



**HAL**  
open science

# Métabolisme énergétique mitochondrial dans les neuropathies héréditaires associées aux mutations des gènes OPA1 et MFN2

Virginie Guillet

► **To cite this version:**

Virginie Guillet. Métabolisme énergétique mitochondrial dans les neuropathies héréditaires associées aux mutations des gènes OPA1 et MFN2. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00459846

**HAL Id: tel-00459846**

**<https://theses.hal.science/tel-00459846>**

Submitted on 25 Feb 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE D'ANGERS**

**ANNEE 2009**

**N° d'ordre : 976**

**METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL DANS  
LES NEUROPATHIES HEREDITAIRES ASSOCIEES AUX  
MUTATIONS DES GENES *OPA1* ET *MFN2***

**THESE DE DOCTORAT**

Spécialité : Biochimie

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE / SANTE**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 30 septembre**

**à : ANGERS**

**par : Virginie GUILLET**

**Devant le jury ci-dessous :**

**M. Pierre RUSTIN** (Président), Directeur de Recherche, INSERM U676

**M. Rodrigue ROSSIGNOL** (Rapporteur), Chargé de Recherche, INSERM U688

**M. Franck STURTZ** (Rapporteur), Professeur, Université de Limoges

**M. Dominique BONNEAU** (Examineur), Professeur, Université d'Angers

**M. Yves MALTHIERY** (Examineur), Professeur, Université d'Angers

**Directeur de thèse: M. Pascal REYNIER**, Professeur, Université d'Angers

**Nom et coordonnées du Laboratoire :**

INSERM U694, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, CHU,  
4 rue Larrey, 49033 ANGERS cedex 01

**ED 502**

Je tiens à remercier *Messieurs Rodrigue Rossignol et Franck Sturtz* pour avoir accepté de participer à ce jury et de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteur.

Je souhaite remercier *Monsieur Pierre Rustin* pour avoir accepté de prendre part au jury en tant qu'examineur. Recevez ici toute ma gratitude pour l'attention que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse malgré vos nombreuses charges.

J'adresse mes sincères remerciements à *Monsieur Dominique Bonneau* pour avoir accepté le rôle d'examineur de cette thèse, pour l'intérêt porté à ce travail et pour son soutien au cours des trois dernières années.

Je remercie *Monsieur Yves Malthiery* pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie *Monsieur Jean-Claude Martinou* pour la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de travailler sur le modèle murin de CMT2A construit au sein de son laboratoire.

Je remercie particulièrement *Monsieur Pascal Reynier* qui m'a accueillie au sein de son équipe de recherche et a encadré ces années de recherche. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée en me confiant ce projet de thèse, pour ta disponibilité malgré tes nombreuses charges de travail, pour m'avoir tant appris sur la mitochondrie, pour tes conseils et ta sympathie. Depuis le début de ma formation scientifique, tu m'as donné le goût de la recherche, encouragée et soutenue dans mes projets. Ces années de travail furent vraiment très enrichissantes.

Il me tient à cœur de remercier *Mademoiselle Naïg Gueguen* et *Monsieur Arnaud Chevrollier*. Vous avez pris une place très importante dans ma formation scientifique en me faisant partager vos connaissances techniques et théoriques. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous m'avez consacré en corrections, conseils et discussions ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble. Naïg, merci pour les « oxy aux flambeaux », ton enthousiasme à chaque étape de cette thèse et ta « zen attitude » pendant les moments les plus stressants ont été pour moi un réel soutien. Arnaud, merci de ta patience et de toute l'aide que tu m'as apportée, notamment pour l'écriture des articles. Ton humour et ta bonne humeur ont rendu ces trois années beaucoup plus agréables.

Je remercie *Mesdames Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Loiseau* et *Marie-Anne Pou* ainsi que *Messieurs Christophe Verny, Vincent Procaccio* et *Franck Letournel* qui ont chacun à leur manière participé à la réussite de ce travail. Merci pour votre soutien et vos encouragements et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail de thèse.

Je remercie également :

*Romain Cartoni* pour sa sympathie ainsi que pour le temps passé à la production des souris et à l'organisation de leur transport de Genève à Angers.

*Jocelyne Hodbert* pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et transmise ses connaissances dans ce domaine. Merci pour votre aide précieuse et vos encouragements au cours de ces trois années. Je vous souhaite une excellente retraite. Votre place de confidente dans le « confessionnal » de culture cellulaire manquera énormément à tous les étudiants.

*Céline Wetterwald*. Toujours volontaire pour m'apporter ton aide, notamment pendant les longues séries de complexes où les tubes n'en finissaient pas de défiler, tu as également égayé ces trois années par ta bonne humeur et ta gentillesse.

*Marc Ferre, Valérie Desquret, Julien Cassereau* et *Claire Prouteau* pour leur soutien, leurs précieux coups de pouces et leur sympathie ainsi que *Soazig Le Pennec* alias « *Bouzinette* » pour ces moments où tu m'as tant fait rire. Courage, bientôt ce sera ton tour.

Je tiens également à remercier tous les (ex-)membres du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire d'Angers et de l'unité Inserm U694, *Caroline, Chadi, Delphine, Frédérique, Gilles, Gyasi, Jean-Fred, Julien, Jihane, Julie, Laetitia, Matthieu, Mélissa, Mireille et Nathalie ainsi que Anne, Aurélie, Axelle, Carole, Cécile, Cédric, Christelle, Christine, Corinne, Dominique, Isabelle, Jennifer, Lydie, Mélanie et Philippe* qui ont chacun contribué à créer un environnement accueillant et chaleureux.

Merci à « *Marguerite* » pour ses performances et sa sensibilité qui m'ont rendu l'oxygraphie plus facile.

Enfin, je voudrais remercier chaleureusement *Guillaume, Maman, Mamy, Grand-Maman, Grand-Papa, Valérie, Pierre, Manu, Mumu, Flo, Cécile, Arthur, Eugénie, Alice, Basile, Félix et toute la famille ainsi que Mel, Nono, Piaupiau, Galou et tous mes amis* pour m'avoir sorti le tête de ma thèse quand il le fallait et pour vos encouragements et votre soutien quotidien.

*A Papa,*

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »*

Henri Poincaré

# ABBREVIATIONS



## ABREVIATIONS

- ADNc, mt** : acide désoxyribonucléique complémentaire, mitochondrial
- ADP** : adénosine 5'-diphosphate
- ANT** : translocase des nucléotides adényliques / adenine nucleotide translocase
- ADOA, ADOAC** : atrophie optique autosomique dominante, atrophie optique autosomique dominante et cataracte
- ARN** : acide ribonucléique
- ARP** : acidic ribosomal phosphoprotein
- ATP** : adénosine 5'-triphosphate
- cATR** : carboxyatractyloside
- CMT2A** : Charcot-Marie-Tooth type 2A
- COX** : cytochrome *c* oxydase
- CS** : citrate synthase
- Cyt c** : Cytochrome *c*
- DMEM** : Dulbecco's modified Eagles medium
- dNTP** : déoxynucléotides triphosphates
- DO** : densité optique
- DTNB** : 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
- DZX** : diazoxide
- EDTA** : acide éthylène diaminetétracétique
- EGTA** : acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétracétique
- FADH<sub>2</sub>** : flavine adénine dinucléotide hydrogénée
- FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone
- GTP** : guanosine triphosphate
- HK** : hexokinase
- Kir** : inward rectifier potassium
- LHON** : neuropathie optique héréditaire de Leber
- MFN1, 2** : mitofusine 1 et 2
- mK<sub>ATP</sub>** : canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP
- NADH** : nicotinamide-adénine dinucléotide hydrogéné
- OPA1, 3** : optic atrophy 1 et 3
- OXPHOS** : phosphorylations oxydatives

**pb** : paires de bases  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis  
**ROS** : espèces réactives de l'oxygène  
**RT** : reverse transcription  
**RT-PCR** : real time - polymerase chain reaction  
**SDH** : succinate deshydrogénase  
**SDS** : sodium-dodecyl-sulfate  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**SUR** : récepteur des sulfonylurées  
**SUR** : succinate ubiquinone réductase  
**TEMED** : tetramethylethylenediamine  
**TMPD** : N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine  
**TNB** : trinitrobenzène  
**TPMP** : triphenyl-methyl-phosphonium  
**Tris** : tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
**UCP** : uncoupling protein  
**VDAC** : voltage-dependant anion channel  
 $\Delta\psi$  : potentiel de membrane  
**5HD** : 5 hydroxydécanoate

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>1</b>
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>5</b>
<b>I. LES MITOCHONDRIES</b> .....	<b>6</b>
A. Origine et historique.....	6
B. Structure .....	7
<b>II. LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE CHEZ LE MAMMIFERE</b> .....	<b>8</b>
A. La fission mitochondriale .....	8
1. La machinerie de fission mitochondriale .....	8
a. Drp1.....	8
b. Fis1.....	9
c. GDAP1 .....	9
2. Mécanisme moléculaire de la fission .....	10
a. Recrutement des protéines de fission aux futurs sites de fission.....	10
b. Mécanisme de Fission.....	10
3. Régulation de la fission mitochondriale.....	11
a. Phosphorylation de Drp1.....	11
b. Ubiquitination de Drp1 .....	12
c. Sumoylation de Drp1.....	12
B. La fusion mitochondriale .....	13
1. La machinerie de fusion mitochondriale .....	13
a. Les mitofusines 1 et 2.....	13
b. OPA1 .....	14
2. Mécanisme moléculaire de la fusion.....	15
3. Régulation de la fusion mitochondriale .....	16
a. Régulation des mitofusines.....	16
b. Régulation de OPA1 .....	18
c. Régulation par modification de l'environnement lipidique .....	19
C. Relation structure - fonction énergétique mitochondriale .....	19
D. Le transport mitochondrial.....	20
<b>III. MITOCHONDRIES ET NEURODEGENERESCENCE</b> .....	<b>22</b>
A. Pathologies de la dynamique mitochondriale .....	22
1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT).....	23
a. Aspects cliniques et classification .....	23
b. Génétique moléculaire de la CMT2A .....	25
c. Physiopathologie de la CMT2A .....	25
2. L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA).....	28

a.	Aspects cliniques .....	29
b.	Génétique moléculaire de l'ADOA.....	30
c.	Physiopathologie de l'ADOA.....	31
B.	Neuropathies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial .....	33
1.	Le génome mitochondrial .....	33
2.	La neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON).....	34
a.	Aspects Cliniques.....	34
b.	Génétique moléculaire de la LHON .....	35
c.	Physiopathologie de la LHON .....	35
<b>IV.</b>	<b>LA FONCTION ENERGETIQUE MITOCHONDRIALE .....</b>	<b>36</b>
A.	Les phosphorylations oxydatives .....	36
1.	Fonctionnement .....	36
2.	Composition .....	37
a.	La chaîne respiratoire mitochondriale .....	37
b.	Le complexe de phosphorylation : l'ATP synthase.....	39
c.	Les supercomplexes mitochondriaux.....	41
d.	Le canal potassium mitochondrial sensible à l'ATP .....	43
B.	Régulation des phosphorylations oxydatives.....	45
1.	Contrôle de la respiration mitochondriale.....	45
2.	Régulation du rendement des phosphorylations oxydatives .....	46
a.	Le découplage extrinsèque .....	46
b.	Le découplage intrinsèque.....	49
c.	Nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire .....	49
<b>V.</b>	<b>PROBLEMATIQUE DE LA THESE.....</b>	<b>50</b>
	<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>52</b>
<b>I.</b>	<b>ADOA ET METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL.....</b>	<b>53</b>
A.	Introduction .....	53
B.	Article n°1.....	56
C.	Article n°2.....	62
D.	Résultats .....	93
E.	Discussion .....	96
<b>II.</b>	<b>CMT2A ET METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL .....</b>	<b>104</b>
A.	Introduction .....	104
B.	Article n°3.....	107
C.	Article n°4.....	120
D.	Résultats .....	151
E.	Discussion .....	152
	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>163</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>170</b>

