). Cette localisation leur confère la capacité de moduler le calcium cytosolique auquel les mitochondries sont sensibles: lorsque les pompes SERCAs sont inhibées, l'entrée de calcium dans les mitochondries est accrue (Csordas and Hajnoczky, 2001). En d'autres termes, les pompes SERCAs sont des régulateurs négatifs de la réponse mitochondriale en diminuant la concentration de calcium locale.

En outre, les mitochondries ne répondent qu'à une stimulation quantique, c'est-à-dire une élévation subite de la concentration calcique dans sa toute proximité due à l'activation maximale de plusieurs canaux calciques comme l'InsP₃R (Csordas et al., 1999), et cette élévation doit être soutenue et non transitoire pour stimuler une réponse mitochondriale (Szabadkai et al., 2003). En 2001, Csordas *et col.* montrent que les pompes SERCAs peuvent tamponner des concentrations calciques atteintes graduellement (par stimulation par l'adénophostine-A (AP) par exemple), mais qu'elles

ne peuvent s'opposer à une augmentation quantique de calcium (Csordas and Hajnoczky, 2001). Ainsi, grâce à la collaboration des pompes SERCAs, les mitochondries sont spécifiquement stimulées par les canaux calciques de type InsP_3R du RE, et non par des variations globales et non-spécifiques du calcium cytosolique (Csordas and Hajnoczky, 2001). Les mitochondries sont donc spécifiquement stimulées par le calcium du RE.

S'il est depuis longtemps connu que l'entrée et la sortie de calcium du RE ont lieu grâce aux protéines SERCA et InsP_3R , ce n'est que récemment que des expériences ont permis de proposer que le canal anionique dépendant du voltage (VDAC) ferait partie des composantes permettant le passage du calcium au travers des membranes mitochondriales (Rapizzi et al., 2002). En effet, une surexpression des canaux de la membrane mitochondriale externe VDAC dans les cellules HeLa écourte le délai de la réponse mitochondriale suite à une relâche calcique du RE (Rapizzi et al., 2002). Les canaux VDAC pourraient donc être une des composantes de la voie de passage du calcium vers la matrice mitochondriale.

g. Les mitochondries contrôlent les signaux calciques du RE

Les mitochondries contrôlent en retour plusieurs paramètres de la relâche calcique du RE. En contribuant à diminuer la concentration calcique à proximité des canaux InsP_3R , elles potentialisent leur activation dans les ovocytes de *Xenopus* (Jouaville et al., 1995). D'autre part, il a été montré que le potentiel membranaire mitochondrial était nécessaire au couplage de la fréquence de la relâche calcique avec la concentration d' IP_3 dans des cellules de glandes salivaires (Zimmermann, 2000). Enfin, les mitochondries exercent un contrôle en retour négatif sur le seuil d'activation des canaux InsP_3R en

inhibant le contrôle positif du calcium sur ces canaux (Hajnoczky et al., 1999) : la présence de mitochondries induirait donc une hétérogénéité de sensibilité à l'IP₃ et d'excitabilité des canaux InsP₃R (Hajnoczky et al., 1999).

1.4. Le Récepteur du Facteur Autocrine de Motilité (AMF-R)

Le facteur autocrine de motilité (AMF), caractérisé par sa capacité de stimuler la motilité cellulaire, fut purifié à partir de cellules de mélanome A2058 (Liotta et al., 1986). Par la suite, gp78, une glycoprotéine membranaire de 78kDa, a été reconnue comme étant le récepteur du facteur autocrine de motilité (AMF-R) (Nabi et al., 1990; Silletti et al., 1991). Les gènes humains et de souris de l'AMF-R furent clonés dans leur intégralité à partir de cellules de poumon de souris et de la lignée cellulaire de cancer de colon humaine DLD-1, respectivement (Shimizu et al., 1999). Les deux gènes codent pour une protéine de 643 acides aminés (Shimizu et al., 1999), l'AMF-R, qui comporterait sept domaines hydrophobes transmembranaires. En outre, l'AMF-R possède de nombreux domaines fonctionnels : de nombreux sites de phosphorylation par la protéine kinase C, par la caséine kinase II, par la tyrosine kinase, un site de glycosylation et un site de myristoylation sur l'asparagine, un domaine *leucin zipper*, et les domaines RING, et Cue impliqués dans l'ubiquitination (Falquet et al., 2002; Ponting, 2000; Shimizu et al., 1999).

1.4.1. Localisation et caractérisation des tubules AMF-R

L'AMF-R est exprimé à la membrane plasmique et au niveau d'un réseau de vésicules tubulaires intracellulaires (Nabi et al., 1992) qui colocalise avec celui des

microtubules du cytosquelette (Nabi et al., 1992). Ces vésicules constituent en fait une organelle tubulaire distincte des lysosomes marqués par LAMP-2, de l'appareil de Golgi caractérisé par β -COP et du RER marqué par la calnexine (Benlimame et al., 1995), mais sont en continuité avec ce dernier (Wang et al., 1997). Ces vésicules tubulaires lisses, d'un diamètre moyen de 50 à 250 nm (Benlimame et al., 1995), sont aussi différentes du compartiment intermédiaire marqué par ERGIC-53 (Wang et al., 1997). Après traitement par l'ilimaquinone qui induit une fragmentation de l'appareil de Golgi (Takizawa et al., 1993), les tubules AMF-R présentent une morphologie de vésicules fenestrées tripartites caractéristique du REI (Wang et al., 1997), ce qui suggère que les tubules AMF-R sont un sous-domaine du REI (Wang et al., 1997).

1.4.2. Tubules AMF-R et Mitochondries

Les tubules AMF-R présentent une plus ou moins grande association avec les mitochondries selon les types cellulaires, lorsqu'observés en microscopie confocale ou électronique (Wang et al., 2000). Cette association est particulièrement importante dans les cellules MDCK. Dans les cellules MDCK perméabilisées à la digitonine, l'ajout de cytosol entraîne la dissociation des deux organites, mais cet effet est inhibé par chauffage préalable du cytosol ce qui laisse penser qu'un facteur cytosolique régule leur association (Wang et al., 2000). Également, les contacts mitochondries-tubules AMF-R sont dépendants de la concentration calcique cytosolique dans les cellules MDCK perméabilisées à la digitonine : un niveau calcique nul correspond à un taux de dissociation des organites élevé de l'ordre de 40% ; ce taux diminue avec l'augmentation de la concentration calcique cytosolique pour descendre en dessous de 20% lorsque la concentration en calcium atteint 1.5 mM (Wang et al., 2000).

1.4.3. L'endocytose de l'AMF

Le facteur autocrine de motilité est une cytokine de 55 kDa stimulant la motilité de nombreux types cellulaires. Il est surexprimé (Niinaka et al., 1998) et sécrété par les cellules transformées, et stimule la motilité cellulaire de manière endocrine par une voie de signalisation faisant intervenir sa liaison à son récepteur (Nabi et al., 1991). Il a été purifié à partir de cellules de mélanomes A2058 (Liotta et al., 1986), B16-F1 (Silletti et al., 1991), et de cellules de fibrosarcomes HT-1080 (Watanabe et al., 1991).

Outre son rôle dans la motilité cellulaire, l'AMF est en fait identique à l'enzyme intracellulaire isomérase de phosphoglucose (ou *PhosphoGlucose Isomerase*, PGI), et à la cytokine neuroleukine (NLK) (Watanabe et al., 1996).

L'AMF est endocyté vers le compartiment du REI où se trouve son récepteur par une voie indépendante de celle de la clathrine, via les cavéoles (Le et al., 2002). Son internalisation suit une voie d'endocytose nouvelle, distincte de celle suivie par la toxine du choléra puisqu'elle ne nécessite pas le passage par l'appareil de Golgi (Le and Nabi, 2003).

1.4.4. AMF-R et motilité cellulaire.

Il a été montré que la motilité induite par l'AMF est facilitée par sa liaison à son récepteur et son internalisation (Nabi et al., 1991). Une plus forte expression de l'AMF-R corrèle avec une plus grande motilité cellulaire et une capacité invasive accrue des cellules tumorales (Nabi et al., 1992; Watanabe et al., 1993). D'ailleurs, en surface, l'AMF-R se trouve principalement sur les bords les plus motiles des cellules en mouvement (*leading and trailing edges*) (Nabi et al., 1992). Il est à noter que dans les cellules épithéliales polarisées MDCK, la transformation par le virus invasif du sarcome

de Moloney (MSV-MDCK) conduisant à une augmentation de la motilité se traduit par une baisse d'expression de la cadhérine E accompagnée par une augmentation de l'expression de l'AMF-R (Simard and Nabi, 1996).

1.4.5. AMF-R et malignité tumorale

De part sa capacité de stimuler la motilité cellulaire, l'AMF-R est impliqué dans la métastase. Son expression corrèle avec la malignité des tumeurs dans de nombreux cancers, notamment de l'œsophage (Maruyama et al., 1995; Niinaka et al., 2002), de la vessie (Korman et al., 1996; Otto et al., 1997; Otto et al., 1994), des intestins (Hirono et al., 1996; Kawanishi et al., 2000; Taniguchi et al., 1998), des poumons (Takanami et al., 2001), les mélanomes (Nagai et al., 1996), et les thymomes (Ohta et al., 2000). Dans certains cas, il existe une corrélation entre l'augmentation de l'expression de l'AMF-R, la malignité tumorale et la diminution de l'expression de la cadhérine E (Otto et al., 1997).

1.4.6. AMF-R et ERAD

Récemment, il a été démontré que l'AMF-R est une ligase de l'ubiquitine (*Ubiquitin ligase*) de type E3, recrutant MmUBC7, une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine de type E2 (Fang et al., 2001). De plus, l'AMF-R est impliqué dans la dégradation des protéines par le protéasome puisqu'il facilite sa propre dégradation, celle de la sous-unité CD3- δ du récepteur de l'antigène des cellules T via son domaine *RING finger* (Fang et al., 2001), ainsi que celle de l'Apolipoprotéine B100 (Liang et al., 2003).

Lorsque des protéines présentent des anomalies, elles peuvent être dégradées par le système de dégradation associé au RE ou ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*). Elles sont tout d'abord liées à de nombreuses protéines d'ubiquitine à l'aide de plusieurs enzymes qui agissent séquentiellement : E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison à l'ubiquitine ou UBC), et E3 (ligase protéine - ubiquitine) (Yang and Yu, 2003). Elles sont alors dégradées par le protéasome, un complexe protéique composé d'une sous-unité catalytique de 20S, et de deux sous-unités de 19S chargés d'enlever les chaînes de polyubiquitine de la protéine à dégrader (Almond and Cohen, 2002; Arrigo et al., 1988). L'AMF-R est donc un acteur de la dégradation des protéines par le protéasome. Cela soulève la question du lien entre dégradation des protéines et métastase. Cependant, les fonctions des ligases de l'ubiquitine ou E3 sont multiples : il se pourrait que le rôle dans l'ubiquitination des protéines de l'AMF-R ne soit pas uniquement lié à leur dégradation ; nous y reviendrons au cours de la discussion.

2 Objectifs

Comme nous l'avons vu, les interactions entre le RE et les mitochondries ne sont pas des phénomènes isolés, mais supportent différentes fonctions nécessaires à la survie et à la fonctionnalité de la cellule eucaryote. Plusieurs études ont mis en évidence l'influence flagrante de l'augmentation du calcium cytosolique sur la morphologie du RER dans les cellules intactes (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997; Terasaki et al., 1996), mais aucune n'a étudié les conséquences de cette réorganisation sur le degré d'association RE/mitochondries dans les cellules intactes.

Ce travail s'inscrit dans la poursuite de ces études et vise à distinguer le rôle du calcium cytosolique ou des réserves intracellulaires dans la régulation de l'association du réticulum lisse avec les mitochondries. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les drogues ionomycine et thapsigargine, couramment utilisées pour moduler les niveaux calciques du cytosol et du RE, tout en préservant l'intégrité des cellules. Les cellules MDCK ont été retenues comme modèle car elles présentent une importante colocalisation mitochondries-REI.

L'observation de la réponse du REI, du RER et des mitochondries aux traitements a été faite, après marquage immunofluorescent des protéines caractéristiques de ces organites, par microscopie confocale ; le logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging, Inc.) a été choisi pour l'analyse des images et leur quantification. Les mesures de la concentration calcique cytosolique moyenne ont nécessité l'utilisation de la sonde Fura-2-AM et d'un spectrofluoromètre à double faisceau d'excitation.

3 Article

Cet article sera soumis pour publication à la revue scientifique *Journal of Cell Biology* sous le titre suivant:

Integrity of the mitochondria-associated smooth ER is selectively disrupted by a window of cytosolic calcium independently of ER calcium stores

Hélène Genty, Rémy Sauvé[†] and Ivan R. Nabi*

Departments of Pathology and Cell Biology* and Physiology[†], University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Integrity of the mitochondria-associated smooth ER is selectively disrupted by a window of cytosolic calcium independently of ER calcium stores

Hélène Genty, Rémy Sauvé[†] and Ivan R. Nabi*

Departments of Pathology and Cell Biology* and Physiology[†], University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

Running title : Smooth ER-mitochondria association

Number of characters: 26541

Key words: Smooth ER, mitochondria, calcium, AMF-R, autocrine motility factor receptor

*Corresponding author:

Dr. Ivan R. Nabi
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal
C. P. 6128, succursale A
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7

Tel.: (514) 343-6291

Fax: (514) 343-2459

E-mail: [REDACTED]

Abstract

Elevated calcium concentrations generated in proximity of mitochondria by local release from endoplasmic reticulum calcium stores enable mitochondrial calcium uptake. Association between these two organelles is therefore critical for the regulation of cytosolic calcium homeostasis and mitochondrial metabolism. Using the calcium ionophore ionomycin and the SERCA inhibitor thapsigargin we demonstrate that cytosolic calcium, within a concentration range centered around 100 nM, selectively promotes the dissociation of a smooth ER subdomain from mitochondria. Conditions that induce smooth ER-mitochondria dissociation do not affect the distribution of the calnexin-labeled rough ER but do disrupt smooth ER-rough ER continuity. Furthermore, depletion of ER calcium stores with thapsigargin does not influence the calcium-dependent association of the two organelles. The integrity and mitochondrial interaction of this smooth ER domain therefore present a biphasic dependence on cytosolic free calcium independently of lumenal ER calcium.

Introduction

Association between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria was first noted soon after electron microscopy enabled the morphological visualization of the endoplasmic reticulum (Dempsey, 1953; Porter and F., 1953). More recently, confocal imaging using recombinant proteins specifically targeted to the ER and mitochondria confirmed the implication of an ER-mitochondria association in calcium homeostasis (Montero et al., 2000; Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1998; Simpson and Russell, 1996; Szabadkai et al., 2003). Mitochondria are able to sense domains of elevated calcium concentrations generated by IP₃R and/or plasma membrane calcium channel activation that enable rapid mitochondrial accumulation of calcium (Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1998; Simpson and Russell, 1996) and stimulation of mitochondrial metabolism (Jouaville et al., 1999; Robb-Gaspers et al., 1998; Rutter et al., 1996). Mitochondrial calcium uptake is greater when triggered either by quantal incrementation or by sustained calcium release from the endoplasmic reticulum due to the simultaneous activation of several calcium channels, such as IP₃R and RyRs, clustered at sites of close apposition between the ER and mitochondrial membranes (Csordas et al., 1999; Szabadkai et al., 2003). In addition, uptake of calcium by mitochondria has been documented to feedback, through a still undefined mechanism, on the ER calcium release process by controlling the frequency or intensity of IP₃R or RyR channel activation (Hajnóczky et al., 1999; Jouaville et al., 1995; Straub et al., 2000; Zimmermann, 2000). Calcium exchange between the two organelles is therefore a finely tuned cellular process.

The ER is heterogeneous with respect to its calcium storage function due in part to the presence of microdomains enriched in calcium-binding proteins (Meldolesi and Pozzan, 1998; Papp et al., 2003). Mitochondria as well are not functionally equivalent (Collins et al., 2002;

Park et al., 2001). Intracellular segregation of mitochondria is crucial for the spatial regulation of calcium signaling and the control of secretion in pancreatic acinar cells and chromaffin cells (Montero et al., 2000; Tinel et al., 1999). Fusion and fission of mitochondria have been visualized using live imaging techniques confirming that mitochondria are not isolated and immutable entities but present a dynamic continuum within the cell (Jakobs et al., 2003; Nunnari et al., 1997; Rizzuto et al., 1998). The dynamic and heterogeneous nature of the ER and mitochondria together with the importance of ER-mitochondria association in regulating calcium homeostasis suggest that specific, local interactions must necessarily respond to subtle changes in intracellular calcium levels.

Increases of cytosolic calcium affect the morphology of the ER in cellular processes such as fertilization (Terasaki et al., 1996) or oocyte maturation (Shiraishi et al., 1995; Terasaki et al., 2001). Other studies have shown that artificial rises of the cytosolic calcium level dramatically reorganize the ER (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). These studies did not distinguish between ER domains, such as smooth or rough ER, nor did they specifically address ER association with mitochondria. Previously, we identified a smooth ER subdomain that selectively associates with mitochondria and that is characterized by expression of autocrine motility factor receptor (AMF-R) (Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). Association between this smooth ER domain and mitochondria in digitonin-permeabilized cells was shown to be directly dependent on free calcium concentrations (Wang et al., 2000). However, the nature of this interaction in intact cells has yet to be determined. Using the calcium ionophore ionomycin to modulate cellular free calcium levels, we confirm in the present study that elevated free calcium levels favor the association of the two organelles. Reduction of calcium concentrations to the 100 nM range correlated with loss of integrity of the smooth but

not the calnexin-labeled rough ER and with dissociation of the smooth ER from mitochondria. Further reduction of free calcium levels resulted in the reassociation of the two organelles identifying a window of calcium concentrations that disrupts ER-mitochondria interaction in intact cells. The calcium-dependent interaction of the smooth ER and mitochondria was not influenced by depletion of ER calcium stores with thapsigargin and can therefore be regarded as an intracellular biosensor capable of reacting to subtle changes in cytosolic calcium levels.

Results and Discussion

Biphasic regulation by calcium of smooth ER–mitochondria interaction

AMF-R is localized to smooth extensions of the rough ER that are distinct from the transitional ER involved in protein export via ERGIC and the Golgi apparatus (Benlimame et al., 1995; Wang et al., 1997; Wang et al., 2000). Earlier studies describing the disruption of the ER in response to cytosolic calcium changes induced by either ionomycin or thapsigargin used rough ER-targeted GFP fusion proteins (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). While we were able to disrupt the morphology of the calnexin labeled rough ER in MDCK cells exposed to 10 μ M ionomycin in 10 mM extracellular calcium (not shown), these conditions were found to be highly toxic and resulted in cell rounding and detachment. Reducing the ionomycin concentrations led to conditions that selectively affected the smooth and not the rough ER. As seen in Figure 1, the AMF-R labeled smooth ER remained associated with mitochondria in cells incubated with a buffer containing 1 μ M ionomycin and 200 μ M EGTA (Figure 1 A-C). Increasing extracellular calcium to 1 mM disrupted the tubular pattern of the AMF-R labeled smooth ER, which became punctate and no longer colocalized extensively with mitochondria

(Figure 1 D-F). However, at 10 mM extracellular calcium, the AMF-R labeled smooth ER and mitochondria both appeared round and were highly associated (Figure 1 G-I).

The extent of overlap between the smooth ER and mitochondria was quantified from at least 15 confocal images of cells labeled for AMF-R and mitochondrial HSP70 using a mask overlay approach (Figure 2 A), as previously reported (Wang et al., 2000). Values generated using this assay reflect the percentage of AMF-R labeling that is dissociated from mitochondria. In untreated cells and in cells incubated with ionomycin in the absence of extracellular calcium (see Figure 1 A-C), we typically obtain dissociation values ranging from 10 to 20% (Figure 2 A). Mitochondrial labeling covers a large part of the projected cellular area such that complete dissociation (see Figure 1 D-F) is measured as a percent dissociation of approximately 50% (Figure 2 A).

In parallel, cytosolic free calcium levels were measured using the cell-permeable calcium probe Fura-2-AM. The extensive smooth ER-mitochondria dissociation detected in the presence of 1 μ M ionomycin and 1 mM extracellular calcium corresponded to an intracellular calcium concentration of 75 ± 17 nM (Figure 2 A,B). In the presence of 1 μ M ionomycin and 10 mM extracellular calcium, the cytosolic calcium concentration increased to 565 ± 62 nM and resulted in the reassociation of the two organelles (Figure 2 A,B). The ability to induce dissociation at 75 nM cytosolic calcium and reassociation at \sim 500 nM agree with the data previously obtained for digitonin-permeabilized cells (Wang et al., 2000) and confirms that increasing cytosolic calcium levels results in smooth ER-mitochondria association.

However, in contrast to the previous study (Wang et al., 2000), reducing the cytosolic calcium concentration to undetectable levels in cells treated with ionomycin in the absence of extracellular calcium resulted in the reassociation of the two organelles (Figures 1, 2). This

suggests that the mechanisms underlying smooth ER-mitochondria association under conditions of high or low cytosolic calcium are distinct. Those prevailing at low cytosolic calcium may not be functional in cytosol-replenished digitonin-permeabilized cells perhaps due to disruption of the cytoskeletal network and overall cellular architecture in semi-permeabilized cells (Wang et al., 2000).

In untreated cells exhibiting extensive smooth ER-mitochondria association, basal cytosolic calcium levels were measured at 59 ± 10 nM ($n=27$), a value not significantly different from that associated with disruption of smooth ER-mitochondria interactions in the presence of 1 μ M ionomycin and 1 mM extracellular calcium (75 ± 17 nM) (Figure 2). While subtle differences in calcium levels may regulate this interorganellar association, it must however be recognized that Fura-2-AM measures average cellular cytosolic calcium levels that may not reflect the local calcium concentrations seen by the ER-mitochondria complex.

A distinct calcium-sensitive smooth ER domain

Neither the conditions that disrupt smooth ER distribution (1 μ M ionomycin, 1 mM extracellular calcium) nor those that result in a reassociation of the smooth ER and mitochondria (1 μ M ionomycin, 10 mM extracellular calcium) affected the distribution of the calnexin labeled rough ER (Figure 3 A, E, I). As previously reported (Wang et al., 1997; Wang et al., 2000), continuities between the AMF-R labeled smooth ER and the calnexin labeled rough ER are clearly observed under conditions where the smooth ER remained associated with mitochondria (Figure 3 A-D, I-L). In contrast, upon dissociation of the smooth ER from mitochondria, the fragmented AMF-R labeling showed limited continuity with the calnexin-labeled ER and

multiple smooth ER elements were observed that were not in direct contact with the calnexin labeled ER (Figure 3 I, J).

The fact that the integrity of the AMF-R labeled smooth ER can be disrupted by modulation of cytosolic calcium independently of the calnexin labeled rough ER provides additional evidence for the distinct nature of the AMF-R labeled smooth ER domain. Loss of mitochondrial-smooth ER interaction may therefore be due to the selective disruption of the integrity of this smooth ER subdomain at specific calcium concentrations. Regulation of smooth ER integrity and its interaction with mitochondria by calcium transients has implications not only for internal calcium homeostasis but also for the regulation of AMF-R function and trafficking. AMF-R is directly internalized to the smooth ER via a caveolae/raft-dependent pathway (Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003; Nabi and Le, 2003) and regulation of ER-mitochondria association may serve to regulate the temporal and spatial control of the recycling of AMF-R from the smooth ER to the cell surface. Calcium-dependent regulation of the integrity of this organelle may further impact on its functionality during viral infection (Accola et al., 2002) and on AMF-R function as an E3 ubiquitin ligase (Fang et al., 2001; Liang et al., 2003).

ER calcium stores do not regulate smooth ER-mitochondria interaction

ER-associated mitochondria have been shown to present calcium concentration transients in response to a release of calcium from adjacent ER (Montero et al., 2000; Rizzuto et al., 1994; Rizzuto et al., 1993). Thapsigargin is a specific and irreversible inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA pumps) and its application results in the depletion of intracellular ER calcium stores (Inesi and Sagara, 1994; Kirby et al., 1992; Thastrup et al., 1990). MDCK cells treated with 10 μM thapsigargin in a buffer containing 200 μM EGTA present a dissociation of the AMF-R labeled smooth ER to a similar extent as cells treated with 1

μM ionomycin and 1 mM extracellular calcium (Figure 4 A-C and 5 A). As previously reported (Pedrosa Ribeiro et al., 2000), we did not observe alteration in the distribution of the calnexin labeled rough ER under these conditions (not shown). Incubation of the cells in an EGTA-containing buffer in the presence of both 10 μM thapsigargin and 1 μM ionomycin also resulted in ER-mitochondria dissociation after 20 minutes (Figure 4 D-E). Cytosolic calcium levels of cells treated with thapsigargin alone were measured at 128 ± 42 nM (Figure 5 B) and the concomitant addition of 1 μM ionomycin and 10 μM thapsigargin caused a slight reduction of the cytosolic calcium concentration to 95 ± 19 nM (Figure 5 B), evidently due in part to the efflux of some calcium into the extracellular medium. Incubation over longer time periods in 1 μM ionomycin-10 μM thapsigargin-EGTA conditions resulted in a further decrease of the cytosolic calcium level reaching 25 ± 7 nM after an hour (Figure 5 B). Under these conditions, the tubular mitochondria-associated pattern of the AMF-R labeled smooth ER was restored (Figure 4 G-I). Depletion of ER calcium stores does not therefore prevent the association of the smooth ER with mitochondria in low cytosolic calcium conditions.