## FICHES TECHNIQUES ..... 207

Fiche n°1 :	Culture primaire de fibroblastes cutanés .....	208
Fiche n°2 :	Dosage des protéines par spectrophotométrie .....	209
Fiche n°3 :	Mesure de la respiration cellulaire sur fibroblastes non perméabilisés par oxygraphie.....	210
Fiche n°4 :	Mesure de la respiration cellulaire sur fibroblastes perméabilisés.....	213
Fiche n°5 :	Mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP de fibroblastes : détermination du rapport ATP/O .....	215
Fiche n°6 :	Détermination de la quantité d'ANT fonctionnel par oxygraphie : titration au carboxyatractyloside .....	219
Fiche n°7 :	Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase sur fibroblastes .....	221
Fiche n°8 :	Dosage de l'activité Succinate Ubiquinone Réductase sur fibroblastes .....	224
Fiche n°9 :	Dosage de l'activité Succinate Déshydrogénase sur fibroblastes.....	227
Fiche n°10 :	Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome <i>c</i> Réductase sur fibroblastes .....	229
Fiche n°11 :	Dosage de l'activité Cytochrome <i>c</i> Oxydase sur fibroblastes .....	232
Fiche n°12 :	Dosage de l'activité F1-ATPase sur fibroblastes.....	235
Fiche n°13 :	Dosage de l'activité Citrate synthase sur fibroblastes .....	238
Fiche n°14 :	Dosage de l'activité Aconitase sur fibroblastes .....	240
Fiche n°15 :	Dosage de l'activité Fumarase sur fibroblastes .....	242
Fiche n°16 :	Extraction d'ARN de fibroblastes.....	244
Fiche n°17 :	Transcription inverse d'ARN de fibroblastes .....	246
Fiche n°18 :	RT PCR quantitative.....	247
Fiche n°19 :	Isolement de mitochondries de fibroblastes .....	249
Fiche n°20 :	Western blot .....	251
Fiche n°21 :	Isolement de mitochondries de cerveau de souris.....	255
Fiche n°22 :	Oxygraphie sur mitochondries isolées .....	257
Fiche n°23 :	Mesure de la Synthèse d'ATP de mitochondries isolées par spectrophotométrie ..	260
Fiche n°24 :	Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante sur mitochondries isolées.....	262
Fiche n°25 :	Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase sur mitochondries isolées .....	265
Fiche n°26 :	Dosage de l'activité Succinate ubiquinone reductase sur mitochondries isolées ....	267
Fiche n°27 :	Dosage de l'activité Succinate déshydrogénase sur mitochondries isolées.....	269
Fiche n°28 :	Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome <i>c</i> réductase sur mitochondries isolées .....	271
Fiche n°29 :	Dosage de l'activité Cytochrome <i>c</i> Oxydase sur mitochondries isolées .....	273
Fiche n°30 :	Dosage de l'activité F1-ATPase sur mitochondries isolées.....	275
Fiche n°31 :	Dosage de l'activité Citrate synthase sur mitochondries isolées .....	277
Fiche n°32 :	Dosage de l'activité Aconitase sur mitochondries isolées.....	279
Fiche n°33 :	Dosage de l'activité Fumarase sur mitochondries isolées.....	281
Fiche n°34 :	Estimation de l'activité du $mK_{ATP}$ par mesure du gonflement mitochondrial.....	283

## AUTRES PUBLICATIONS ..... 286

LISTE  
DES FIGURES

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Modélisation de l'architecture mitochondriale.....verso page 6
- Figure 2.** Morphologie du réseau mitochondrial.....verso page 7
- Figure 3.** La machinerie de fission mitochondriale.....verso page 8
- Figure 4.** Mécanisme moléculaire de la fission – fusion mitochondriale.....verso page 9
- Figure 5.** Régulation de la fission mitochondriale par modification de Drp1...verso page 10
- Figure 6.** La machinerie de fusion mitochondriale.....verso page 12
- Figure 7.** Régulation de OPA1 par clivage protéolytique.....verso page 17
- Figure 8.** Structure du réseau mitochondrial de cellules HeLa  $\rho^0$  .....verso page 19
- Figure 9.** Organisation du transport axonal mitochondrial.....verso page 20
- Figure 10.** Aspects cliniques de la maladie de Charcot-Marie-Tooth.....verso page 22
- Figure 11.** Classification des formes de CMT.....verso page 23
- Figure 12.** Distribution des mutations pathogènes du gène MFN2.....verso page 24
- Figure 13.** Structure de la rétine et des cellules ganglionnaires de la rétine.....verso page 27
- Figure 14.** Photographies d'exams du fond d'œil.....verso page 28
- Figure 15.** Distribution des mutations pathogènes du gène OPA1.....verso page 30
- Figure 16.** Le génome mitochondrial Humain.....verso page 32
- Figure 17.** Les phosphorylations oxydatives.....verso page 35
- Figure 18.** Potentiels d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire .....verso page 36
- Figure 19.** Structure du complexe II.....verso page 37
- Figure 20.** Structure cristallographique du supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1</sub>.....verso page 40
- Figure 21.** Représentation hypothétique de la structure du canal potassium mitochondrial sensible à l'ATP ( $mK_{ATP}$ ).....verso page 41
- Figure 22.** Effets communs des mutations du gène *OPA1* et de l'éthambutol sur la fonction énergétique et la structure mitochondriale.....verso page 102
- Figure 23.** Schéma hypothétique de l'effet des mutations du gène *MFN2* sur le fonctionnement des phosphorylations oxydatives dans des fibroblastes de patients atteints de CMT2A.....verso page 151
- Figure 24.** Effets du diazoxide et du 5-hydroxydécanoate sur le métabolisme énergétique de mitochondries contrôles et porteuses de la mutation R94Q du gène MFN2.....verso page 156



# AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité Inserm U694 (Mitochondries: Régulations et Pathologie) dirigée par le Pr Yves Malthiery et spécialisée dans l'étude du métabolisme mitochondrial et de ses régulations dans différentes pathologies. Ma thèse a été plus spécifiquement réalisée dans le groupe animé par les Pr Pascal Reynier et Dominique Bonneau qui s'intéresse aux pathologies neurodégénératives en relation avec des anomalies de la plasticité et de la dynamique mitochondriale. Les principaux objectifs de cette équipe sont d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans cette nouvelle classe de maladies mitochondriales et de tenter d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires essentiels dans les processus de conversion énergétique. Elles possèdent leur propre génome sous la forme d'une molécule d'ADN circulaire double brin de 16.569 paires de bases. Le nombre de molécules d'ADN mitochondrial est très variable selon le type cellulaire. On estime qu'il varie de quelques centaines à plusieurs milliers par cellule. Les pathologies impliquant des défauts de la conversion énergétique mitochondriale sont nombreuses et hétérogènes puisqu'elles concernent probablement plus de 300 entités clinico-biologiques (Naviaux, 2004). Ces pathologies, dues à des mutations de l'ADN mitochondrial ou de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales, affectent principalement les organes à fort besoin énergétique comme le système nerveux, les muscles ou les organes neurosensoriels. La première description d'une maladie mitochondriale a été réalisée dans les années 60 (Luft *et al.*, 1962), les premières mutations pathogènes de l'ADNmt ont été identifiées en 1988 (Wallace *et al.*, 1988) et le premier gène nucléaire responsable de ce type de pathologie a été rapporté en 1995 (Bourgeron *et al.*, 1995). Depuis, le nombre de pathologies associées à un déficit fonctionnel de la mitochondrie n'a cessé de croître. En particulier, la description des pathologies mitochondriales en relation avec des défauts de la dynamique mitochondriale a été initiée en 2000 par la description d'une pathologie due à des mutations du gène *OPA1* (Alexander *et al.*, 2000 ; Delettre *et al.*, 2000).

Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries sont organisées en un réseau dont la morphologie et la distribution intracellulaire varient selon les tissus, les conditions métaboliques et le stade de développement (Gripovic et van der Bliek, 2001). Ce réseau présente un équilibre dynamique entre deux processus relativement indépendants au niveau fonctionnel : la fusion et la fission des mitochondries (Karbowksi et Youle, 2003). Cette dynamique détermine la longueur et le diamètre des mitochondries et ainsi leur nombre par

cellule à un instant donné. L'équilibre entre ces deux processus est finement régulé afin d'assurer le maintien des fonctions mitochondriales et cellulaires.

En marge de ces pathologies mitochondriales héréditaires, des dysfonctionnements mitochondriaux sont aussi mis en cause dans certaines maladies neurodégénératives, dans les processus prolifératifs, le diabète et l'obésité, ainsi qu'au cours du vieillissement. (Schon et Manfredi, 2003 ; Trimmer *et al.*, 2000). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de neurodégénérescence ne soient pas totalement élucidés, le contrôle de la morphologie et de la plasticité mitochondriale semble jouer un rôle central. En effet, les mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale sont principalement à l'origine de pathologies neurologiques et des anomalies de la dynamique mitochondriale ont été identifiées dans la plupart des pathologies neurodégénératives fréquentes (Wang *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2008).

Les mécanismes physiopathologiques mis en cause dans les pathologies de la dynamique mitochondriale sont encore peu connus. Compte tenu de la similarité des présentations cliniques de ces pathologies avec les maladies mitochondriales classiquement décrites, nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit énergétique pourrait être impliqué dans leur physiopathologie. Le principal objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le métabolisme énergétique mitochondrial, par différentes approches et dans différents modèles de ces pathologies, afin de tenter de répondre à la question d'une éventuelle perturbation de la conversion énergétique. Je me suis tout particulièrement intéressée à deux neuropathies liées aux mutations de gènes impliqués dans la fusion mitochondriale : *OPA1* et *MFN2*. Les mutations des gènes *OPA1* et *MFN2* sont liées respectivement à une neuropathie optique, l'atrophie optique dominante (ADOA) (Alexander *et al.*, 2000 ; Delettre *et al.*, 2000) et à une neuropathie périphérique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) (Züchner *et al.*, 2004). Grâce à une étroite collaboration avec le Centre de référence national sur les maladies neurogénétiques coordonné par le Pr Dominique Bonneau et le Dr Christophe Verny, et avec le Département de Biochimie et Génétique du CHU qui assure le diagnostic Biochimique (Dr Gilles Simard et Dr Naig Gueguen) et moléculaire (Dr Patrizia Amati-Bonneau et Dr Arnaud Chevrollier) de ces pathologies, notre équipe de recherche a constitué une banque de fibroblastes de patients atteints de différentes formes d'ADOA et de CMT2A ainsi que de sujets sains. Une collaboration avec le Pr Jean-Claude Martinou du Département de Biologie Cellulaire de l'Université de Genève nous a également permis d'accéder à un modèle murin de CMT2A développé par Romain Cartoni dans le cadre de son travail de

thèse. La caractérisation de ces modèles sur le plan métabolique nous a permis de démontrer une altération significative des mécanismes de conversion énergétique, similaire à celle observée dans les maladies mitochondriales comme la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON). Cependant, l'étude des mécanismes conduisant à ces altérations du métabolisme énergétique a révélé l'existence de mécanismes spécifiques susceptibles d'offrir de nouvelles pistes pour la compréhension de la pathogenèse de ces maladies.