To determine whether ER calcium stores were required for smooth ER-mitochondria association induced by high cytosolic calcium, we first depleted the ER calcium store with 1 μM ionomycin, 10 μM thapsigargin and 200 μM EGTA for 20 minutes and then incubated the cells for another 20 minutes with 1 μM ionomycin in the presence of 10 mM extracellular calcium. These conditions resulted in high cytosolic calcium concentrations (553 ± 61 nM) and in the reassociation of the smooth ER and mitochondria (Figures 4 and 5). Reorganization of the AMF-R labeled smooth ER therefore responds specifically to changes in free cytosolic calcium levels and is not affected by depletion of ER calcium stores.

IP3R is also localized to the ER and more particularly to ER subdomains [Meldolesi, 1998 #55]. Cellular activation of IP3-sensitive calcium stores is associated with IP3R clustering at discrete regions along ER tubules [Wilson, 1998 #51]. Upon activation, IP3R may therefore relocate to mitochondrial-associated ER subdomains where its role in mitochondrial calcium uptake has been well-described [Rizzuto, 1993 #89; Simpson, 1996 #14; Hajnoczky, 1999 #16]. IP3 receptor gating presents a bell-shaped response with a maxima at about 200-300 nM (Bezprozvanny et al., 1991; Hirata et al., 1984; Iino, 1990); coordination between IP3R gating and ER-mitochondria association in response to elevated cytosolic calcium levels may be an important determinant of the efficiency of mitochondrial uptake of cytosolic calcium.

Material and methods

Cell culture

MDCK cells were grown in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) supplemented with non-essential amino acids, vitamins, glutamine, a penicillin-streptavidin antibiotic mixture (Canadian Life Sciences, Burlington, Ontario, Canada) and 5% fetal bovine serum (Immunocorp, Laval, Quebec, Canada) in an air/5% CO₂ incubator at constant humidity.

Antibodies and Chemicals

Antibodies to mitochondrial heat shock protein 70 (Mt-HSP70; clone JG1) were purchased from Affinity Bioreagents, Inc., and to calnexin from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies conjugated to either FITC, Alexa568 and Alexa647 were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories and Molecular Probes, respectively, and presented no interspecies cross-reactivity. Ionomycin, thapsigargin, Fura-2-AM and other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Immunofluorescence

Cells were plated (40,000 cells/35mm dish) on glass coverslips 2 days before each experiment and then fixed and labeled as previously described (Wang et al., 1997). Briefly, cells were fixed by adding precooled (-80°C) methanol/acetone (80/20%, vol/vol) onto the coverslips, and placed at -20°C for 15 minutes. After fixation, cells were abundantly washed with PBS, pH 7.4, supplemented with 0.1mM Ca²⁺ and 1mM Mg²⁺ (PBS/CM), and then incubated with PBS/CM containing 0.5% BSA (PBS/CM/BSA) for 10 minutes at room temperature to reduce non-specific labeling. All washings and incubations with antibodies were done in PBS/CM/BSA.

After labeling, coverslips were mounted in Airvol (Air Products and Chemicals Inc., Allentown, PA). Confocal images were obtained with a Leica TCS SP1 microscope equipped with 488, 568, and 633 laser lines using either 63X or 100X Planapochromat objectives. The extent of overlap of AMF-R tubules labeling with mitochondria was determined using the Northern Eclipse Mask Overlay application (Empix Imaging, Mississauga, Ontario) as previously described (Wang et al., 2000).

Ca²⁺ Measurements

Cytosolic free calcium concentrations were estimated using the calcium sensitive fluorophore Fura-2-AM as a potassium salt at a concentration of 2 μ M. Fluorescence measurements were performed using a dual-excitation spectrofluorometer (Spex Fluorolog II; Spex Industries Inc.). The excitation wavelengths were set at 350 and 380 nm and emission was monitored at 505 nm with a standard bandpass filter (Andover Corporation 500FS10), as previously described (Wang et al., 2000). Cytosolic free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_{in}$) was calculated using the following equation (Grynkiewicz et al., 1985): $[Ca^{2+}]_{in} = K_d \times (R - R_{MIN}) / (R_{MAX} - R) \times Sf_2/Sb_2$; with K_d equal to 140 nM, R the ratio of the fluorescence measured at 350 and 380 nm, respectively, and Sf_2/Sb_2 the ratio of fluorescence at 380 nm in low and high calcium, respectively. The maximum fluorescence ratio (R_{MAX}) was determined using a 10 mM $CaCl_2$, 10 μ M ionomycin (pH 8) solution to oversaturate the Fura-2, whereas R_{MIN} was obtained with a calcium free solution containing 2.5mM EGTA, and 10 μ M ionomycin (pH8). Measurements of $[Ca^{2+}]$ were performed at pH 7.4 at room temperature (21–23°C).

Legends

Figure 1 Ionomycin in the presence of varying extracellular calcium concentrations alters the distribution of a smooth ER subdomain. MDCK cells were treated with 1 μ M ionomycin and either 200 μ M EGTA (A, B, C), 1 mM extracellular calcium (D, E, F), or 10 mM extracellular calcium (G, H, I) for 20 minutes and double immunofluorescently labeled for AMF-R (A, D, G) and Mt-HSP70 (B, E, H). Merges (C, F, I) show the extent of AMF-R (red) and mitochondria (green) co-distribution in the cells in yellow. Scale bar: 20 μ m.

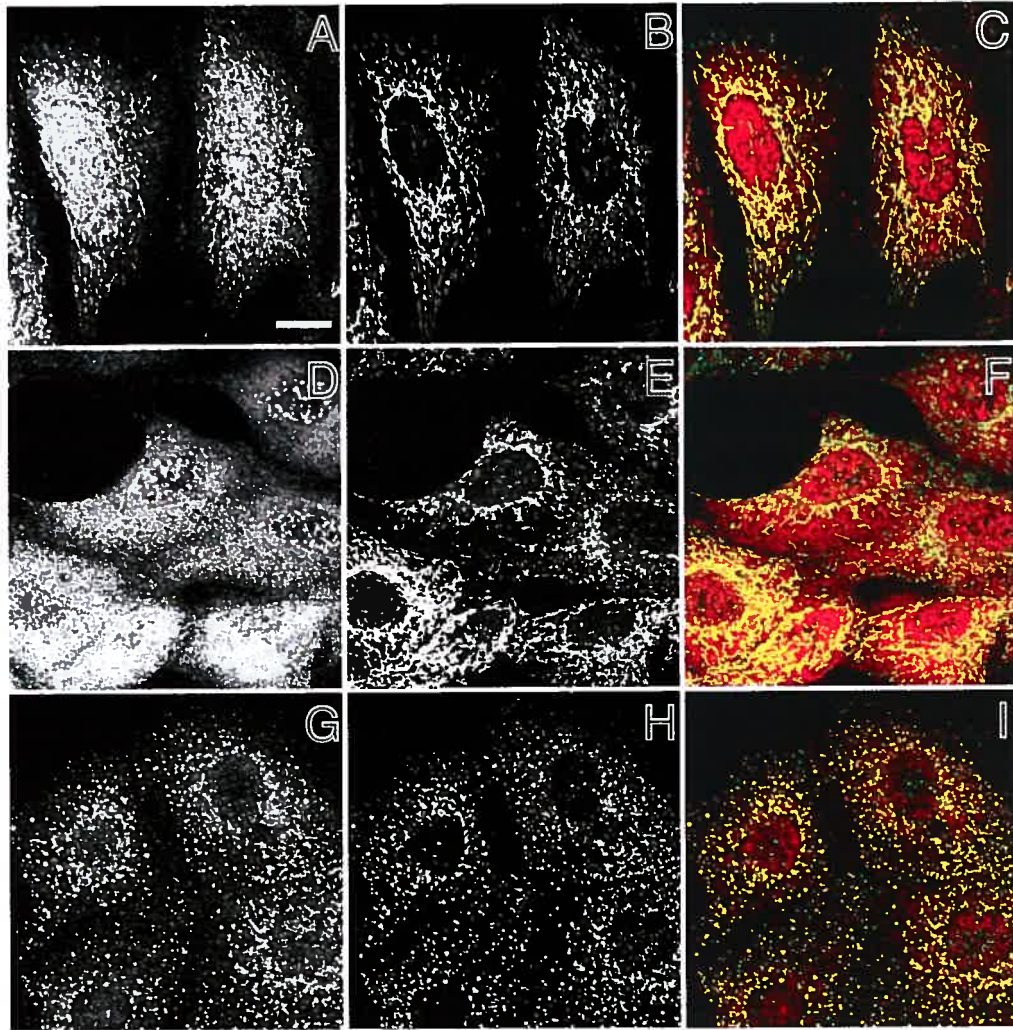


Figure 2 Relationship between smooth ER-mitochondria dissociation and cytosolic free calcium levels. The extent of dissociation of the AMF-R labeled smooth ER from mitochondria was quantified using a mask overlay approach for cells treated with ionomycin and different extracellular calcium conditions as indicated (A). For the same conditions, the corresponding average free cytosolic calcium concentrations were determined using Fura-2-AM and ratiometric labeling (B).

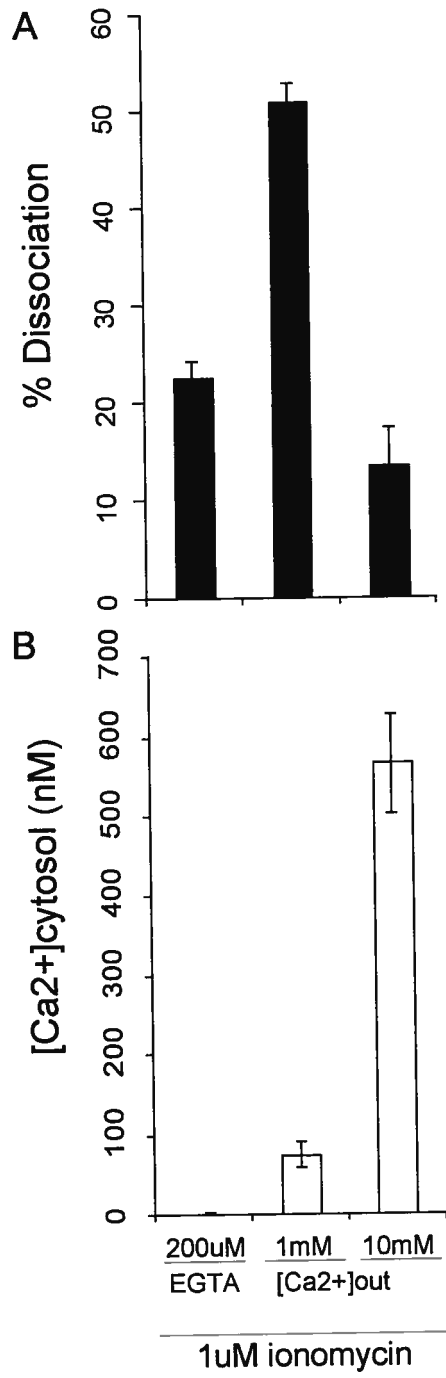


Figure 3 Cytosolic calcium selectively disrupts the integrity of the smooth ER. MDCK cells were either untreated (A-D), or treated with 1 μ M ionomycin and 1 mM extracellular calcium (E-H) or 1 μ M ionomycin and 10 mM extracellular calcium (I-L), and then double immunofluorescently labeled for calnexin (A, E, I) and AMF-R (B, F, J). Merges (C, G, K) show the extent of AMF-R (red) and calnexin (blue) co-distribution in the cells in purple. D, H, L show details of the boxed regions from images C, G, K, respectively. Scale bars: K: 10 μ m; L: 2.5 μ m.