DONNEES  
BIBLIOGRAPHIQUES

# **I. Les mitochondries**

## **A. Origine et historique**

Selon la théorie endosymbiotique énoncée par Margulis (1981), l'endosymbiose d'une  $\alpha$ -protéobactérie dans les cellules eucaryotes primitives serait à l'origine des mitochondries. Cette hypothèse a été suggérée grâce à la découverte de similarités biochimiques et génétiques entre les bactéries et les mitochondries et notamment grâce à des études portant sur l'ADN mitochondrial et suggérant que ce dernier dériverait du génome procaryote primitif.

Les mitochondries ont été découvertes il y a près de 150 ans lorsque Kölliker, en 1857, décrivit pour la première fois leur morphologie dans le tissu musculaire. Elles furent appelées mitochondries du grec *mitos* (filament) et *chondros* (grain) en référence à leur forme. La présence de ces organites dans toutes les cellules fut démontrée en 1890 par Altmann qui mit au point une technique de coloration des mitochondries et suggéra leur autonomie métabolique et génétique. En 1937, Krebs construisit un modèle métabolique siégeant dans la mitochondrie chez les eucaryotes. Il l'appela cycle de l'acide citrique. L'isolement de mitochondries fut réalisé pour la première fois en 1940 par Claude qui effectua un fractionnement cellulaire à partir de cellules hépatiques. Cette technique fut par la suite améliorée par Hogeboom et Schneider qui utilisèrent du sucrose isotonique ayant la propriété de préserver l'intégrité et la morphologie mitochondriale. Ceci permit d'observer la structure mitochondriale au microscope électronique et ainsi de les décrire comme un organite délimité par deux membranes, la membrane interne présentant des invaginations appelées crêtes. En 1948, Kennedy et Lehninger démontrèrent que le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ont lieu dans la mitochondrie. En 1978, Peter Mitchell obtint le prix Nobel pour sa théorie chimio-osmotique postulant que le couplage entre la chaîne d'oxydoréduction et le mécanisme de phosphorylation repose sur la formation d'un gradient de protons à travers la membrane interne servant de réservoir d'énergie pour la synthèse d'ATP. La structure génétique de l'ADN mitochondrial humain fut découverte en 1981 par Anderson et la première mutation pathogène fut identifiée par Wallace en 1988. Enfin, Boyer et Walker obtinrent le prix Nobel en 1997 pour leurs travaux sur la structure et le fonctionnement de l'ATP synthase.

## **B. Structure**

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans la plupart des cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Elles mesurent entre 0.5 et 1  $\mu\text{m}$  de diamètre et peuvent atteindre plus de 10  $\mu\text{m}$  de long. Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale (*cf.* figure 1). Les études de tomographie électronique ont révélé l'existence d'un cinquième compartiment constitué par la fermeture des crêtes mitochondriales au niveau de leur collet ainsi que la très grande variabilité de la structure interne des mitochondries en fonction de leur état métabolique (Mannella *et al.*, 2001).

La membrane externe constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme. Cette perméabilité est assurée en grande partie par la présence d'une protéine formant un canal transmembranaire : VDAC (voltage-dependent anion channel). Cette protéine permet le passage des molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Les molécules supérieures à 10 kDa, lorsqu'elles possèdent un signal d'adressage mitochondrial, sont prises en charge par les complexes d'importation TOM/TIM (translocase of the outer membrane / translocase of the inner membrane) localisés au niveau d'une zone d'accolement entre les membranes externe et interne. La membrane interne a une composition qui diffère des autres membranes biologiques avec environ 80% de protéines pour seulement 20% de phospholipides. De plus, sa composition lipidique est particulière puisqu'elle est riche en cardiolipine. Ainsi, la membrane interne est beaucoup moins perméable que la membrane externe et constitue une barrière sélective entre la matrice et l'environnement cytosolique. Le passage des molécules nécessite donc la présence de transporteurs tels que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) qui réalise l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur du phosphate inorganique (PiC), le transporteur du pyruvate, la navette glycérol 3-phosphate et la navette malate/aspartate. La membrane interne s'invagine et forme des crêtes mitochondriales qui permettent d'augmenter la surface membranaire. Elle contient la machinerie enzymatique des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) qui assure la synthèse d'ATP mitochondriale. La matrice mitochondriale contient l'ADN mitochondrial ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication et son expression. C'est également le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

La forme et le nombre de mitochondries par cellule dépendent du type cellulaire et des besoins énergétiques. De plus, au sein des cellules, les mitochondries ne sont pas isolées mais forment un réseau dynamique qui subit des phénomènes de fusion et de fission très régulés (Karbowski et Youle, 2003).

## **II. La dynamique mitochondriale chez le mammifère**

La morphologie du réseau mitochondrial dépend de l'équilibre entre les événements de fusion et de fission. Lorsque cet équilibre est déplacé vers la fission, les mitochondries adoptent un réseau fragmenté alors que lorsqu'il est déplacé vers la fusion, le réseau devient réticulé et filamenteux (*cf.* figure 2). Les mécanismes régulant la morphologie mitochondriale ne sont pas totalement élucidés, néanmoins plusieurs protéines jouant un rôle clé dans cette dynamique ont été identifiées.

### **A. La fission mitochondriale**

#### **1. La machinerie de fission mitochondriale**

Chez les mammifères, les principaux composants connus de la machinerie de fission mitochondriale sont les protéines Drp1 (dynamamin related protein 1) (Smirnova *et al.*, 2001), Fis 1 (James *et al.*, 2003) et GDAP1 (Niemann *et al.*, 2005).

##### **a. Drp1**

La protéine Drp1 est codée par le gène nucléaire DNML1 (dynamamin like 1) localisé en 12p11.21. C'est une protéine de 736 acides aminés appartenant à la famille des dynamines. Elle possède un domaine GTPase C-terminal, un domaine central et un domaine GTPase effecteur (GED) qui régule l'hydrolyse du GTP (*cf.* figure 3). Le rôle de Drp1 dans la fission mitochondriale a été mis en évidence grâce à l'inhibition de son expression par siRNA ou par expression d'un mutant dominant négatif montrant une augmentation de la longueur des tubules mitochondriaux et une réticulation du réseau (Smirnova *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2004). Drp1 est localisée dans le cytoplasme mais peut être relocalisée à la membrane mitochondriale externe au niveau de futurs sites de fission (Smirnova *et al.*, 2001). Cette protéine n'a pas de séquence d'adressage mitochondriale. L'interaction moléculaire entre



Drp1 et Fis1, mise en évidence par Yoon *et al.* en 2003, suggère que Drp1 puisse être recrutée au niveau de la membrane externe via Fis1.

### ***b. Fis1***

Fis1 est une petite protéine de 152 acides aminés codée par le gène FIS localisé en 7q22.1. Elle contient un domaine transmembranaire C-terminal ancré dans la membrane mitochondriale externe et un domaine N-terminal exposé vers le cytoplasme. Ce dernier est constitué de six hélices  $\alpha$  antiparallèles incluant deux domaines tetratricopeptides (TPR) et constituant un potentiel site d'interaction avec Drp1 (*cf.* figure 3). La surexpression de Fis1 induit une fragmentation mitochondriale dépendante de Drp1. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif de Drp1 inhibe la fragmentation médiée par la surexpression de Fis1 (James *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 2003).

### ***c. GDAP1***

La protéine GDAP1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1) est une protéine de 358 acides aminés codée par le gène *GDAP1* (8q21.11). Cette protéine est localisée à la membrane externe mitochondriale. Son nom vient du fait qu'elle a été trouvée surexprimée dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris (Neuro2a) dans des conditions de différenciation cholinergique induite par les gangliosides (Liu *et al.*, 1999b). Cette protéine contient deux domaines orientés vers le cytosol caractéristiques des protéines de la famille glutathion S-transférase ou GST (domaines GST-N et GST-C). Cependant, aucune activité glutathion S-transférase n'a été mise en évidence (Pedrola *et al.*, 2005). Du côté C-terminal, GDAP1 possède un domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane mitochondriale externe. Elle possède également un autre domaine hydrophobe (HD1) localisé dans le cytoplasme. Entre ces deux domaines, une séquence riche en acides aminés basiques intervient à la fois dans la localisation mitochondriale et dans la fonction de fission mitochondriale de la protéine (*cf.* figure 3) (Wagner *et al.*, 2009). GDAP1 intervient dans la fission mitochondriale. Sa surexpression induit une fragmentation du réseau mitochondrial qui peut être contrebalancée par l'expression d'un mutant dominant négatif de Drp1 ou des protéines de fusion mitofusine 1 et 2. De plus, le réseau mitochondrial apparaît tubulaire suite à l'inhibition de son expression par siRNA (Niemann *et al.*, 2005).

D'autres protéines telles que l'endophiline B1 (Karbowski *et al.*, 2004) qui appartient à une famille d'enzymes de modification des phospholipides membranaires (acide

lysophosphatidique acyltransférase) ou la protéine MTP18 (mitochondrial protein 18 kDa) (Tondera *et al.*, 2005) interviennent également dans le processus de fission des mitochondries.

## **2. Mécanisme moléculaire de la fission**

### ***a. Recrutement des protéines de fission aux futurs sites de fission***

Le mode d'action des acteurs de la fission mitochondriale reste peu connu. Par exemple, nous ignorons comment se fait le recrutement de Drp1 à la membrane mitochondriale. Fis1 semblait être un bon candidat pour expliquer la localisation mitochondriale de Drp1. Cependant, contrairement à ce qui a été montré chez la levure (Mozdy *et al.*, 2000), Fis1 ne semble pas intervenir dans le recrutement de Drp1 puisque l'inhibition de son expression par siRNA n'affecte pas la localisation mitochondriale de Drp1 (Lee *et al.*, 2004). Bien que les mécanismes de fission ne soient vraisemblablement pas exactement identiques chez la levure et le mammifère, les études réalisées chez la levure ont permis d'identifier certains éléments du mécanisme de fission. Il semblerait que des protéines adaptatrices soient nécessaires à la localisation de Drp1. En effet, Mdv1 et Caf4 sont deux adaptateurs qui interviennent dans la fixation de Fis1 à Dnm1, l'orthologue de Drp1 chez la levure (Griffin *et al.*, 2005). Il a été montré que Mdv1 peut exister soit uniformément à la surface mitochondriale soit regroupée en des zones précises correspondant aux futurs sites de fission où elle est colocalisée avec Dnm1 (Tieu et Nunnari, 2000). Le mode d'action permettant la relocalisation des protéines de fission au niveau des futurs sites de fission n'est pas élucidé.

### ***b. Mécanisme de Fission***

Drp1 est une protéine de la famille des dynamines GTPases. Ainsi, il a été proposé que cette protéine puisse agir comme une mécanoenzyme utilisant l'hydrolyse du GTP pour permettre la constriction puis la scission membranaire mitochondriale au niveau de sites de fission (*cf.* figure 4A). Son mode d'action a été suggéré par analogie avec celui des dynamines classiques qui interviennent dans la constriction et l'invagination du cou des vésicules d'endocytose clathrine-dépendante (Smirnova *et al.*, 1999) :

- la fixation du GTP induirait un changement de conformation de la protéine et son oligomérisation en anneau. L'hydrolyse du GTP permettrait ensuite de fournir l'énergie nécessaire à la constriction du cou des vésicules formées.

- la fixation du GTP induirait une oligomérisation des protéines en spirale. Suite à l'hydrolyse du GTP, la spirale adopterait une forme plus lâche étirant le cou de la vésicule ainsi libérée.

Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que Dnm1 est capable de s'auto-assembler en hydrolysant le GTP. Cet auto-assemblage forme des spirales dont le diamètre correspond à celui des sites de constriction mitochondriaux *in vivo* (Ingerman *et al.*, 2005). Le mécanisme de fission semble cependant bien plus complexe puisqu'il a été montré chez la levure que la constriction des tubules mitochondriaux était indépendante de Dnm1, suggérant l'existence d'une étape parallèle ou préalable à son action (Legesse-Miller *et al.*, 2003). De plus, chez la levure, il semblerait qu'une séparation de la matrice mitochondriale liée à un remodelage de la membrane interne survienne avant la fission de la membrane externe et de manière indépendante de Dnm1 et Fis1 (Jakobs *et al.*, 2003).

Ainsi, de nombreux points du mécanisme de fission restent à déterminer, notamment l'implication des autres acteurs de la fission. Il en est de même pour les signaux cellulaires à l'origine de ce mécanisme.

### **3. Régulation de la fission mitochondriale**

La fission mitochondriale peut répondre à de multiples événements cellulaires tels que la division cellulaire, la modification du métabolisme, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose. La plupart des signaux connus permettant de réguler la fission mitochondriale agissent par phosphorylation, ubiquitination ou sumoylation de Drp1 afin de réguler sa localisation et son activité.

#### **a. Phosphorylation de Drp1** (cf. figure 5A)

Une étude réalisée à partir de cellules de la lignée tumorale HeLa montre que la fission mitochondriale est induite au début de la mitose révélant un lien direct entre division mitochondriale et cellulaire. Cette coordination est réalisée par l'intermédiaire du couple cycline B/CDK1 (cyclin dépendant kinase 1) qui est le régulateur essentiel de l'entrée en mitose. La protéine Drp1 est phosphorylée par ce complexe au niveau du résidu sérine 585 localisé dans le domaine GED (Taguchi *et al.*, 2007). Un autre site de phosphorylation au niveau de ce même domaine a été mis en évidence (Cribbs et Strack, 2007 ; Chang et Blackstone, 2007a). Ce site, qui est un résidu sérine en position 637 chez l'homme et 656

chez le rat (Chang et Blackstone, 2007b), est la cible de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). La phosphorylation de ce site diminue l'activité GTPase et l'auto-assemblage de Drp1, provoquant une diminution de la fission. De plus, il a été montré dans les cellules HeLa qu'il n'y a pas de phosphorylation basale au niveau de ce site, indiquant qu'il n'y a pas de régulation par déphosphorylation. A l'inverse, les auteurs ont identifié un site de phosphorylation basale qui correspond au site cible du couple cycline B/CDK1 (Chang et Blackstone, 2007a).

### ***b. Ubiquitination de Drp1 (cf. figure 5B)***

La protéine MARCH5 aussi appelée MITOL est une E3-ubiquitine ligase mitochondriale localisée à la membrane externe. Cette protéine est responsable de l'ubiquitination de Drp1 et de Fis1 et interagit avec leurs formes ubiquitinylées (Nakamura *et al.*, 2006 ; Yonashiro *et al.*, 2006 ; Karbowski *et al.*, 2005). MARCH5 intervient dans la régulation de la dynamique mitochondriale. En effet, il a été montré que la surexpression de la protéine conduit à la formation d'un réseau mitochondrial tubulaire alors que l'inhibition de son expression ou l'expression d'un mutant dépourvu d'activité ubiquitine ligase induit une fragmentation du réseau (Nakamura *et al.*, 2006 ; Yonashiro *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que l'ubiquitination de Drp1 inhibe la fission mitochondriale en entraînant la dégradation de Drp1 par le protéasome. En revanche, une étude plus récente montre que l'inhibition de l'expression de MARCH5 ou l'expression d'un mutant permet la formation d'un réseau plus allongé et interconnecté suggérant que l'ubiquitination favorise la fission par Drp1 (Karbowski *et al.*, 2005). Ces données contradictoires concernant l'effet de l'ubiquitination de Drp1 restent à clarifier. La dernière étude montre également que l'ubiquitination de Drp1 par MARCH5 intervient dans la régulation du trafic cellulaire de Drp1 et de son auto-assemblage aux sites de fission.

### ***c. Sumoylation de Drp1 (cf. figure 5C)***

La protéine Drp1 peut également être modifiée par sumoylation. En effet, il a été montré que la protéine SUMO1 (small ubiquitin modifier 1) et son enzyme de conjugaison Ubc9 (ubiquitin-conjugating enzyme 9) interagissent avec Drp1. La surexpression de SUMO1 induit une fragmentation mitochondriale. Ainsi, la sumoylation de Drp1 protège Drp1 de la dégradation, ce qui permet d'avoir un pool de protéines plus stable et actif favorisant la fission (Harder *et al.*, 2004). Il existe une protéase SUMO-spécifique appelée SENP5 qui

intervient également dans la régulation de la morphologie mitochondriale. Cette protéine empêche la sumoylation des substrats de SUMO1 et donc de Drp1. Ainsi, la surexpression de SENP5 empêche la fragmentation mitochondriale induite par SUMO1 alors que l'inhibition de son expression la favorise (Zunino *et al.*, 2007). Il a également été montré que SENP5 est indispensable à la division cellulaire (Di Bacco *et al.*, 2006 ; Di Bacco et Gill, 2006). Cette protéine serait transloquée du noyau à la mitochondrie juste avant la phase de mitose et stimulerait le cycle de sumoylation/désomoylation de Drp1, ce qui augmenterait son oligomérisation et donc la fission mitochondriale (Zunino *et al.*, 2009). Ainsi, de la même manière que la phosphorylation de Drp1 par le complexe cyclinB/CDK1, les interactions entre SUMO1, SENP5 et Drp1 permettent de coordonner division mitochondriale et cellulaire.

La sumoylation de Drp1 coordonne également la fission mitochondriale et l'intégration des signaux pro-apoptotiques. Au cours de l'apoptose, Drp1 dont la localisation fluctue entre cytoplasme et mitochondrie est stabilisée au niveau mitochondrial. Il a été montré que cette stabilisation dépend du recrutement de deux protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak à la membrane mitochondriale et que l'activation de ces protéines conduit à la sumoylation et à la stabilisation de Drp1 au niveau mitochondrial (Wasiak *et al.*, 2007).

## **B. La fusion mitochondriale**

### **1. La machinerie de fusion mitochondriale**

Chez les mammifères, la fusion mitochondriale est principalement effectuée par les protéines mitofusine 1, mitofusine 2 (Santel et Fuller, 2001) et OPA1 (optic atrophy 1) (Cipolat *et al.*, 2004).

#### **a. Les mitofusines 1 et 2**

Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) font partie de la famille des dynamines GTPases. Elles sont codées par les gènes nucléaires *MFN1* et *MFN2*, respectivement localisés en 3q25-q26 et 1p36.22. Ce sont des protéines mitochondriales ubiquitaires d'environ 750 acides aminés. Elles sont localisées à la membrane mitochondriale externe et sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal orienté vers le cytosol et de deux motifs répétés hydrophobes HR1 et HR2 (heptad repeat) qui encadrent un double segment transmembranaire nécessaire à la localisation mitochondriale de ces protéines (Santel et Fuller, 2001) (*cf.* figure 6). Les segments HR1 et HR2 forment des structures « coiled-coil » orientées vers le cytosol

et HR2 intervient dans l'attachement des mitochondries entre elles (Rojo *et al.*, 2002). Il a été montré que l'inhibition de l'expression de *MFN1* ou *MFN2* par siRNA diminue le taux de fusion et raccourcit par conséquent la longueur des mitochondries (Chen *et al.*, 2003). De plus, en l'absence des deux formes, la fusion est totalement abolie (Chen *et al.*, 2005). MFN1 et MFN2 semblent donc avoir des fonctions redondantes. Ces deux protéines peuvent se remplacer l'une et l'autre sur le plan fonctionnel puisque la fusion qui est déficiente dans des cellules dépourvues de MFN1 est restaurée par la surexpression de *MFN2* et inversement (Chen *et al.*, 2003). Cependant, certaines différences ont été mises en évidence. MFN1 est exprimée de façon ubiquitaire alors que MFN2 est plus exprimée dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Santel *et al.*, 2003). De plus, MFN1 semble avoir un rôle plus actif dans la fusion mitochondriale que MFN2. En effet, dans des fibroblastes en culture, les cellules n'exprimant pas MFN1 ont un réseau mitochondrial plus sévèrement fragmenté que celles déficientes en MFN2 (Chen *et al.*, 2005). Il a également été montré *in vitro* que MFN1 est plus efficace pour l'accrochage des membranes mitochondriales que MFN2 et que l'activité GTPase de MFN1 est huit fois supérieure à celle de MFN2 (Ishihara *et al.*, 2004).

### **b. OPA1**

La protéine OPA1 fait également partie du complexe de fusion des mitochondries. C'est une dynamine GTPase codée par le gène *OPA1*. Ce gène contient 31 exons dont 3 exons alternatifs: les exons 4, 4b et 5b, à l'origine de 8 isoformes de protéines OPA1 par épissage alternatif (Delettre *et al.*, 2001). L'isoforme majoritaire est une protéine de 960 acides aminés composée d'une séquence d'adressage mitochondriale N-terminale riche en résidus basiques, d'un domaine transmembranaire, d'une séquence à structure coiled-coil, d'un domaine GTPase, d'un motif central très conservé de type dynamine, d'un domaine d'homologie aux pleckstrines et d'un domaine GTPase effecteur (GED) en C-terminal qui régule l'hydrolyse du GTP (*cf.* figure 6).

OPA1 est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial et serait retrouvée en quantité plus importante au niveau des crêtes mitochondriales (Olichon *et al.*, 2002). Elle est ubiquitaire, mais prédominante au niveau du cerveau, des testicules, des muscles squelettiques et de la rétine (Delettre *et al.*, 2001). Les analyses de OPA1 par western blot mettent en évidence cinq bandes de 84 à 96 kDa correspondant à deux longues isoformes ancrées à la membrane interne et 3 isoformes courtes solubles (Ishihara *et al.*, 2006). Le mode d'action de OPA1 dans le complexe de fusion a d'abord été établi par analogie avec ses

orthologues chez la levure. La délétion de MGM1 (orthologue de OPA1) conduit à une fragmentation mitochondriale, à une perte de l'ADNmt et à une anomalie de structure des crêtes mitochondriales (Wong *et al.*, 2000). Aussi, il a été montré que l'inhibition de l'expression de *OPA1* par siRNA conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial par défaut de fusion (Cipolat *et al.*, 2004 ; Griparic *et al.*, 2004) et à une anomalie de structure des crêtes mitochondriales (Olichon *et al.*, 2003).

## **2. Mécanisme moléculaire de la fusion**

Les protéines MFN1 et MFN2 vont initier l'interaction des mitochondries entre elles (*cf.* figure 4B). Elles sont localisées à la membrane externe des mitochondries adjacentes et vont interagir pour former des complexes homotypiques ou hétérotypiques en *trans* (Chen *et al.*, 2005). Leur région C-terminale contient un domaine hydrophobe HR2 qui intervient dans l'attachement des mitochondries puisqu'il forme un complexe dimérique antiparallèle avec le domaine HR2 de la mitofusine localisée sur la mitochondrie adjacente. Les mitofusines sont donc directement impliquées dans le mécanisme de fusion, la structure de HR2 fournissant une surface d'interaction de 95Å nécessaire à l'accrochage des mitochondries (Koshiba *et al.*, 2004). L'interaction des mitofusines permet le rapprochement des mitochondries tout en laissant un espace entre-elles. La fusion nécessite donc un changement conformationnel de manière à créer un contact entre les membranes adjacentes. Les mécanismes ne sont pas connus mais ce changement ferait intervenir l'hydrolyse du GTP ou d'autres protéines.