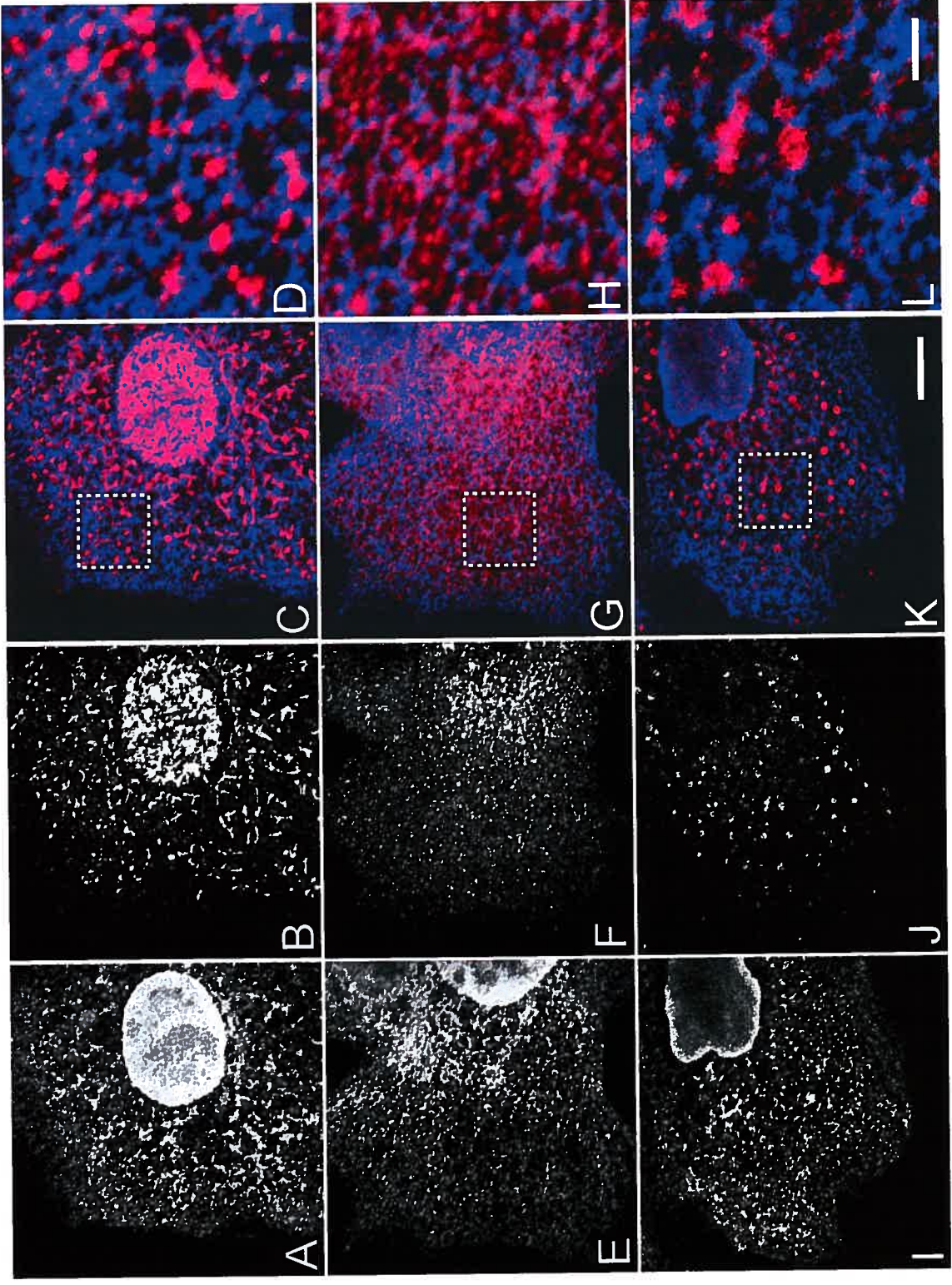


Figure 4 ER calcium stores do not regulate smooth ER-mitochondria association. MDCK cells were treated with 10 μ M thapsigargin for 20 minutes (A, B, C), with 1 mM ionomycin and 10 mM thapsigargin for 20 minutes (D, E, F), one hour (G, H, I), or for 20 minutes followed by another 20 minutes in a 10 mM calcium buffer (J, K, L). Cells were then double immunofluorescently labeled for AMF-R (A, D, G, J) and Mt-HSP70 (B, E, H, K). Merges (C, F, I, L) show the extent of AMF-R (red) and mitochondria (green) co-distribution in the cells in yellow. Scale bar: 20 μ m.

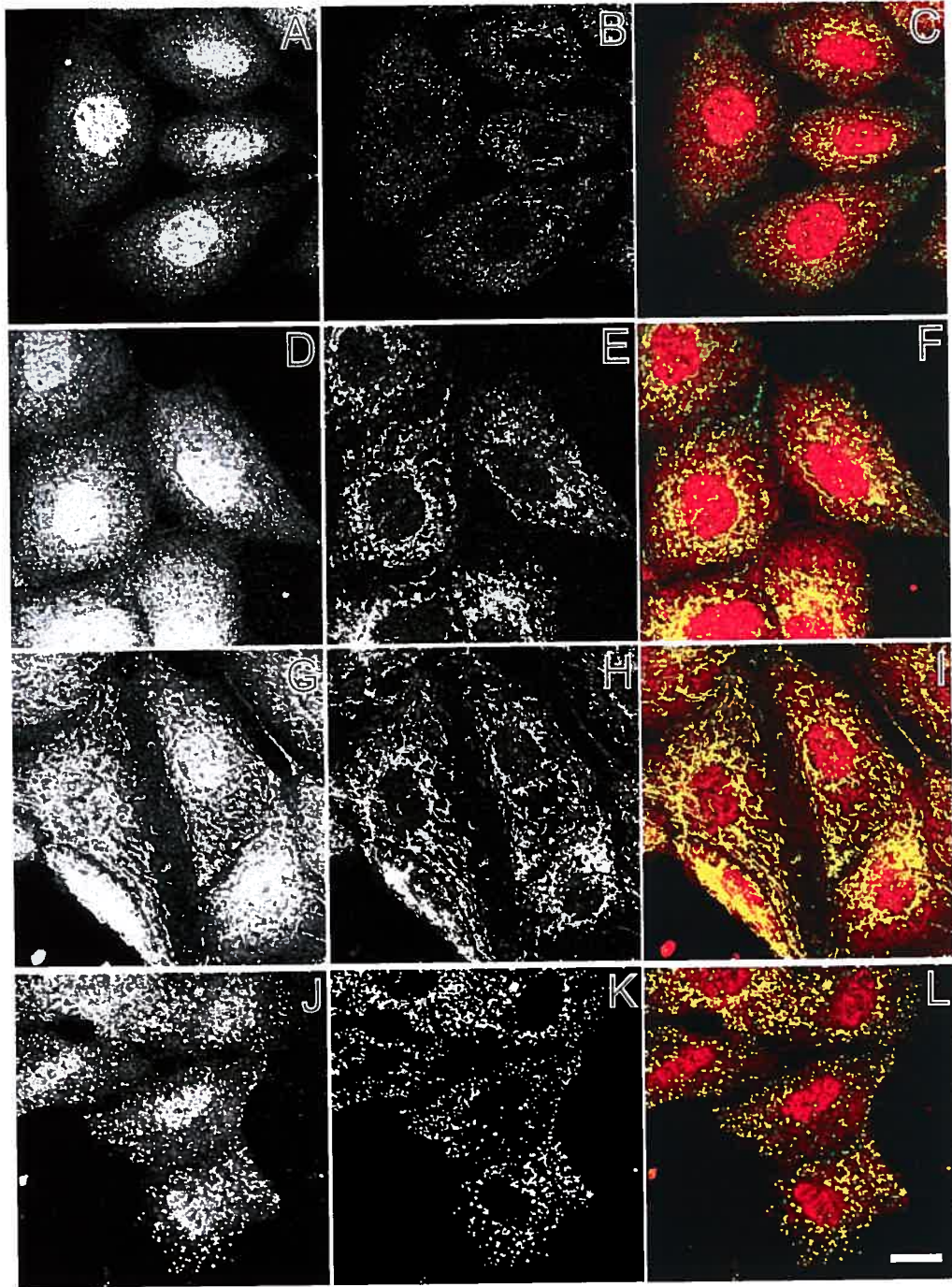
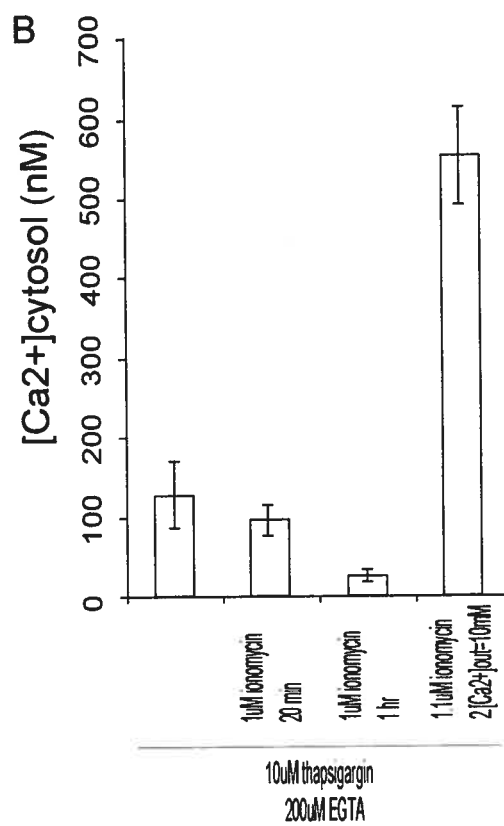
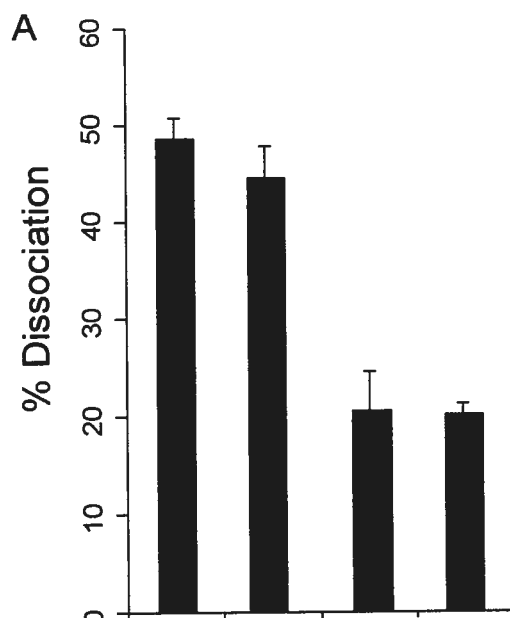


Figure 5 Smooth ER-mitochondria association is directly related to free cytosolic calcium levels independently of ER calcium stores. Quantification of the amount of the AMF-R labeling that is dissociated from mitochondria (A), and corresponding average cytosolic calcium concentration (B) under treatments with thapsigargin and ionomycin. The extent of dissociation of the AMF-R labeled smooth ER from mitochondria was quantified using a mask overlay approach for cells treated with the indicated regimes of ionomycin, thapsigargin and different extracellular calcium conditions (A). For the same conditions, the corresponding average free cytosolic calcium concentrations were determined using Fura-2-AM and ratiometric labeling (B).



References

- Accola, M.A., B. Huang, A. Al Masri, and M.A. McNiven. 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277:21829-35.
- Benlimame, N., D. Simard, and I.R. Nabi. 1995. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct membranous tubular organelle. *J Cell Biol.* 129:459-71.
- Bezprozvanny, I., J. Watras, and B.E. Ehrlich. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature.* 351:751-4.
- Collins, T.J., M.J. Berridge, P. Lipp, and M.D. Bootman. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J.* 21:1616-27.
- Csordas, G., A.P. Thomas, and G. Hajnoczky. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *Embo J.* 18:96-108.
- Dempsey, E.W. 1953. Electron Microscopy of the visceral yolk-sac epithelium of the guinea pig. *American Journal of Anatomy:*331-363.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14422-7.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260:3440-50.
- Hajnoczky, G., R. Hager, and A.P. Thomas. 1999. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺. *J Biol Chem.* 274:14157-62.