La fusion mitochondriale implique une coordination de la fusion des membranes externes et internes. Bien que les mitofusines soient majoritairement situées du côté cytosolique, une courte boucle est localisée dans l'espace inter-membranaire. Il a été montré dans des cellules COS7 et chez la levure que cette boucle de la protéine MFN2 et de son orthologue Fzo1, permet la formation de sites de contacts étroits entre la membrane externe et interne et a un rôle régulateur important pour la fusion mitochondriale (Fritz *et al.*, 2001 ; Neuspiel *et al.*, 2005). De plus, une interaction physique entre les protéines MFN1, MFN2 et OPA1 a été montrée par co-immunoprécipitation (Guillery *et al.*, 2008). Cependant, malgré les similitudes fonctionnelles entre MFN1 et MFN2, la fonction de fusion de OPA1 dépend de la présence de MFN1 mais est indépendante de MFN2 (Cipolat *et al.*, 2004). Les mécanismes régissant la fusion des membranes internes sont inconnus. Cependant, du fait de sa localisation, il est probable qu'OPA1 puisse jouer un rôle essentiel dans la fusion des membranes internes. Cette protéine intervient également dans la fusion des membranes

externes. Il a en effet été montré que l'inhibition de l'expression de *OPA1* par siRNA empêche la fusion des membranes externes (Chen *et al.*, 2005). Par homologie avec les protéines de la famille des dynamines GTPases, il a été suggéré que OPA1 puisse être impliquée dans le contrôle de la courbure ou de la tubulation de la membrane interne, ce qui expliquerait pourquoi l'inhibition de OPA1 affecte également la structure des crêtes mitochondriales (Griparic *et al.*, 2004 ; Olichon *et al.*, 2003).

Malgré cette coordination, les mécanismes de fusion des membranes externes et des membranes internes semblent être distincts. En effet, des tests de fusion réalisés *in vitro* chez la levure montrent que la fusion des membranes externes est possible en présence d'une faible concentration en GTP alors que la fusion des membranes internes nécessite une plus grande quantité de GTP et le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Meeusen *et al.*, 2004). La fusion mitochondriale est d'ailleurs perturbée par la présence d'ionophores pour les protons ou le potassium qui altèrent le potentiel de membrane (legros *et al.*, 2002 ; Ishihara *et al.*, 2003). Seule la fusion des membranes externes est possible en présence de ces ionophores (Malka *et al.*, 2005).

### **3. Régulation de la fusion mitochondriale**

Comme pour la fission, la fusion mitochondriale doit s'adapter aux événements cellulaires tels que la division cellulaire, la modification du métabolisme, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose. La plupart des signaux qui permettent de réguler la fusion mitochondriale sont des interactions protéiques, des modifications post-traductionnelles et des modifications de l'environnement lipidique. La régulation peut se faire au niveau de l'activité des mitofusines ou de OPA1.

#### **a. Régulation des mitofusines**

L'action des mitofusines peut être régulée par interaction avec les protéines de la famille Bcl-2. Au cours de l'apoptose, l'équilibre dynamique entre la fission et la fusion est perturbé, ce qui provoque une fragmentation mitochondriale (Youle et Karbowski, 2005). Deux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, les protéines Bax et Bak, interviennent dans la sumoylation et la stabilisation de Drp1 pour favoriser la fission (Wasiak *et al.*, 2007). Bax a été également retrouvée colocalisée avec MFN2 et participe à la fragmentation apoptotique des mitochondries (Karbowski *et al.*, 2002). Cependant, Bax et Bak interviennent aussi dans le processus de fusion dans des conditions non apoptotiques en régulant



l'assemblage de MFN2 en complexes supramoléculaires. En l'absence de Bax et Bak, les complexes de protéines MFN2 sont plus petits et leur localisation est modifiée passant de sites précis à une distribution uniforme à la surface des mitochondries. De plus, dans des fibroblastes embryonnaires de souris présentant un double knockout Bak/Bax, la fusion est altérée et le réseau contient des tubules mitochondriaux de courte taille (Karbowski *et al.*, 2006). En plus du rôle de ces deux protéines pro-apoptotiques dans la fusion mitochondriale, il a été montré que deux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-2, interviennent également dans la fusion mitochondriale par interaction physique avec MFN2 (Delivani *et al.*, 2006).

D'autres protéines peuvent interagir avec les mitofusines pour réguler la fusion mitochondriale. Récemment, trois partenaires des mitofusines ont été identifiés : MIB, Stoml2 et MARCH5. MIB est une protéine de la superfamille des déshydrogénases réductases à chaîne moyenne qui possède un domaine de liaison au coenzyme capable de fixer et hydrolyser les nucléotides. Cette protéine, localisée dans le cytosol, peut s'associer à la mitochondrie et interagir avec MFN1 et MFN2 (Eura *et al.*, 2006). La surexpression de MIB induit une fragmentation mitochondriale alors que son inhibition conduit à une élongation des tubules mitochondriaux. MIB, par son association avec les mitofusines, agit en inhibant la fusion. Il a été suggéré que le domaine de fixation aux nucléotides de MIB soit capable de reconnaître les complexes mitofusine-GTP pour empêcher l'hydrolyse du GTP et la fusion jusqu'à ce que le complexe de fusion soit assemblé (Eura *et al.*, 2006). Stoml2 est une protéine stomatin-like attachée à la membrane interne et localisée dans l'espace intermembranaire où elle s'associe à MFN2. L'inhibition de son expression entraîne une diminution du potentiel de membrane mitochondrial mais n'altère pas la morphologie mitochondriale de façon majeure (Hajek *et al.*, 2007). Cette protéine présente un domaine prohibitin-like. Chez la levure, les prohibitines sont des protéines chaperonnes qui permettent l'assemblage et l'insertion membranaire des protéines codées par le génome mitochondrial. Il est donc possible que Stoml2 puisse être une protéine chaperonne pour MFN2. MARCH5 est une E3-ubiquitine ligase mitochondriale de la membrane mitochondriale externe, responsable de l'ubiquitination de Drp1 et Fis1. Cependant, il a été montré que cette protéine interagit également avec MFN2 (Nakamura *et al.*, 2006). MARCH5 semble donc avoir un rôle crucial dans la régulation de la morphologie mitochondriale en agissant à la fois sur des protéines de fission et de fusion mitochondriale.

La régulation de la fusion peut également avoir lieu au niveau transcriptionnel. Il a été montré que l'expression du gène *MFN2* est sous la dépendance de facteurs de transcription et de coactivateurs transcriptionnels impliqués dans la biogenèse mitochondriale. En effet, PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  induisent l'expression du gène *MFN2* en co-activant le facteur de transcription ERR $\alpha$  et en se fixant sur la séquence promotrice de *MFN2* (Cartoni *et al.*, 2005 ; Soriano *et al.*, 2006 ; Liesa *et al.*, 2008). Ces voies de régulation transcriptionnelle sont donc impliquées non seulement dans la biogenèse mais également dans la fusion mitochondriale.

### **b. Régulation de OPA1**

La diversité de distribution et de fonction des isoformes OPA1 suggère une régulation importante de l'activité de ces protéines. Cette régulation se fait principalement par clivage protéolytique. Après import de la protéine OPA1 à la mitochondrie, la séquence d'adressage mitochondriale N-terminale est clivée par une peptidase (*cf.* figure 7A) (Olichon *et al.*, 2002). OPA1 se trouve alors sous une isoforme longue (L, long) ancrée à la membrane interne. Dans les conditions physiologiques, la moitié des isoformes L contenant les exons 4 et 5b et toutes les isoformes L contenant l'exon 4b sont clivées en isoformes courtes (S, short) de manière à éliminer le domaine transmembranaire et les exons 4b et 5b (*cf.* figure 7B). Cette seconde coupure se fait au niveau de l'exon 5, ou bien lorsqu'ils sont présents, au niveau des exons 4b et 5b donnant ainsi un profil à 5 bandes lors de l'analyse de OPA1 par western blot (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007 ; Olichon *et al.*, 2007a). La présence d'isoformes L et S est nécessaire à la fusion puisque lorsqu'elles sont séparées, chacune présente une faible activité de fusion (Song *et al.*, 2007). Aussi, dans les cellules apoptotiques ou présentant un défaut énergétique, un troisième clivage des isoformes longues peut avoir lieu et conduire à une fragmentation mitochondriale (*cf.* figure 7C) (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). La nature des protéases impliquées dans ces deux derniers clivages reste discutée. Cependant, il a été montré que la métalloprotéase AAA matricielle AFG3L2 est responsable du clivage au niveau de l'exon 5 dans les conditions physiologiques ou de stress (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Ce clivage peut être renforcé par une seconde métalloprotéase AAA matricielle, la paraplegine, qui présente cependant une plus faible activité que AFG3L2 (Ishihara *et al.*, 2006). Ces protéases ATP-dépendantes sont activées en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et de dissipation du potentiel de membrane (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2007 ; Griparic *et al.*, 2007) mais sont inhibées par un taux élevé d'ATP (Baricault *et al.*, 2007). YME1L, une troisième métalloprotéase AAA orientée vers l'espace inter-membranaire,

contribue aux clivages des exons 4b et 5b dans les conditions physiologiques (Song *et al.*, 2007 ; Griparic *et al.*, 2007 ; Guillery *et al.*, 2008). Ces trois métalloprotéases sont régulées par les métaux, le fer étant activateur tandis que le zinc est inhibiteur (Baricault *et al.*, 2007). Une quatrième protéase, la rhomboïde sérine protéase PARL (presenilin-associated rhomboid-like) localisée à la membrane interne permet la libération d'une forme soluble de OPA1 dans l'espace inter-membranaire ayant une fonction anti-apoptotique (Cipolat *et al.*, 2006).

### **c. Régulation par modification de l'environnement lipidique**

La composition lipidique des membranes mitochondriales influence les mécanismes de fission-fusion. En effet, certains lipides tels que l'acide phosphatidique sont particulièrement fusogènes. Un membre de la famille des phospholipases D localisé à la mitochondrie a été identifié (Choi *et al.*, 2006). Cette protéine appelée MitoPLD est nécessaire à la fusion mitochondriale. C'est une lipase qui catalyse la synthèse d'acide phosphatidique à partir des cardiolipines des membranes mitochondriales. Cependant, alors que la majorité des cardiolipines se trouvent au niveau de la membrane interne, le site catalytique de MitoPLD est localisé du côté cytosolique de la membrane externe. La fusion a donc probablement lieu au niveau des sites de contact entre membrane externe et interne ou l'échange lipidique entre les deux membranes est favorisé.

## **C. Relation structure – fonction énergétique mitochondriale**

Depuis quelques années, les premiers éléments concernant le rapport entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale ont été mis en évidence.

Les modifications du fonctionnement des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) ont des répercussions sur l'architecture mitochondriale. Par exemple, la morphologie mitochondriale subit des modifications en fonction des substrats énergétiques fournis aux cellules (Rossignol *et al.*, 2004). L'inhibition de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, la modification du potentiel de membrane mitochondrial et la présence de mutations affectant le fonctionnement des OXPHOS influencent également la structure du réseau (Koopman *et al.*, 2005; Benard *et al.*, 2007). La relation structure – fonction mitochondriale a été mise en évidence pour la première fois grâce aux travaux de Hackenbrock montrant que la mitochondrie passe d'une configuration « orthodoxe » ou relâchée à une forme condensée, suite à l'activation de la production d'ATP par l'ajout d'ADP (Hackenbrock, 1981). Depuis, de nombreux travaux ont permis de clarifier ce lien. Le

réseau mitochondrial des cellules de la lignée 143B dépourvues d'ADN mitochondrial (lignées  $\rho^0$ ) est fragmenté (Gilkerson *et al.*, 2000). C'est également le cas des cellules HeLa  $\rho^0$  (cf. figure 8). Des modifications du potentiel de membrane mitochondrial ont également été corrélées à une fragmentation du réseau aussi bien lorsqu'il est diminué (Ishihara *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2002; Benard *et al.*, 2007) qu'augmenté en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase (De Vos *et al.*, 2005). L'inhibition chimique de l'activité des complexes I, III et V est également responsable de la fragmentation du réseau (De Vos *et al.*, 2005; Benard *et al.*, 2007).

Les seconds éléments viennent des analyses bioénergétiques associées aux modifications de l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes de fission-fusion. L'inhibition de l'expression de *MFN2* dans des cellules musculaires de la lignée L6E9 diminue l'oxydation du glucose, le potentiel de membrane mitochondrial et l'expression des complexes I, II et III et V (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005). L'inhibition de l'expression du gène *OPA1* dans des cellules HeLa conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial et à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003). De plus, l'inhibition de l'expression de Drp1 dans les cellules HeLa diminue la respiration endogène des cellules et la synthèse d'ATP (Benard *et al.*, 2007). De manière intéressante, il a été montré que la fusion mitochondriale nécessite la maintien du potentiel de membrane mitochondrial (legros *et al.*, 2002 ; Ishihara *et al.*, 2003).

Toutes ces données suggèrent que la relation entre la structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale est une relation bidirectionnelle.

#### **D. Le transport mitochondrial** (cf. figure 9)

La mobilité mitochondriale est indissociable des phénomènes de fission-fusion. Le transport mitochondrial permet de répartir le réseau mitochondrial au niveau des sites subcellulaires les plus demandeurs en ATP. Il joue un rôle très important dans les cellules hautement polarisées telles que les neurones.

Dans les neurones, deux principaux types de transport ont été décrits. Le transport antérograde s'effectue du corps cellulaire vers les terminaisons axonales tandis que le transport rétrograde s'effectue dans le sens inverse. La migration des mitochondries semble dépendante de leur fonction énergétique puisqu'il a été montré que les mitochondries dépolarisées sont surtout transportées dans le sens rétrograde alors que celles dont le potentiel de membrane est maintenu sont transportées dans le sens antérograde (Miller et Sheetz, 2004).

Ainsi, le transport antérograde interviendrait dans l'apport des mitochondries à leur site d'action tandis que le transport rétrograde permettrait la dégradation et le recyclage des organites au niveau du corps cellulaire.

Le transport des mitochondries fait intervenir l'architecture du cytosquelette et plus particulièrement les microtubules. Deux grandes familles de protéines motrices, les kinésines et les dynéines, forment de petits moteurs moléculaires qui tractent les mitochondries le long des microtubules. Les kinésines sont classiquement décrites comme étant impliquées dans le transport antérograde alors que les dynéines interviendraient dans le transport rétrograde. Cependant, il semble y avoir une interdépendance entre ces protéines et entre les deux types de transport (Ligon *et al.*, 2004). Les kinésines et dynéines sont capables d'hydrolyser l'ATP pour permettre leur déplacement le long des microtubules. Deux membres de la famille des kinésines, KIF1B (Nangaku *et al.*, 1994) et KIF5B (Tanaka *et al.*, 1998), ont été plus particulièrement impliqués dans le transport des mitochondries. L'interaction des mitochondries avec les protéines motrices se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. La syntabuline est associée à la membrane mitochondriale externe par son extrémité carboxy-terminale et permet l'accrochage des mitochondries à KIF5B. L'inhibition de l'expression de la syntabuline ou de son interaction avec KIF5B affecte le transport mitochondrial antérograde mais n'a pas d'effet sur le transport rétrograde (Cai *et al.*, 2005). La protéine KBP (Kinesin binding protein) a également été impliquée dans le transport mitochondrial antérograde par son interaction avec la kinésine KIF1B $\alpha$  (Wozniak *et al.*, 2005). Chez les mammifères, les protéines adaptatrices les mieux caractérisées sont les protéines Milton et Miro. Milton s'associe à la chaîne lourde des kinésines pour former un complexe dans lequel la chaîne légère n'est pas retrouvée (Glater *et al.*, 2006). Bien que cette protéine ne présente pas de séquence d'adressage mitochondriale, elle est localisée à la mitochondrie. Des expériences de criblage double-hybride chez la levure (Giot *et al.*, 2003) ou de co-immunoprécipitation dans les lignées cellulaires de rein COS7 et HEK293T (Glater *et al.*, 2006), ont montré une interaction entre la protéine Milton et une protéine de la membrane mitochondriale externe, Miro. La délétion du domaine membranaire de Miro conduit à la localisation cytosolique du complexe Milton-Miro. En plus de sa fonction d'adaptateur, Miro semble jouer un rôle de régulateur du transport mitochondrial puisqu'elle possède une activité GTPase, deux sites de fixation au GTP et deux motifs de fixation au calcium (Rice et Gelfand, 2006). Il a d'ailleurs été montré que le calcium intervient dans la régulation du transport

mitochondrial puisque l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium dans des myocytes cardiaques diminue le transport mitochondrial (Yi *et al.*, 2004).

Les filaments d'actines sont majoritairement impliqués dans le transport mitochondrial chez la levure mais interviennent également chez les mammifères en assistant les microtubules pour les migrations de courte distance (Hollenbeck et Saxton, 2005). Les myosines sont les protéines motrices impliquées dans ce type de transport. Les microfilaments d'actine ont également été impliqués dans l'immobilisation des mitochondries au niveau de leurs sites d'action. La latrunculine B, un inhibiteur chimique de la polymérisation des filaments d'actine, inhibe l'accumulation des mitochondries induite par la présence de microbilles libérant du NGF, facteur de croissance neuronal (Chada et Hollenbeck, 2004). Cependant, les filaments intermédiaires interviendraient également en interagissant directement ou indirectement avec les mitochondries, les dissociant des réseaux d'actine et de tubuline (Anesti et Scorrano, 2006).

Il semble y avoir des connexions entre le transport mitochondrial et les phénomènes de fission-fusion. En effet, les dynéines contribuent à la localisation mitochondriale de la protéine Drp1 impliquée dans la fission. L'altération de la fonction des dynéines dans les cellules HeLa empêche la localisation mitochondriale de Drp1 et conduit à la formation de longs tubules mitochondriaux et à une accumulation péri-nucléaire des mitochondries (Varadi *et al.*, 2004).

### **III. Mitochondries et neurodégénérescence**

#### ***A. Pathologies de la dynamique mitochondriale***

L'équilibre entre les processus de fission et fusion semble critique pour la physiologie neuronale. Des mutations dans certains gènes composant la machinerie de fission/fusion sont responsables de maladies neurodégénératives. De récentes études ont également permis d'impliquer des défauts de la dynamique mitochondriale dans des maladies neurodégénératives plus fréquentes telles que la maladie de Parkinson. En effet, les protéines Pink et Parkin régulent négativement la fonction de fusion des mitofusines et de OPA1 alors qu'elles régulent positivement l'action de Drp1 provoquant une fragmentation mitochondriale

(Deng *et al.*, 2008 ; Poole *et al.*, 2008). Ces données font de la dynamique mitochondriale un élément clé des recherches sur les mécanismes conduisant à une neurodégénérescence.

Les principales neuropathies liées à la dynamique mitochondriale impliquent des mutations des gènes codant pour les protéines GDAP1, MFN2 et OPA1. Les mutations des gènes *GDAP1* et *MFN2* sont impliquées dans certaines formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Baxter *et al.*, 2002 ; Cuesta *et al.*, 2002 ; Züchner *et al.*, 2004) alors que les mutations du gène *OPA1* sont responsables d'atrophie optique autosomique dominante (Alexander *et al.*, 2000 ; Delettre *et al.*, 2000). Un cas de neuropathie associée à une mutation du gène *Drp1* a été récemment décrit chez un nouveau né présentant une microcéphalie, une anomalie du développement cérébral, une atrophie optique avec hypoplasie, une acidose lactique persistante et une concentration plasmatique modérément élevée en acides gras à très longue chaîne. Cette mutation hétérozygote à effet dominant négatif est associée à un défaut de fission mitochondriale (Waterham *et al.*, 2007).

## **1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)**

### ***a. Aspects cliniques et classification***

La maladie de Charcot-Marie-Tooth constitue un groupe de neuropathies périphériques héréditaires sensibles et motrices dont la prévalence est estimée à 1/2500 (Skre *et al.*, 1974). Elle doit son nom aux trois médecins qui l'ont décrite simultanément en 1886. Charcot et Marie ont d'abord publié leurs travaux sous le titre : « une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains » (Charcot et Marie, 1886). Tooth publia sa thèse de médecine quelques mois plus tard sous le titre : « The peroneal type of progressive muscular atrophy » (Tooth, 1886).

Cette pathologie est caractérisée par une atrophie musculaire et une neuropathie sensitive distales, progressives, ascendantes, symétriques et généralement longueur dépendantes. Le déficit moteur débute en général aux membres inférieurs, au niveau des pieds et des orteils et est souvent associé à des déformations orthopédiques telles que des pieds creux ou plats et des orteils qui se rétractent et peuvent prendre une forme en « griffe » (*cf.* figure 10B). Lorsque la maladie évolue, l'atrophie touche les muscles de la loge antéro-externe de la jambe provoquant un steppage et une instabilité à la marche, puis, les muscles de la loge postérieure sont atteints donnant un aspect en « mollets de coq » (*cf.* figure 10A). A un

stade plus évolué de la maladie, le déficit peut devenir proximal entraînant une perte d'autonomie de la marche. Les membres supérieurs peuvent également être touchés atteignant essentiellement les mains ou parfois les avant-bras, rendant les mouvements fins des doigts difficiles (*cf.* figure 10C). La maladie se révèle en général avant l'âge de 20 ans, parfois plus tardivement et présente une grande variabilité clinique interindividuelle et intrafamiliale (Bouhouche *et al.*, 2007) allant de formes très précoces avec un retard des acquisitions motrices et un handicap important confinant dès l'enfance au fauteuil roulant à des formes cliniquement asymptomatiques diagnostiquées lors de l'examen électrophysiologique. La diversité de présentation clinique est associée à une très grande hétérogénéité génétique puisque plus de 20 gènes différents responsables de CMT ont été identifiés (Szigeti et Lupski, 2009).

Plusieurs formes de la maladie ont été décrites et leur classification prend en compte le mode de transmission de la maladie, les résultats de l'électro-neuro-myogramme (ENMG) et la génétique moléculaire. Le mode de transmission peut être établi à partir de l'arbre généalogique comme étant autosomique dominant (AD), autosomique récessif (AR), lié à X dominant (XD) ou lié à X récessif (XR). L'ENMG permet d'étudier la conduction motrice d'un nerf. Pour cela, le nerf va être stimulé à proximité et à distance du muscle qu'il commande et l'activité du muscle va être enregistrée. Ceci permet de calculer la vitesse de conduction motrice et l'amplitude de la réponse musculaire. Cet examen est réalisé au niveau du nerf médian situé dans la loge antérieure de l'avant bras. Les résultats de l'ENMG permettent ainsi de distinguer les formes démyélinisantes définies par des vitesses de conduction nerveuse motrice (VCN) du nerf médian inférieures à 38m/s, des formes axonales qui présentent une VCN supérieure à 38m/s. Les formes les plus fréquentes sont les formes autosomiques dominantes démyélinisantes (CMT1) ou axonales (CMT2). Les formes autosomiques récessives sont plus rares et plus sévères, et peuvent être de nature axonale (AR-CMT2) ou démyélinisante (CMT4) (*cf.* figure 11).

Le gène *GDAP1* est impliqué aussi bien dans la forme axonale autosomique dominante ou récessive CMT2K (Cuesta *et al.*, 2002 ; Azzedine *et al.*, 2003 ; Birouk *et al.*, 2003 ; Stojkovic *et al.*, 2004 ; Claramunt *et al.*, 2005) que dans la forme autosomique récessive démyélinisante CMT4A (Ben Othman *et al.*, 1993 ; Baxter *et al.*, 2002). Le gène *MFN2* est responsable de la forme axonale CMT2A dont la transmission est autosomique dominante (Züchner *et al.*, 2004). Certaines mutations du gène *MFN2* peuvent donner lieu à des formes parmi les plus sévères. Des formes congénitales ou infantiles sévères chez des



individus homozygotes ou hétérozygotes composites ont d'ailleurs été décrites (Nicholson *et al.*, 2008).