- Hirata, M., E. Suematsu, T. Hashimoto, T. Hamachi, and T. Koga. 1984. Release of Ca²⁺ from a non-mitochondrial store site in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J.* 223:229-36.
- Iino, M. 1990. Biphasic Ca²⁺ dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol.* 95:1103-22.
- Inesi, G., and Y. Sagara. 1994. Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J Membr Biol.* 141:1-6.
- Jakobs, S., N. Martini, A.C. Schauss, A. Egner, B. Westermann, and S.W. Hell. 2003. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci.* 116:2005-14.
- Jouaville, L.S., F. Ichas, E.L. Holmuhamedov, P. Camacho, and J.D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 377:438-41.
- Jouaville, L.S., P. Pinton, C. Bastianutto, G.A. Rutter, and R. Rizzuto. 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Science.* 96:13807-13812.
- Kirby, M.S., Y. Sagara, S. Gaa, G. Inesi, W.J. Lederer, and T.B. Rogers. 1992. Thapsigargin inhibits contraction and Ca²⁺ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *J Biol Chem.* 267:12545-51.
- Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277:3371-9.
- Le, P.U., and I.R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 116:1059-71.

- Liang, J.S., T. Kim, S. Fang, J. Yamaguchi, A.M. Weissman, E.A. Fisher, and H.N. Ginsberg. 2003. Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor, gp78, a ubiquitin protein ligase (E3), results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in Hep G2 cells. *J Biol Chem.* 1:1.
- Meldolesi, J., and T. Pozzan. 1998. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 23:10-4.
- Montero, M., M.T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibanez, A. Albillos, A.G. Garcia, J. Garcia-Sancho, and J. Alvarez. 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol.* 2:57-61.
- Nabi, I.R., and P.U. Le. 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 161:673-7.
- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell.* 8:1233-42.
- Papp, S., E. Dziak, M. Michalak, and M. Opas. 2003. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *J Cell Biol.* 160:475-9.
- Park, M.K., M.C. Ashby, G. Erdemli, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J.* 20:1863-74.
- Pedrosa Ribeiro, C.M., R.R. McKay, E. Hosoki, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr. 2000. Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium.* 27:175-85.

- Porter, K.R., and K. F. 1953. The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exp. Cell Research*. 4:127-141.
- Rizzuto, R., C. Bastianutto, M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1994. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*. 126:1183-94.
- Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262:744-7.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280:1763-6.
- Robb-Gaspers, L.D., P. Burnett, G.A. Rutter, R.M. Denton, R. Rizzuto, and A.P. Thomas. 1998. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *Embo J*. 17:4987-5000.
- Rutter, G.A., P. Burnett, R. Rizzuto, M. Brini, M. Murgia, T. Pozzan, J.M. Tavaré, and R.M. Denton. 1996. Subcellular imaging of intramitochondrial Ca²⁺ with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proceedings of the National Academy of Science*. 93:5489-94.
- Shiraishi, K., A. Okada, H. Shirakawa, S. Nakanishi, K. Mikoshiba, and S. Miyazaki. 1995. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca²⁺ release during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol*. 170:594-606.
- Simpson, P.B., and J.T. Russell. 1996. Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ waves in cultured oligodendrocytes. *J Biol Chem*. 271:33493-501.

- Straub, S.V., D.R. Giovannucci, and D.I. Yule. 2000. Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol.* 116:547-60.
- Subramanian, K., and T. Meyer. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell.* 89:963-71.
- Szabadkai, G., A.M. Simoni, and R. Rizzuto. 2003. Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*
- Terasaki, M., L.A. Jaffe, G.R. Hunnicutt, and J.A. Hammer, 3rd. 1996. Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using the green fluorescent protein. *Dev Biol.* 179:320-8.
- Terasaki, M., L.L. Runft, and A.R. Hand. 2001. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol Biol Cell.* 12:1103-16.
- Thastrup, O., P.J. Cullen, B.K. Drobak, M.R. Hanley, and A.P. Dawson. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2466-70.
- Tinel, H., J.M. Cancela, H. Mogami, J.V. Gerasimenko, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1999. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca²⁺ signals. *Embo J.* 18:4999-5008.
- Wang, H.J., N. Benlimame, and I. Nabi. 1997. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 110 (Pt 24):3043-53.

Wang, H.J., G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, and I.R. Nabi. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 150:1489-98.

Zimmermann, B. 2000. Control of InsP3-induced Ca²⁺ oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol.* 525 Pt 3:707-19.

4 Discussion

4.1 Résumé et discussion des résultats obtenus

4.1.1 Le RE1 marqué par l'AMF-R est spécifiquement affecté par les changements de niveau calcique cytosolique

Dans nos travaux, il apparaît que des variations du calcium cytosolique jusqu'à 600 nM affectent spécifiquement le RE1 associé aux mitochondries, et non le REr marqué par la calnexine (Chapitre 3, Figure 3). Bien que cela confirme la sensibilité du RE à l'augmentation de la concentration calcique, cela diffère des résultats d'études précédentes qui montraient une importante ré-organisation du REr suite à une augmentation de la concentration calcique à seulement 260 nM (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). Cette différence confirme la limite des indicateurs fluorescents qui ne permettent d'obtenir que des mesures de calcium approximatives, mais constituent tout de même des outils intéressants dans la mesure où ils permettent de suivre les variations du niveau calcique en réponse à un stimulus.

4.1.2 L'association RE1-mitochondries est maintenue à faible ou à forte concentration calcique dans les cellules MDCK intactes

Wang *et col.* avaient montré que de faibles concentrations calciques cytosoliques favorisaient une forte dissociation du couple RE1-mitochondrie (Wang et al., 2000) dans les cellules perméabilisées ; il en va tout autrement dans les cellules intactes (Chapitre 3,

Figure 2 et 5). Toutefois, à des concentrations calciques cytosoliques élevées (> 500 nM), le comportement de l'AMF-R vis-à-vis des mitochondries est similaire que ce soit en cellules perméabilisées ou intactes (Chapitre 3, Figure 2 et 5) : les deux organites restent proches. Cette contradiction suggère que les mécanismes favorisant l'association des deux compartiments à faible ou à haute concentration calcique soient différents. Si dans le premier cas, il peut s'agir d'une régulation physiologique, le deuxième est sûrement la conséquence de conditions pathologiques causant la fragmentation et le gonflement des mitochondries.

Enfin, un niveau calcique cytosolique autour de 100 nM induit un niveau de dissociation du REI vis-à-vis des mitochondries d'environ 50%, soit plus du double du niveau quantifié en cas d'association (Chapitre 3, Figure 2 et 5). Ce résultat est similaire au niveau obtenu en cellules perméabilisées (Wang et al., 2000).

4.1.3 Le calcium intraluminal ne semble pas impliqué dans la régulation de l'association RE-mitochondries

Les résultats obtenus montrent que le degré d'intimité RE-mitochondries dépend uniquement de la concentration calcique cytosolique, et non du niveau intraluminal. En effet, les corrélations obtenues entre la concentration calcique cytosolique et le pourcentage de dissociation n'ont pas été modifiées par la présence de la thapsigargine (Chapitre 3, Figure 2 et 5).

4.1.4 Une relation REI-mitochondries ou RER-REI-mitochondries ?

Nous trouvons intéressant de souligner qu'une élévation du calcium dans des conditions physiologiques diminue la continuité existant entre le REI de l'AMF-R d'une part et le RER et les mitochondries d'autre part (Chapitre 3, Figure 3). Alors que dans les conditions d'association AMF-R – mitochondries, on observe aussi une continuité AMF-R-calnexine. Cela porte à croire que la continuité RER-REI est requise pour l'association REI-mitochondries, c'est-à-dire que l'association REI-mitochondries nécessite la connection du domaine de l'AMF-R au réseau du RE : réseau de synthèse protéique, lipidique, et la plus importante réserve calcique de la cellule.

4.2 La régulation de l'association RE lisse/mitochondries

4.2.1 La voie de signalisation de la protéine kinase C

Selon les études de Subramanian et Meyer (1997) et Pedrosa Ribeiro *et col.* (2000), une augmentation du calcium cytosolique entraîne la restructuration du RER (Pedrosa Ribeiro et al., 2000; Subramanian and Meyer, 1997). Il est connu qu'un tel phénomène fait suite à une élévation transitoire de calcium lors d'événements comme la fertilisation (Terasaki et al., 1996). Pedrosa Ribeiro *et col.* ont de plus montré que l'activation de la protéine kinase C (PKC) par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) pouvait inhiber cet effet du calcium, que ce soit en diminuant la capacité de stockage en calcium du RE, ou l'entrée capacitative de calcium suite à la vidange des réservoirs calciques intracellulaires (Pedrosa Ribeiro et al., 2000). Ces chercheurs ont écarté cette

dernière possibilité car la thapsigargine n'induisait pas de réorganisation du RE dans leur étude. Or, dans notre cas, la thapsigargine provoque effectivement d'importants changements dans la morphologie du compartiment du REI marqué par l'AMF-R (Chapitre 3, Figure 4). Une implication de la voie de signalisation de la PKC n'est donc pas à exclure et devra être testée dans des travaux à venir.

4.2.2 Les microtubules sont-elles nécessaires à la mise en place de l'association RE lisse-mitochondries ?

Dans des cellules MDCK perméabilisées par la digitonine, des faibles concentrations calciques corrélaient avec un état dissocié mitochondries - REI (Wang et al., 2000). Or, dans les cellules MDCK intactes, les mitochondries sont fortement associées au REI à de faibles niveaux de calcium (Figure 1, A-C). Cette différence notable pourrait s'expliquer par le fait que dans les cellules perméabilisées, la digitonine ne préserve pas l'intégrité du cytosquelette, en particulier des microtubules (Wang et al., 2000), et suggère un rôle pour les microtubules dans l'association des deux organites. Rappelons que le domaine du RE marqué par l'AMF-R présente un alignement avec les microtubules du cytosquelette, et cette association est compromise lors de la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole (Benlimame et al., 1995). L'intégrité des microtubules ne semble pas être nécessaire au maintien de leur association puisque l'action de la digitonine seule ne parvient pas à séparer REI-mitochondries (Wang et al., 2000). Mais on peut penser qu'elles sont nécessaires à la mise en place de l'association. Afin de répondre à cette question, nous pourrions provoquer la dépolymérisation des microtubules à l'aide de la drogue nocodazole dans

des conditions de dissociation dans les cellules intactes par incubation avec l'ionomycine en présence de calcium extracellulaire, 1 mM, puis vérifier si la ré-association des tubules AMF-R avec les mitochondries s'en trouve empêchée en incubant les cellules avec l'ionomycine en présence d'une concentration de calcium extracellulaire de 10 mM.

4.2.3 Association RE lisse-mitochondries lors de concentrations calciques élevées et apoptose

Nous avons remarqué que, si l'ajout de l'ionomycine en présence de 10 mM calcium induisait une réassociation du REI avec les mitochondries, l'aspect des organites dans ces conditions n'était pas le même que dans les conditions de bas calcium (Chapitre 3, Figure 1 A, H). En effet, dans ces conditions, les mitochondries semblaient plus rondes, comme fragmentées (Chapitre 3, Figure 1 H). Or, une élévation importante de calcium dans le cytosol est suffisante pour induire l'apoptose (Jambrina et al., 2003), et la fission des mitochondries fait partie des événements de l'apoptose (Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2002). Par microscopie électronique également, nous avons observé un gonflement des mitochondries exposées à 10 mM de calcium extracellulaire, rappelant la morphologie des cellules en voie d'apoptose. Dans des conditions de calcium cytosolique élevé, il se pourrait donc que l'association REI-mitochondries fasse partie du processus de l'apoptose. Dans ce cas, la question du rôle joué par l'AMF-R se pose : nous pouvons émettre l'hypothèse que son apposition aux mitochondries crée une surface d'échange de calcium entre les deux organites qui retarderait la perméabilisation des mitochondries, et par conséquent l'apoptose.

4.2.4 Les concentrations calciques mesurées reflètent-elles la réalité ?

Somlyo avait montré que, dans des conditions normales, la concentration calcique mitochondriale était faible, de l'ordre de 0.5 mmol/kg de masse sèche (Somlyo et al., 1985). Il affirmait alors que les mitochondries ne jouaient pas un rôle de régulation du calcium, mais pouvaient tout au plus servir de tampon calcique dans des conditions pathologiques (Somlyo et al., 1985). Dans de récents travaux, il soutient toujours que les mesures de calcium dans les mitochondries avec les aequorines, et les indicateurs de calcium sont erronées, et avancent des valeurs trop élevées pour la concentration calcique dans les mitochondries (Ho et al., 2003).

D'un autre côté, les adeptes des mesures de calcium par les aequorines soulignent que la méthode de l'*electron probe x-ray microanalysis* (EPMA) – utilisée par Somlyo entre autres - est très limitée en terme de résolution spatiale et quantitative (Meldolesi and Pozzan, 1998).