### **b. Génétique moléculaire de la CMT2A**

Le gène *MFN2*, localisé en 1p36.22, est composé de 19 exons dont 2 non codants (exons 1 et 2). Depuis sa découverte, environ 60 mutations du gène *MFN2* ont été rapportées dans la banque de données des mutations responsables de neuropathies périphériques héréditaires (Inherited peripheral neuropathies mutation database, <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>). Une étude réalisée en 2006, à partir de 323 patients atteints de différentes formes de CMT, a permis d'identifier 30 mutations du gène *MFN2* (Verhoeven *et al.*, 2006). Cette étude montre qu'à l'exception de deux mutations non-sens et d'une délétion, la majorité des mutations sont des mutations faux-sens. Toutes les mutations identifiées dans cette étude sont localisées dans les domaines cytoplasmiques de la protéine MFN2, plus particulièrement du côté N-terminal du domaine HR2 et dans les 50 derniers acides aminés. Ainsi, la majorité des mutations sont situées à proximité ou affectent directement le domaine GTPase et les domaines coiled-coil (*cf.* figure 12). Les mutations affectant le codon 94 (p.R94Q et p.R94W) sont retrouvées plus fréquemment. Ces mutations ont été rapportées treize fois (5 pour p.R94Q et 7 pour p.R94W) chez des patients atteints de CMT2A issus de familles différentes (Cho *et al.*, 2007 ; Chung *et al.*, 2006 ; Kijima *et al.*, 2005 ; Neusch *et al.*, 2007 ; Verhoeven *et al.*, 2006 ; Züchner *et al.*, 2004 ; Züchner *et al.*, 2006). Cet acide aminé localisé en aval du domaine GTPase est très conservé entre espèces (Züchner *et al.*, 2004) et constitue un point chaud de mutation.

### **c. Physiopathologie de la CMT2A**

Du fait de sa transmission autosomique dominante, la CMT2A peut être due à une haploinsuffisance ou à un effet dominant négatif des protéines mutées. Plusieurs éléments sont en faveur d'un effet dominant négatif. Contrairement aux mutations du gène *OPA1* dont une grande partie correspond à des mutations tronquantes, les mutations du gène *MFN2* sont, à quelques exceptions près, des mutations faux-sens. Il a également été montré que l'expression de mutations pathogènes du gène *MFN2* n'inhibe pas la fusion mitochondriale pour tous les mutants (Detmer et Chan, 2007). De plus, la surexpression de ces allèles pathogènes dans des fibroblastes embryonnaires de souris ou dans des neurones ganglionnaires de la racine dorsale induit une agrégation mitochondriale et non une fission du réseau comme celle retrouvée après inhibition de l'expression de *MFN2* (Baloh *et al.*, 2007).

- Dynamique mitochondriale et CMT2A

Les mécanismes par lesquels les mutations du gène *MFN2* conduisent à une dégénérescence axonale ne sont pas connus. Du fait du rôle de la protéine MFN2, il a été suggéré qu'une altération de la fusion mitochondriale puisse intervenir dans la physiopathologie de la CMT2A. L'activité de fusion et la morphologie du réseau mitochondrial ont été explorées dans des cellules exprimant des mutations pathogènes du gène *MFN2*. Il a été montré que l'expression de ces mutations dans des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de MFN1 et MFN2 inhibe la fusion pour la majorité des mutations. En revanche, l'expression de *MFN1* dans ces mêmes cellules, contrairement à *MFN2*, est capable de compléter les allèles pathogènes pour induire la fusion. Les hétéro-complexes MFN1-MFN2 mutés, contrairement aux complexes MFN2-MFN2 mutés, seraient ainsi efficaces pour la fusion mitochondriale (Detmer et Chan, 2007). Ces données suggèrent que les tissus dont l'expression de MFN1 est faible sont plus vulnérables aux mutations du gène *MFN2*. De plus, l'expression des formes mutantes du gène *MFN2* conduit à une agrégation mitochondriale (Detmer et Chan, 2007 ; Detmer *et al.*, 2007). Cette agrégation est dose dépendante et non retrouvée à des niveaux d'expression physiologiques de *MFN2* ce qui suggère que cette agrégation soit liée à la surexpression de *MFN2* et n'intervienne pas dans la pathogenèse de la CMT2A.

- Transport axonal mitochondrial et CMT2A

Le transport mitochondrial joue également un rôle très important pour la fonction neuronale. Plusieurs éléments semblent indiquer qu'un défaut du transport axonal mitochondrial pourrait être impliqué dans la CMT2A. Tout d'abord, Zhao *et al.*, en 2001 ont décrit une famille de patients atteints de CMT2A et porteurs d'une mutation du gène KIF1B codant pour une protéine de la famille des kinésines impliquée dans le transport des mitochondries (Nangaku *et al.*, 1994). Les souris transgéniques hétérozygotes pour cette mutation présentent une anomalie du transport des vésicules synaptiques et souffrent d'une faiblesse musculaire progressive. De plus, il a été montré que la surexpression de mutations pathogènes du gène *MFN2*, dans des neurones ganglionnaires de rat en culture ou dans les motoneurones de souris transgéniques exprimant la mutation p.T105M dans le domaine GTPase de MFN2, induit une agrégation mitochondriale péri-nucléaire et donc peu de mitochondries sont retrouvées dans les axones (Baloh *et al.*, 2007 ; Detmer *et al.*, 2007). De manière intéressante, l'étude de Baloh *et al.*, a mis en évidence une altération du transport

axonal mitochondrial lié à la surexpression des formes mutantes de MFN2. Contrairement à ces travaux, les deux études réalisées à partir de biopsies de nerfs de patients atteints de CMT2A montrent une accumulation des mitochondries dans la partie distale des axones du nerf sural et non dans la zone péri-nucléaire (Vallat *et al.*, 2008 ; Verhoeven *et al.*, 2006). D'autres études doivent être envisagées pour déterminer l'implication du transport axonal dans la physiopathologie de la CMT2A.

- Interaction mitochondrie-réticulum endoplasmique et CMT2A

Récemment, une autre fonction a été attribuée à la protéine MFN2. Cette protéine est enrichie au niveau des sites de contacts entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie et intervient dans l'accrochage des deux organites (De Brito et Scorrano, 2008). Ainsi, les cellules HeLa et les fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de MFN2 ou exprimant une forme mutante de la protéine MFN2 présentent une altération de la morphologie du réticulum endoplasmique, qui est alors gonflé et agrégé. De plus, cela conduit à un défaut d'interaction entre cet organite et la mitochondrie et à une anomalie de captage du calcium par la mitochondrie.

La protéine MFN2 possède, en N-terminal du domaine GTPase, un domaine de fixation au proto-oncogène p21-Ras permettant l'inhibition de ce dernier (Chen *et al.*, 2004). L'une des principales voies de signalisations en aval de Ras est la voie ERK/MAPK (extracellular-signal regulated kinase / mitogen-activated protein kinase) activée en présence de nombreux signaux mitogènes et impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Lim *et al.*, 1996). Il a été montré que des formes mutantes de la protéine MFN2 dépourvues de ce domaine de fixation à Ras ne peuvent permettre l'accrochage des mitochondries et du réticulum endoplasmique et que les cellules dépourvues de MFN2 présentent une activation de la voie ERK/MAPK (De Brito et Scorrano, 2009). Ces données offrent de nouvelles pistes à explorer pour comprendre la physiopathologie de la CMT2A.

- Métabolisme énergétique mitochondrial et CMT2A

La protéine MFN2 joue un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial. L'inhibition de l'expression de *MFN2* dans la lignée de myoblastes L6E9 diminue l'oxydation du glucose et le potentiel de membrane mitochondrial (Bach *et al.*, 2003). De plus, l'expression de *MFN2* dans le muscle squelettique est réduite chez des patients atteints d'obésité ou de diabète de type 2 (Bach *et al.*, 2005) alors qu'elle est augmentée après exercice physique (Cartoni *et al.*, 2005). Une autre étude réalisée à partir de

cellules HeLa et de myoblastes L6E9 a montré qu'une diminution de 50% de l'expression de *MFN2* conduit à une diminution de l'oxydation du glucose, du pyruvate, du palmitate et du potentiel de membrane mitochondrial. Cette baisse d'expression est également associée à une réduction de l'expression de certaines sous unités des complexe I, II, III et V de la chaîne respiratoire mitochondriale alors qu'une surexpression conduit à une augmentation du potentiel de membrane, de l'oxydation du glucose et de l'expression de sous unités des complexes I, IV et V (Pich *et al.*, 2005). De manière intéressante, la surexpression d'une forme mutante de la protéine MFN2 n'ayant pas d'activité de fusion augmente le potentiel de membrane et l'oxydation du glucose ce qui suggère que le rôle de MFN2 dans la fusion mitochondriale est indépendant de son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique et que les modifications métaboliques observées ne résultent pas d'une modification de la morphologie mitochondriale. Par ailleurs, une étude menée au laboratoire à partir de fibroblastes de patients atteints de CMT2A et porteurs de mutations du gène *MFN2* nous a permis de mettre en évidence une baisse d'efficacité des OXPHOS et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial dans ces cellules (Loiseau *et al.*, 2007). Il est également important de souligner que l'expression du gène *MFN2* est régulée par des coactivateurs transcriptionnels ( $PGC1\alpha$  et  $\beta$ ) et des facteurs de transcriptions ( $ERR\alpha$ ) impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Cartoni *et al.*, 2005 ; Soriano *et al.*, 2006 ; Liesa *et al.*, 2008). Ces données suggèrent qu'une perturbation de la fonction énergétique mitochondriale puisse intervenir dans la physiopathologie de la CMT2A.

## **2. L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA)**

L'ADOA est une affection dégénérative spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine. La rétine est constituée d'un feuillet externe, l'épithélium pigmentaire et d'un feuillet interne, la rétine neuro-sensorielle (*cf.* figure 13A). Ce feuillet interne est composé de différentes couches de cellules. Les cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets) constituent la couche la plus externe. La deuxième couche (couche plexiforme) est formée des cellules bipolaires, amacrines et horizontales qui ont un rôle de relais du signal entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. La couche des cellules ganglionnaires contient les corps cellulaires de ces cellules. Enfin, la couche de fibres nerveuses est constituée des axones des cellules ganglionnaires qui convergent vers un point de la rétine au pôle postérieur de l'œil : la papille. Dans cette portion, les axones sont non myélinisés et présentent des varicosités riches en mitochondries qui permettent de fournir l'énergie nécessaire à la

transmission de l'influx nerveux (Carelli *et al.*, 2004a). Les axones vont ensuite traverser une couche de fibres de collagène appelée lame criblée et sortent de l'œil pour former le nerf optique. Dans cette partie, les mitochondries sont peu nombreuses car l'axone est myélinisé et la conduction de l'influx nerveux qui devient saltatoire nécessite moins d'énergie (*cf.* figure 13B).

Dans l'ADOA, la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine entraîne une perte des axones qui forment le nerf optique. L'ADOA ou atrophie optique de Kjer, du nom de l'ophtalmologiste Danois qui l'a décrite (Kjer, 1959), est la forme la plus fréquente d'atrophie optique héréditaire avec une prévalence de 1/10000 au Danemark et 1/50000 dans la population générale (Lyle, 1990).