Dans nos travaux, nous avons utilisé l'indicateur de calcium fluorescent Fura-2-AM pour nos mesures de concentrations calciques. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre, et permet de suivre l'évolution temporelle de la concentration calcique cytosolique. De plus, il semblerait que la capacité de la sonde Fura-2-AM de lier d'autres cations divalents n'influence pas significativement les mesures de calcium (Marchi et al., 2000). Bien que l'erreur relative de la concentration calcique mesurée soit importante (18 % en moyenne), l'intérêt de cette méthode réside dans le fait qu'elle permet de suivre l'évolution du ratio de fluorescence et donc la réponse des cellules aux différents traitements au cours du temps.

4.3 Les rôles potentiels du réticulum lisse marqué par l'AMF-R

4.3.1 Le réticulum endoplasmique lisse de l'AMF-R : un sous-domaine distinct sensible au calcium

Le localisation du REI marqué par l'AMF-R vis-à-vis des mitochondries en réponse aux concentrations calciques cytosoliques croissantes semble suivre une courbe en cloche (association-dissociation-association), qui rappelle l'activation de l'InsP₃R en réponse au même stimulus (Bezprozvanny et al., 1991). Il serait intéressant d'étudier si cette réponse est due à l'interaction de l'AMF-R avec d'autres protéines sensibles au calcium - éventuellement les canaux calciques activés par l'IP₃R par exemple - ou si cette sensibilité au calcium est intrinsèque à l'AMF-R par un domaine de liaison au calcium. D'autre part, la dépendance distincte au calcium cytosolique du sous-domaine lisse du RE marqué par l'AMF-R par rapport au REr marqué par la calnexine est un argument supplémentaire pour l'originalité de ce compartiment qui pourrait constituer une réserve calcique distincte du RE.

Si nous ne pouvons pas affirmer que l'AMF-R joue un rôle dans la signalisation calcique, nous pouvons tout de même émettre cette hypothèse. En premier lieu, il conviendrait de vérifier par immunofluorescence sa localisation à proximité de protéines responsables des flux calciques, notamment les pompes SERCAs. Ensuite, le canal calcique du RE fortement pressenti pour générer les signaux calciques induisant une réponse mitochondriale est l'InsP₃R (Hajnoczky et al., 1999; Rizzuto et al., 1993). En réponse à une augmentation du calcium intracellulaire après traitement par l'ionomycine, on assiste à une aggrégation de ces canaux, très ressemblante au patron de l'AMF-R dans le cas de concentration calcique autour de 600 nM (Wilson et al., 1998).

De plus, il a tout récemment été montré que l'InsP₃R était exprimé au niveau d'un domaine tubulaire du RE dans les cellules MDCK peu confluentes, et que la polarisation des cellules à plus forte confluence induisait sa relocalisation à la membrane plasmique et plus précisément au niveau des jonctions serrées (Colosetti et al., 2003). Or, l'AMF-R suit ce comportement en fonction de la confluence (données non publiées). A ce jour, nos essais de vérification de la colocalisation de l'InsP₃R avec l'AMF-R n'ont pas été concluants, mais mériteraient donc d'être poursuivis.

4.3.2 Le compartiment de l'AMF-R et le maintien de l'intégrité des mitochondries

Il a été montré que la structure du RE, des mitochondries et leur association étaient affectées par une mutation au niveau d'un récepteur responsable de la localisation des ribosomes à la membrane du RE chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Prinz et al., 2000). Cette étude suggère aussi que le RE est requis pour maintenir la structure des mitochondries et l'intégrité du réseau mitochondrial. Or, dans nos travaux, nous avons constaté que lorsque les cellules MDCK étaient soumises à des traitements prolongés affectant les tubules marqués par l'AMF-R, les mitochondries étaient aussi affectées, et le marquage de la protéine HSP70 mitochondriale finissait par disparaître (données non-montrées dans l'article constituant le Chapitre 3). Il semble qu'il y ait une chronologie dans ces événements. Cela laisse penser que le réseau formé par le sous-domaine lisse du RE marqué par l'AMF-R peut être impliqué dans le maintien de l'intégrité des mitochondries. Cela pourrait être relié à sa fonction de ligase de l'ubiquitine puisque chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une autre ligase de l'ubiquitine - Rsp5p, localisée à la membrane plasmique et dans des vacuoles

d'endocytose (Wang et al., 2001) - régule la morphologie des mitochondries (Fisk and Yaffe, 1999).

4.3.3 Le cycle de l'AMF-R

L'ubiquitination d'une protéine ne conduit pas qu'à sa dégradation par le protéasome. Elle peut aussi entraîner son endocytose, et éventuellement sa dégradation dans les lysosomes. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la E3 Rsp5p joue un rôle dans l'endocytose (Dunn and Hicke, 2001). Également, l'endocytose de protéines membranaires vers les corps multi-vésiculaires (ou MVBs, *Multi-Vesicular Bodies*) peut être dépendante de l'ubiquitine (Reggiori and Pelham, 2001). Or l'AMF-R – qui est une ligase de l'ubiquitine - est endocyté vers les MVBs (Le et al., 2000), mais il n'est pas connu si cela est dépendant de son domaine RING, de sa fonction d'ubiquitination ou même de son auto-ubiquitination.

D'autre part, une protéine peut être dégradée ou endocytée en fonction du nombre de protéines d'ubiquitine qui lui sont liées (Hicke, 2001). Lorsque l'AMF-R est internalisé, cela peut être dû à une ubiquitination mineure qui le localiserait au niveau du REI où il pourrait jouer le rôle de E3 pour d'autres protéines (ou d'autres rôles). Puis, il se pourrait que son degré d'ubiquitination augmente avec le nombre de cycles de transport de la membrane plasmique au REI qu'il effectue et aboutirait finalement à sa dégradation.

4.3.4 Les tubules AMF-R comme porte de sortie du ERAD ?

Le sous-domaine du RE caractérisé par l'AMF-R est distinct du RER caractérisé par la calnexine (Wang et al., 2000). Également, l'AMF-R résiste à un traitement

prolongé par la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, ce qui montre qu'il est un constituant stable de ces tubules (Benlimame et al., 1995). Récemment, une nouvelle fonction de l'AMF-R a été identifiée: il s'agit d'une ligase de l'ubiquitine (*Ubiquitin ligase*) de type E3 (Fang et al., 2001), facilitant la dégradation de plusieurs protéines, dont elle-même (Fang et al., 2001; Liang et al., 2003). Cette fonction soulève la question de son rôle, et de celui du domaine du RE auquel il est confiné, dans le système de dégradation associé au RE ou ERAD (*ER-Associated Degradation*). Compte-tenu de sa localisation en continuité du RER (Wang et al., 1997), le domaine de l'AMF-R pourrait évidemment être une porte de sortie du RE pour les protéines mal synthétisées vers la dégradation par le protéasome.

Alors se pose la question du lien qui existe entre ces deux fonctions de l'AMF-R : son activité dans la métastase et son rôle dans la dégradation des protéines. Rappelons que dans le cas de certains cancers, le caractère motile et métastatique induit par une augmentation de l'expression de l'AMF-R s'accompagne d'une diminution de l'expression de la protéine cadhérine-E (Otto et al., 1994; Simard and Nabi, 1996). La cadhérine-E est une des composantes caractéristiques des jonctions adhérentes dépendantes du calcium (Nagafuchi et al., 1987). Sa dégradation corrèle avec une diminution de l'adhérence, une augmentation de la motilité cellulaire et de la malignité tumorale (Behrens et al., 1991). Il se pourrait alors que la cadhérine-E soit un substrat de l'AMF-R en tant que ligase de l'ubiquitine, mais cela reste à être démontré.

4.3.5 L'AMF-R : un inhibiteur de l'apoptose ?

On pensait au préalable que les IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) remplissaient leur fonction en inhibant directement les caspases (Deveraux et al., 1998; Deveraux et al.,

1997; Hawkins et al., 1999; Wang et al., 1999b). Récemment, un nouveau mode d'action de ces molécules a été découvert : en effet, cIAP1 et cIAP2 sont des ligases de l'ubiquitine de type E3 entraînant la dégradation de Smac – un acteur de l'apoptose en amont des caspases - suite à sa liaison via leur domaine RING (Hu and Yang, 2003). Certains IAPs seraient donc des ligases de l'ubiquitine et empêcheraient l'apoptose par dégradation des effecteurs de l'apoptose, plutôt qu'en inhibant les caspases.

L'AMF-R lui-même possède un domain *RING finger*, et est une E3. Il se pourrait que l'AMF-R soit un inhibiteur de l'apoptose : ce qui ne serait en tout cas pas en contradiction ni avec son rôle dans la malignité des tumeurs, ni avec le fait que les cellules NIH-3T3 qui surexpriment son ligand, l'AMF, sont résistantes à l'apoptose (Tsutsumi et al., 2003).

4.4 Le domaine de l'AMF-R et les MAMs

Le terme MAM désignant cette fraction du réticulum isolée en association avec les mitochondries (Vance, 1990), on peut raisonnablement s'interroger sur le lien qui existe entre elle et le sous-domaine du réticulum lisse enrichi en AMF-R.

4.4.1 MAM et ubiquitination

L'ubiquitination d'une protéine joue de multiples rôle dans la cellule (Hicke, 2001). Par exemple, en voulant déterminer quel produit de gène était responsable du transport de la phosphatidylsérine entre les MAMs et les mitochondries, le gène MET30 a été identifié (Schumacher et al., 2002). Or Met30 code pour une sous-unité de reconnaissance du substrat du complexe de liaison à l'ubiquitine SCF (*suppressor of kinetochore protein 1, cullin, F-box*) (Deshaies, 1999). Une protéine jouant un rôle dans

l'ubiquitination est donc impliquée dans le transfert de la PS vers les mitochondries. L'AMF-R lui-même étant une ligase de l'ubiquitine (Fang et al., 2001), il se pourrait qu'il interagisse avec la protéine encodée par MET30 – et donc avec les MAMs - pour faciliter ce transfert.

4.4.2 MAM et signalisation calcique

A ce jour, la seule preuve qui relie les MAMs à la signalisation calcique est que le calcium du RE contrôle l'activité de la PS synthase (Wu and Voelker, 2002). Mais il serait intéressant d'explorer la possibilité que les MAMs soient des sous-domaines du RE impliqués dans l'optimisation de la signalisation calcique vers les mitochondries.

4.4.3 L'AMF-R et la phosphatidylcholine

Lors de la purification de l'AMF, Liotta *et col.* ont étudié les mécanismes de chimiotactismes de l'AMF et notamment son effet sur le métabolisme des lipides (Liotta et al., 1986). L'exposition des cellules A2058 à l'AMF entraîna une plus grande motilité des cellules, ainsi qu'une augmentation de la production de phosphatidylcholine par méthylation de la phosphatidyléthanolamine. Or cette transformation a lieu au niveau des MAMs (Cui et al., 1993). Il existe donc un lien entre l'activité des MAMs et l'exposition à l'AMF, faisant possiblement intervenir son internalisation et donc l'AMF-R.

5 Conclusion

Ce travail a permis de mieux définir le comportement singulier du domaine du REI marqué par l'AMF-R en ce qui concerne son intégrité et son association aux mitochondries en fonction du calcium cellulaire.

Tout d'abord ce travail montre que le comportement de dissociation du REI et des mitochondries suit une courbe en cloche, dont le maximum se situerait autour de 100nM. Le comportement de l'AMF-R dans les conditions de concentration calcique élevée confirme les résultats obtenus précédemment dans les cellules perméabilisées. D'autre part, à l'aide de la drogue thapsigargine, nous avons montré que le comportement d'association du couple mitochondries-REI était indépendant du niveau calcique intraluménal. Enfin, il semblerait que l'état de dissociation des deux organites corrèle avec une perte de la continuité REI-REr.

Cependant ces résultats soulèvent aussi de nombreuses questions, notamment concernant le rôle de l'AMF-R même dans cette association et les voies de signalisation impliquées dans ces phénomènes.

6 Bibliographie

- Achleitner, G., B. Gaigg, A. Krasser, E. Kainersdorfer, S.D. Kohlwein, A. Perktold, G. Zellnig, and G. Daum. 1999. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem.* 264:545-53.
- Adachi, T., W.W. Schamel, K.M. Kim, T. Watanabe, B. Becker, P.J. Nielsen, and M. Reth. 1996. The specificity of association of the IgD molecule with the accessory proteins BAP31/BAP29 lies in the IgD transmembrane sequence. *Embo J.* 15:1534-41.
- Alberts, B. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York. 1463 pp.
- al-Habori, M. 1995. Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 27:123-32.
- Almond, J.B., and G.M. Cohen. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 16:433-43.
- Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171.
- Alvarez, J., and M. Montero. 2002. Measuring [Ca(2+)] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium.* 32:251-60.
- Annaert, W.G., B. Becker, U. Kistner, M. Reth, and R. Jahn. 1997. Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31. *J Cell Biol.* 139:1397-410.

- Ardail, D., I. Popa, J. Bodennec, P. Louisot, D. Schmitt, and J. Portoukalian. 2003. The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. *Biochem J.* 371:1013-9.
- Aridor, M., S.I. Bannykh, T. Rowe, and W.E. Balch. 1995. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol.* 131:875-93.
- Arrigo, A.P., K. Tanaka, A.L. Goldberg, and W.J. Welch. 1988. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature.* 331:192-4.
- Ball, E.H., and S.J. Singer. 1982. Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:123-6.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, and W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.* 135:19-35.
- Bastianutto, C., E. Clementi, F. Codazzi, P. Podini, F. De Giorgi, R. Rizzuto, J. Meldolesi, and T. Pozzan. 1995. Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol.* 130:847-55.
- Baumann, O., and B. Walz. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 205:149-214.

- Behrens, J., K.M. Weidner, U.H. Frixen, J.H. Schipper, M. Sachs, N. Arakaki, Y. Daikuhara, and W. Birchmeier. 1991. The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *Exs.* 59:109-26.
- Benlimame, N., D. Simard, and I.R. Nabi. 1995. Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct membranous tubular organelle. *J Cell Biol.* 129:459-71.
- Bergeron, J.J., A. Zapun, W.J. Ou, R. Hemming, F. Parlati, P.H. Cameron, and D.Y. Thomas. 1998. The role of the lectin calnexin in conformation independent binding to N-linked glycoproteins and quality control. *Adv Exp Med Biol.* 435:105-16.
- Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* 499:291-306.
- Bezprozvanny, I., J. Watras, and B.E. Ehrlich. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature.* 351:751-4.
- Breckenridge, D.G., M. Stojanovic, R.C. Marcellus, and G.C. Shore. 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 160:1115-27.
- Camacho, P., and J.D. Lechleiter. 1995. Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves. *Cell.* 82:765-71.
- Chen, S.R., P. Leong, J.P. Imredy, C. Bartlett, L. Zhang, and D.H. MacLennan. 1997. Single-channel properties of the recombinant skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Biophys J.* 73:1904-12.

- Chin, D.J., K.L. Luskey, R.G. Anderson, J.R. Faust, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1982. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:1185-9.
- Cole, N.B., C.L. Smith, N. Sciaky, M. Terasaki, M. Edidin, and J. Lippincott-Schwartz. 1996. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*. 273:797-801.
- Colosetti, P., R.E. Tunwell, C. Cruttwell, J.P. Arsanto, J.P. Mauger, and D. Cassio. 2003. The type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is concentrated at the tight junction level in polarized MDCK cells. *J Cell Sci*. 116:2791-803.
- Csordas, G., and G. Hajnoczky. 2001. Sorting of calcium signals at the junctions of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 29:249-62.
- Csordas, G., A.P. Thomas, and G. Hajnoczky. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *Embo J*. 18:96-108.
- Cui, Z., J.E. Vance, M.H. Chen, D.R. Voelker, and D.E. Vance. 1993. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem*. 268:16655-63.
- Dempsey, E.W. 1953. Electron Microscopy of the visceral yolk-sac epithelium of the guinea pig. *American Journal of Anatomy*:331-363.
- Dennis, E.A., and E.P. Kennedy. 1972. Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J Lipid Res*. 13:263-7.

- Denton, R.M., and J.G. McCormack. 1980. The role of calcium in the regulation of mitochondrial metabolism. *Biochem Soc Trans.* 8:266-8.
- Denton, R.M., and J.G. McCormack. 1985. Physiological role of Ca²⁺ transport by mitochondria. *Nature.* 315:635.
- Denton, R.M., and J.G. McCormack. 1990. Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu Rev Physiol.* 52:451-66.
- Deshaies, R.J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:435-67.
- Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J.* 17:2215-23.
- Deveraux, Q.L., R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388:300-4.
- Drubin, D.G., H.D. Jones, and K.F. Wertman. 1993. Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin- binding site. *Mol Biol Cell.* 4:1277-94.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.
- Dunn, R., and L. Hicke. 2001. Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem.* 276:25974-81.

- Esparis-Ogando, A., C. Zurzolo, and E. Rodriguez-Boulan. 1994. Permeabilization of MDCK cells with cholesterol binding agents: dependence on substratum and confluency. *Am J Physiol.* 267:C166-76.
- Falquet, L., M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C.J. Sigrist, K. Hofmann, and A. Bairoch. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res:*235-238.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14422-7.
- Fawcett, D. 1981. *The Cell*, Philadelphia.
- Fisk, H.A., and M.P. Yaffe. 1999. A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 145:1199-208.
- Frank, S., B. Gaume, E.S. Bergmann-Leitner, W.W. Leitner, E.G. Robert, F. Catez, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.* 1:515-25.
- Franke, W.W., and J. Kartenbeck. 1971. Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma.* 73:35-41.
- Germain, M., and G.C. Shore. 2003. Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE.* 2003:pe10.
- Gotow, T., M. Shibata, S. Kanamori, O. Tokuno, Y. Ohsawa, N. Sato, K. Isahara, Y. Yayoi, T. Watanabe, J.F. Leterrier, M. Linden, E. Kominami, and Y. Uchiyama. 2000. Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and

- smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 7:666-74.
- Hajnoczky, G., R. Hager, and A.P. Thomas. 1999. Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca^{2+} . *J Biol Chem.* 274:14157-62.
- Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell.* 90:121-9.
- Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, and C. Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci.* 113 (Pt 4):587-96.
- Hawkins, C.J., S.L. Wang, and B.A. Hay. 1999. A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of *Drosophila* IAP1 as an inhibitor of the *Drosophila* caspase DCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2885-90.
- Hebert, D.N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1995. Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 81:425-33.
- Heggeness, M.H., M. Simon, and S.J. Singer. 1978. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:3863-6.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:195-201.
- Hirata, M., E. Suematsu, T. Hashimoto, T. Hamachi, and T. Koga. 1984. Release of Ca^{2+} from a non-mitochondrial store site in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J.* 223:229-36.

- Hirono, Y., S. Fushida, Y. Yonemura, H. Yamamoto, H. Watanabe, and A. Raz. 1996. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *Br J Cancer*. 74:2003-7.
- Ho, R., D. Fan, A.V. Somlyo, and A.P. Somlyo. 2003. Calcium content of peripheral and central mitochondria in the guinea pig myocardium: electron probe analysis. *Cell Calcium*. 33:247-56.
- Hu, S., and X. Yang. 2003. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem*. 278:10055-60.
- Iino, M. 1990. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol*. 95:1103-22.
- Ishihara, N., A. Jofuku, Y. Eura, and K. Mihara. 2003. Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1- dependent division and FZO1- dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 301:891-8.
- Jambrina, E., R. Alonso, M. Alcalde, M. del Carmen Rodriguez, A. Serrano, A.C. Martinez, J. Garcia-Sancho, and M. Izquierdo. 2003. Calcium influx through receptor-operated channel induces mitochondria- triggered paraptotic cell death. *J Biol Chem*. 278:14134-45.
- Jorgensen, A.O., A.C. Shen, D.H. MacLennan, and K.T. Tokuyasu. 1982. Ultrastructural localization of the $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol*. 92:409-16.

- Jouaville, L.S., F. Ichas, E.L. Holmuhamedov, P. Camacho, and J.D. Lechleiter. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*. 377:438-41.
- Jouaville, L.S., P. Pinton, C. Bastianutto, G.A. Rutter, and R. Rizzuto. 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13807-12.
- Kaasik, A., V. Veksler, E. Boehm, M. Novotova, and R. Ventura-Clapier. 2003. From energy store to energy flux: a study in creatine kinase-deficient fast skeletal muscle. *Faseb J*. 17:708-10.
- Kaftan, E.J., B.E. Ehrlich, and J. Watras. 1997. Inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) and calcium interact to increase the dynamic range of InsP3 receptor-dependent calcium signaling. *J Gen Physiol*. 110:529-38.
- Kappeler, F., D.R. Klopfenstein, M. Foguet, J.P. Paccaud, and H.P. Hauri. 1997. The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem*. 272:31801-8.
- Karbowski, M., Y.J. Lee, B. Gaume, S.Y. Jeong, S. Frank, A. Nechushtan, A. Santel, M. Fuller, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol*. 159:931-8.
- Kawanishi, K., Y. Doki, H. Shiozaki, M. Yano, M. Inoue, N. Fukuchi, T. Utsunomiya, H. Watanabe, and M. Monden. 2000. Correlation between loss of E-cadherin expression and overexpression of autocrine motility factor receptor in

- association with progression of human gastric cancers. *Am J Clin Pathol.* 113:266-74.
- Kennedy, H.J., A.E. Pouli, E.K. Ainscow, L.S. Jouaville, R. Rizzuto, and G.A. Rutter. 1999. Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem.* 274:13281-91.
- Korman, H.J., J.O. Peabody, J.C. Cerny, R.N. Farah, J. Yao, and A. Raz. 1996. Autocrine motility factor receptor as a possible urine marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 155:347-9.
- Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton, and J.C. Reed. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53:4701-14.
- Le, P.U., N. Benlimame, A. Lagana, A. Raz, and I.R. Nabi. 2000. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *J Cell Sci.* 113:3227-40.
- Le, P.U., G. Guay, Y. Altschuler, and I.R. Nabi. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277:3371-9.
- Le, P.U., and I.R. Nabi. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 116:1059-71.

- Lee, C., and L.B. Chen. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*. 54:37-46.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. 13:4343-54.
- Lewis, J.A., and J.R. Tata. 1973. A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 13:447-59.
- Liang, J.S., T. Kim, S. Fang, J. Yamaguchi, A.M. Weissman, E.A. Fisher, and H.N. Ginsberg. 2003. Overexpression of the tumor autocrine motility factor receptor, gp78, a ubiquitin protein ligase (E3), results in increased ubiquitinylation and decreased secretion of apolipoprotein B100 in Hep G2 cells. *J Biol Chem*. 1:1.
- Liotta, L.A., R. Mandler, G. Murano, D.A. Katz, R.K. Gordon, P.K. Chiang, and E. Schiffmann. 1986. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:3302-6.
- Liu, C., and T.E. Hermann. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*. 253:5892-4.
- Liu, W.C., D.S. Slusarchyk, G. Astle, W.H. Trejo, W.E. Brown, and E. Meyers. 1978. Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*. 31:815-9.
- Marchi, B., B. Burlando, I. Panfoli, and A. Viarengo. 2000. Interference of heavy metal cations with fluorescent Ca²⁺ probes does not affect Ca²⁺ measurements in living cells. *Cell Calcium*. 28:225-31.

- Margolis, R.N., R.R. Cardell, and R.T. Curnow. 1979. Association of glycogen synthase phosphatase and phosphorylase phosphatase activities with membranes of hepatic smooth endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 83:348-56.
- Martin, V., R. Bredoux, E. Corvazier, R. Van Gorp, T. Kovacs, P. Gelebart, and J. Enouf. 2002. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem.* 277:24442-52.
- Martone, M.E., Y. Zhang, V.M. Simpliciano, B.O. Carragher, and M.H. Ellisman. 1993. Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci.* 13:4636-46.
- Martz, D., R.J. Lasek, S.T. Brady, and R.D. Allen. 1984. Mitochondrial motility in axons: membranous organelles may interact with the force generating system through multiple surface binding sites. *Cell Motil.* 4:89-101.
- Maruyama, K., H. Watanabe, H. Shiozaki, T. Takayama, J. Gofuku, H. Yano, M. Inoue, S. Tamura, A. Raz, and M. Monden. 1995. Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 64:316-21.
- Matlack, K.E., W. Mothes, and T.A. Rapoport. 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell.* 92:381-90.
- Mattenberger, Y., D.I. James, and J.C. Martinou. 2003. Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538:53-9.

- Mayer, B., and R. Oberbauer. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci.* 18:89-94.
- Meldolesi, J., and T. Pozzan. 1998. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* 23:10-4.
- Missiaen, L., H. De Smedt, G. Droogmans, and R. Casteels. 1992. Ca²⁺ release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca²⁺ in permeabilized cells. *Nature.* 357:599-602.
- Missiaen, L., C.W. Taylor, and M.J. Berridge. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature.* 352:241-4.
- Montero, M., J. Alvarez, W.J. Scheenen, R. Rizzuto, J. Meldolesi, and T. Pozzan. 1997. Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum: coexistence of high and low [Ca²⁺] subcompartments in intact HeLa cells. *J Cell Biol.* 139:601-11.
- Montisano, D.F., J. Cascarano, C.B. Pickett, and T.W. James. 1982. Association between mitochondria and rough endoplasmic reticulum in rat liver. *Anat Rec.* 203:441-50.
- Morre, D.J., W.D. Merritt, and C.A. Lembi. 1971. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma.* 73:43-9.
- Mosser, J., C.O. Sarde, S. Vicaire, J.R. Yates, and J.L. Mandel. 1994. A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics.* 22:469-71.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1990. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res.* 50:409-14.

- Nabi, I.R., H. Watanabe, and A. Raz. 1992. Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 11:5-20.
- Nabi, I.R., H. Watanabe, S. Silletti, and A. Raz. 1991. Tumor cell autocrine motility factor receptor. *Exs.* 59:163-77.
- Nagafuchi, A., Y. Shirayoshi, K. Okazaki, K. Yasuda, and M. Takeichi. 1987. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature.* 329:341-3.
- Nagai, Y., O. Ishikawa, Y. Miyachi, and H. Watanabe. 1996. Expression of autocrine motility factor receptor in cutaneous malignant melanoma. *Dermatology.* 192:8-11.
- Nakada, K., K. Inoue, T. Ono, K. Isobe, A. Ogura, Y.I. Goto, I. Nonaka, and J.I. Hayashi. 2001. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med.* 7:934-40.
- Newmeyer, D.D., and S. Ferguson-Miller. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 112:481-90.
- Ng, F.W., M. Nguyen, T. Kwan, P.E. Branton, D.W. Nicholson, J.A. Cromlish, and G.C. Shore. 1997. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 139:327-38.
- Nguyen, M., D.G. Breckenridge, A. Ducret, and G.C. Shore. 2000. Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* 20:6731-40.

- Niinaka, Y., A. Haga, A. Negishi, H. Yoshimasu, A. Raz, and T. Amagasa. 2002. Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 38:49-55.
- Niinaka, Y., S. Paku, A. Haga, H. Watanabe, and A. Raz. 1998. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res.* 58:2667-74.
- Ohta, Y., H. Minato, Y. Tanaka, T. Go, M. Oda, and Y. Watanabe. 2000. Autocrine motility factor receptor expression associates with tumor progression in thymoma. *Int J Oncol.* 17:259-64.
- Ono, T., K. Isobe, K. Nakada, and J.I. Hayashi. 2001. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet.* 28:272-5.
- Opas, M., E. Dziak, L. Fliegel, and M. Michalak. 1991. Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. *J Cell Physiol.* 149:160-71.
- Otsuga, D., B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol.* 143:333-49.
- Otto, T., A. Bex, U. Schmidt, A. Raz, and H. Rubben. 1997. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol.* 150:1919-23.
- Otto, T., W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rubben, and A. Raz. 1994. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor

- expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res.* 54:3120-3.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 189:347-58.
- Papp, S., E. Dziak, M. Michalak, and M. Opas. 2003. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *J Cell Biol.* 160:475-9.
- Park, M.K., M.C. Ashby, G. Erdemli, O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2001. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *Embo J.* 20:1863-74.
- Park, M.K., O.H. Petersen, and A.V. Tepikin. 2000. The endoplasmic reticulum as one continuous Ca(2+) pool: visualization of rapid Ca(2+) movements and equilibration. *Embo J.* 19:5729-39.
- Patel, S., S.K. Joseph, and A.P. Thomas. 1999. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 25:247-64.
- Pathak, R.K., K.L. Luskey, and R.G. Anderson. 1986. Biogenesis of the crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells: evidence that newly formed endoplasmic reticulum emerges from the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 102:2158-68.
- Patkar, S.A., U. Rasmussen, and B. Diamant. 1979. On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from *Thapsia garganica* L. *Agents Actions.* 9:53-7.
- Pedrosa Ribeiro, C.M., R.R. McKay, E. Hosoki, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr. 2000. Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on

- endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium*. 27:175-85.
- Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman, and T. Frey. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*. 119:260-72.
- Pitts, K.R., Y. Yoon, E.W. Krueger, and M.A. McNiven. 1999. The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 10:4403-17.
- Pojoga, L.H., and R.H. Hilderman. 2003. A theoretical and experimental approach to the use of single wavelength calcium indicators. *J Theor Biol*. 221:543-57.
- Ponting, C.P. 2000. Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem J*. 351 Pt 2:527-35.
- Porter, K.R., and K. F. 1953. The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. *Exp. Cell Research*. 4:127-141.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*. 74:595-636.
- Prinz, W.A., L. Grzyb, M. Veenhuis, J.A. Kahana, P.A. Silver, and T.A. Rapoport. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 150:461-74.
- Putney, J.W., Jr., and R.R. McKay. 1999. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. 21:38-46.

- Rapizzi, E., P. Pinton, G. Szabadkai, M.R. Wieckowski, G. Vandecasteele, G. Baird, R.A. Tuft, K.E. Fogarty, and R. Rizzuto. 2002. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol.* 159:613-24.
- Rapoport, T.A., B. Jungnickel, and U. Kutay. 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem.* 65:271-303.
- Reggiori, F., and H.R. Pelham. 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J.* 20:5176-86.
- Rizzuto, R., C. Bastianutto, M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1994. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol.* 126:1183-94.
- Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 262:744-7.
- Santel, A., and M.T. Fuller. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114:867-74.
- Schumacher, M.M., J.Y. Choi, and D.R. Voelker. 2002. Phosphatidylserine transport to the mitochondria is regulated by ubiquitination. *J Biol Chem.* 277:51033-42.
- Shaw, J.M., and J. Nunnari. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12:178-84.

- Shiao, Y.J., B. Balcerzak, and J.E. Vance. 1998. A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. *Biochem J.* 331:217-23.
- Shiao, Y.J., and J.E. Vance. 1995. Evidence for an ethanolamine cycle: differential recycling of the ethanolamine moiety of phosphatidylethanolamine derived from phosphatidylserine and ethanolamine. *Biochem J.* 310:673-9.
- Shimizu, K., M. Tani, H. Watanabe, Y. Nagamachi, Y. Niinaka, T. Shiroishi, S. Ohwada, A. Raz, and J. Yokota. 1999. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett.* 456:295-300.
- Shore, G.C., and J.R. Tata. 1977. Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J Cell Biol.* 72:714-25.
- Silletti, S., H. Watanabe, V. Hogan, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res.* 51:3507-11.
- Simard, D., and I.R. Nabi. 1996. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 219:122-7.
- Smirnova, E., D.L. Shurland, S.N. Ryazantsev, and A.M. van der Blik. 1998. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol.* 143:351-8.

- Soltys, B.J., and R.S. Gupta. 1992. Interrelationships of endoplasmic reticulum, mitochondria, intermediate filaments, and microtubules--a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem Cell Biol.* 70:1174-86.
- Somlyo, A.P., M. Bond, and A.V. Somlyo. 1985. Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. *Nature.* 314:622-5.
- Spacek, J., and K.M. Harris. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci.* 17:190-203.
- Stendahl, O., K.H. Krause, J. Krischer, P. Jerstrom, J.M. Theler, R.A. Clark, J.L. Carpentier, and D.P. Lew. 1994. Redistribution of intracellular Ca²⁺ stores during phagocytosis in human neutrophils. *Science.* 265:1439-41.
- Straub, S.V., D.R. Giovannucci, and D.I. Yule. 2000. Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol.* 116:547-60.
- Subramanian, K., and T. Meyer. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell.* 89:963-71.
- Susin, S.A., N. Zamzami, M. Castedo, E. Daugas, H.G. Wang, S. Geley, F. Fassy, J.C. Reed, and G. Kroemer. 1997. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide- induced apoptosis. *J Exp Med.* 186:25-37.
- Szabadkai, G., A.M. Simoni, and R. Rizzuto. 2003. Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*

- Takanami, I., K. Takeuchi, H. Watanabe, T. Yanagawa, K. Takagishi, and A. Raz. 2001. Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 95:384-7.
- Takei, K., G.A. Mignery, E. Mugnaini, T.C. Sudhof, and P. De Camilli. 1994. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*. 12:327-42.
- Takei, K., H. Stukenbrok, A. Metcalf, G.A. Mignery, T.C. Sudhof, P. Volpe, and P. De Camilli. 1992. Ca²⁺ stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP₃ receptor, Ca(2+)-ATPase, and calsequestrin. *J Neurosci*. 12:489-505.
- Takizawa, P.A., J.K. Yucel, B. Veit, D.J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, and V. Malhotra. 1993. Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone. *Cell*. 73:1079-90.
- Taniguchi, K., Y. Yonemura, N. Nojima, Y. Hirono, S. Fushida, T. Fujimura, K. Miwa, Y. Endo, H. Yamamoto, and H. Watanabe. 1998. The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer*. 82:2112-22.
- Terasaki, M., L.A. Jaffe, G.R. Hunnicutt, and J.A. Hammer, 3rd. 1996. Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using the green fluorescent protein. *Dev Biol*. 179:320-8.

- Thastrup, O., P.J. Cullen, B.K. Drobak, M.R. Hanley, and A.P. Dawson. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:2466-70.
- Tinel, H., J.M. Cancela, H. Mogami, J.V. Gerasimenko, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, and O.H. Petersen. 1999. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca^{2+} signals. *Embo J*. 18:4999-5008.
- Trembleau, A., and F.E. Bloom. 1996. Spatial segregation of G alpha s mRNA and vasopressin mRNA to distinct domains of the rough endoplasmic reticulum within secretory neurons of the rat hypothalamus. *Mol Cell Neurosci*. 7:17-28.
- Truscott, K.N., K. Brandner, and N. Pfanner. 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*. 13:R326-37.
- Tsutsumi, S., V. Hogan, I.R. Nabi, and A. Raz. 2003. Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Res*. 63:242-9.
- Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 265:7248-56.
- Vance, J.E., and D.E. Vance. 1988. Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *J Biol Chem*. 263:5898-909.
- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a

- mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43-53.
- Voelker, D.R. 2003. New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res*. 44:441-9.
- Voronina, S., T. Sukhomlin, P.R. Johnson, G. Erdemli, O.H. Petersen, and A. Tepikin. 2002. Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol*. 539:41-52.
- Wang, G., J.M. McCaffery, B. Wendland, S. Dupre, R. Haguenaer-Tsapis, and J.M. Huibregtse. 2001. Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol Cell Biol*. 21:3564-75.
- Wang, H.J., N. Benlimame, and I. Nabi. 1997. The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 110:3043-53.
- Wang, H.J., G. Guay, L. Pogan, R. Sauve, and I.R. Nabi. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 150:1489-98.
- Wang, S.L., C.J. Hawkins, S.J. Yoo, H.A. Muller, and B.A. Hay. 1999b. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell*. 98:453-63.
- Watanabe, H., P. Carmi, V. Hogan, T. Raz, S. Silletti, I.R. Nabi, and A. Raz. 1991. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem*. 266:13442-8.

- Watanabe, H., T. Shinozaki, A. Raz, and M. Chigira. 1993. Expression of autocrine motility factor receptor in serum- and protein- independent fibrosarcoma cells: implications for autonomy in tumor-cell motility and metastasis. *Int J Cancer*. 53:689-95.
- Watanabe, H., K. Takehana, M. Date, T. Shinozaki, and A. Raz. 1996. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res*. 56:2960-3.
- Wilson, B.S., J.R. Pfeiffer, A.J. Smith, J.M. Oliver, J.A. Oberdorf, and R.J. Wojcikiewicz. 1998. Calcium-dependent clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Mol Biol Cell*. 9:1465-78.
- Wu, W.I., and D.R. Voelker. 2002. Biochemistry and genetics of interorganelle aminoglycerophospholipid transport. *Semin Cell Dev Biol*. 13:185-95.
- Yaffe, M.P., D. Harata, F. Verde, M. Eddison, T. Toda, and P. Nurse. 1996. Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:11664-8.
- Yang, Y., and X. Yu. 2003. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *Faseb J*. 17:790-9.
- Zimmermann, B. 2000. Control of InsP₃-induced Ca²⁺ oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria. *J Physiol*. 525 Pt 3:707-19.