### *a. Aspects cliniques*

Le principal signe de la maladie est une atrophie optique généralement symétrique visible au fond d'œil sous forme d'une pâleur temporale de la papille optique (Hoyt 1980 ; Votruba *et al.*, 1998) (*cf.* figure 14). Celle-ci est liée à la perte des fibres axonales provenant des cellules ganglionnaires de la rétine centrale (macula). L'atrophie s'accompagne d'une perte de la vision centrale caractérisée par une diminution progressive de l'acuité visuelle qui est le plus souvent modérée (6/10 à 2/10) mais qui peut aussi conduire à une cécité légale (<1/20), une amputation du champ visuel central (scotome central) et une dyschromatopsie dans l'axe bleu - jaune appelée tritanopie (perturbation de la vision des couleurs). La survenue de la maladie est qualifiée d'insidieuse du fait de l'imprécision de l'âge de début. Elle est généralement découverte pendant l'enfance, vers l'âge de 4 à 6 ans, mais peut être diagnostiquée en fonction du niveau de perte d'acuité visuelle, plus tôt chez le nourrisson sévèrement atteint présentant un nystagmus (Kline *et al.*, 1979) ou chez l'adulte lorsque la perte est légère. L'atteinte de très jeunes patients suggère que la maladie est congénitale mais une aggravation avec l'âge est également décrite (Brown, 1997).

L'ADOA présente une pénétrance incomplète et une expressivité intra et interfamiliale très variable pouvant aller de porteurs asymptomatiques à la cécité légale. Les facteurs environnementaux et le fond génétique peuvent intervenir. C'est notamment le cas des haplogroupes mitochondriaux, combinaisons spécifiques de polymorphismes nucléotidiques reflétant l'évolution des populations. Il a été montré que l'haplogroupe mitochondrial J était trois fois plus représenté chez les patients présentant une atrophie optique non associée à *OPAI* par rapport aux patients porteurs d'une mutation du gène *OPAI* (Han *et al.*, 2006).

Depuis la description de la maladie, d'autres symptômes neurologiques associés à l'ADOA et en particulier une perte d'audition neuro-sensorielle ont été décrits (Konigsmark *et al.*, 1974 ; Meire *et al.*, 1985 ; Mets and Mhoon, 1985 ; Hoyt, 1980). Cependant, la découverte du gène *OPA1* et son criblage moléculaire systématique chez les patients présentant une atrophie optique ont permis la description de nombreux variants phénotypiques. Ainsi, en 2003, une forme d'ADOA associée à une surdité légère a été décrite (Amati-Bonneau *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2003). Cette forme est liée à une mutation hétérozygote faux-sens de l'exon 14 (c. 1334G>A) du gène *OPA1*, conduisant à un changement d'acide aminé très conservé en position 445 (p. R445H) dans le domaine GTPase de la protéine OPA1. Aussi, un cas d'atrophie optique associée à des symptômes de sclérose multiple et liée à une nouvelle mutation du gène *OPA1* (p.S646L) a été récemment décrit (Verny *et al.*, 2008). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence un lien entre une atteinte multi-systémique sévère associant atrophie optique, ophtalmoplégie progressive externe, ataxie, surdité neuro-sensorielle, neuropathie sensitivo-motrice et myopathie et certaines mutations retrouvées dans le domaine GTPase de OPA1 (Amati-Bonneau *et al.*, 2008 ; Hudson *et al.*, 2008 ; Zeviani, 2008). Ce syndrome est appelé « ADOA plus ». Enfin, un cas d'ADOA associée à une mutation du gène *OPA1* mais ayant les caractéristiques de la neuropathie optique héréditaire de Leber (atrophie optique aiguë de survenue tardive) à été décrit (Nochez *et al.*, 2008).

Les mutations du gène nucléaire *OPA3* sont également responsables d'une forme d'atrophie optique, l'atrophie optique dominante avec cataracte (AODC) (Reynier *et al.*, 2004). Il s'agit d'une pathologie autosomique dominante caractérisée par une baisse de l'acuité visuelle et une opacification du cristallin. Le gène *OPA3* localisé en 19q13.2-q13.3 contient 2 exons et code une protéine ubiquitaire de 179 acides aminés dont la fonction est inconnue. La protéine OPA3 comporte une séquence d'adressage et a été localisée, comme la protéine OPA1, dans la membrane interne mitochondriale.

### **b. Génétique moléculaire de l'ADOA**

Sur le plan génétique, plusieurs loci sont connus comme étant responsables d'atrophie optique dominante, la majorité des cas étant liés au locus *OPA1*, localisé en 3q28-29 (Bonneau *et al.*, 1995). Le gène *OPA1* a été identifié en 2000 (Delettre *et al.*, 2000 ; Alexander *et al.*, 2000). Il s'étend sur plus de 90Kb et est composé de 31 exons dont 30 codants. Après sa découverte, 2 exons alternatifs additionnels ont été identifiés : les exons 4b et 5b. Ces

derniers sont, avec l'exon 4, à l'origine de 8 isoformes de protéines OPA1 par épissage alternatif (Delettre *et al.*, 2001).

Depuis l'identification du gène, 204 mutations pathogènes ont été rapportées (Ferre *et al.*, 2009). Notre laboratoire a développé une banque de donnée spécifique du locus *OPA1* dans laquelle toutes les mutations publiées ainsi que les polymorphismes sont répertoriés (Ferre *et al.*, 2005 ; <http://lbbma.univ-angers.fr/eOPA1/>). Les mutations du gène *OPA1* sont réparties sur toute la séquence codante mais touchent majoritairement les domaines GTPase et dynamine. Ainsi, 76 mutations (37%) sont localisées dans le domaine GTPase, 67 (33%) dans le domaine dynamine, 37 (18%) dans le domaine GED (GTPase effector domain) et 14 (7%) dans la séquence d'adressage mitochondriale (*cf.* figure 15A). Parmi ces mutations, 40% sont de mutations tronquantes (mutations déphasante avec décalage du cadre de lecture et mutations non-sens). On retrouve 27% de mutations faux-sens, 27% de mutations d'épissage et 6% de délétions ou duplications (*cf.* figure 15B) (Amati-Bonneau *et al.*, 2009). La mutation c.2708\_2711delTTAG située dans l'exon 27 constitue un point chaud puisqu'elle est retrouvée dans 17% des cas d'ADOA liée à *OPA1*. Aucune corrélation génotype-phénotype n'a pu être clairement établie dans les études cliniques à grande échelle (Pesch *et al.*, 2001 ; Puomila *et al.*, 2005 ; Cohn *et al.*, 2007). Cependant, il existe une corrélation forte associant ADOA et surdité à la mutation p.R445H et associant le phénotype « ADOA plus » à des mutations faux-sens du domaine GTPase.

### **c. Physiopathologie de l'ADOA**

Contrairement à la CMT2A, plusieurs éléments suggèrent que l'ADOA est liée à un mécanisme d'haploinsuffisance. Une part importante des mutations du gène *OPA1* est constituée de mutations tronquantes (40%). Ainsi, sur les deux exemplaires du gène *OPA1*, un seul donne une protéine fonctionnelle. De plus, il a été démontré que les transcrits du gène *OPA1* qui contiennent des codons stop prématurés sont dégradés par le mécanisme « nonsense-mediated mRNA decay » (Schimpf *et al.*, 2008). La description d'une grande délétion conduisant à la perte d'une copie du gène *OPA1* dans une famille atteinte d'ADOA supporte également l'hypothèse d'un mécanisme d'haploinsuffisance (Marchbank *et al.*, 2002). Cependant, les formes d'ADOA associées à d'autres signes neurologiques telles que l'ADOA et surdité ou « l'ADOA plus » sont liées à des mutations faux-sens (Amati-Bonneau *et al.*, 2008), ce qui suggère qu'un effet dominant négatif puisse également contribuer à la pathogenèse dans le cas de formes sévères de la maladie.

- Dynamique mitochondriale et ADOA

Comme pour MFN2, le rôle de OPA1 dans la fusion mitochondriale suggère qu'une altération de la morphologie du réseau mitochondrial puisse être impliquée dans la pathogenèse de l'ADOA. Il a été montré que la surexpression de certaines formes mutantes du gène *OPA1* dans différents modèles cellulaires induit une fragmentation du réseau mitochondrial (Misaka *et al.*, 2006 ; Olichon *et al.*, 2007b). De plus, la même altération morphologique a été retrouvée dans des cultures de fibroblastes et de myotubes de patients atteints d'ADOA (Amati-Bonneau *et al.*, 2005 ; Spinazzi *et al.*, 2008), de même que dans les cellules musculaires d'un modèle murin d'ADOA présentant une mutation tronquante hétérozygote du gène *OPA1* et conduisant à une diminution de 50% de la quantité de protéine OPA1 (Davies *et al.*, 2007).

- Apoptose et ADOA

La protéine OPA1 a également un rôle anti-apoptotique. Il a été montré dans des cellules HeLa que l'inhibition de l'expression d'*OPA1* par siRNA conduit à une désorganisation des crêtes mitochondriales, à une libération du cytochrome *c* dans le cytoplasme et à une apoptose caspase-dépendante (Olichon *et al.*, 2003). L'apoptose induite par la déplétion de la protéine OPA1 nécessite l'expression de Fis1 suggérant que l'effet anti-apoptotique de OPA1 intervienne en inhibant la fragmentation mitochondriale et l'effet pro-apoptotique de Fis1 (Lee *et al.*, 2004). Ces résultats suggéraient que la fission mitochondriale fut à l'origine de la libération du cytochrome *c*. Cependant, la libération de cytochrome *c* au cours de l'apoptose précède la fragmentation mitochondriale et OPA1 est libéré en même temps que le cytochrome *c* (Arnoult *et al.*, 2005). De plus, la protéase PARL intervient dans le clivage de OPA1 de manière à donner une forme soluble ayant un rôle anti-apoptotique par séquestration du cytochrome *c* au niveau des crêtes mitochondriales (Frezza *et al.*, 2006 ; Cipolat *et al.*, 2006 ; Yamaguchi *et al.*, 2008). Plus récemment, il a été démontré dans des cellules neuronales qu'au cours de l'apoptose, la partie N-terminale de OPA1 est clivée par les caspases de façon indirecte (Loucks *et al.*, 2009). La protéine OPA1 intervenant dans la structuration des crêtes mitochondriales est donc la cible de signaux pro-apoptotiques. De manière intéressante, il a été montré une augmentation de la sensibilité à l'apoptose induite par la staurosporine dans les fibroblastes de patients porteurs de mutations du gène *OPA1* (Olichon *et al.*, 2007b). Ces données suggèrent qu'un déficit de la fonction anti-apoptotique portée par OPA1 puisse intervenir dans la physiopathologie de l'ADOA.



- Métabolisme énergétique mitochondrial et ADOA

Certaines données suggèrent que la protéine OPA1 est nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le premier élément rapporté est que la délétion de MGM1 (orthologue de OPA1 chez la levure) conduit une anomalie de structure des crêtes mitochondriales et à une perte de l'ADNmt (Wong *et al.*, 2000). Par la suite, il a été montré que l'inhibition de l'expression de *OPA1* dans des cellules HeLa provoque une baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003 ; Olichon *et al.*, 2007b). Plus récemment, une interaction physique entre OPA1 et certaines sous unités des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mise en évidence (Zanna *et al.*, 2008). De telles données ont également été observées chez des patients atteints d'ADOA. Des délétions de l'ADNmt dans le muscle squelettique de patients atteints d'« ADOA plus » (Hudson *et al.*, 2008 ; Amati-Bonneau *et al.*, 2008) ainsi qu'une diminution du contenu en ADNmt dans les cellules sanguines ont été décrites (Kim *et al.* 2005). De plus, il a été montré *in vivo* par imagerie par résonance magnétique, un déficit de production d'ATP dans les muscles squelettiques de patients atteints d'ADOA et porteurs de la mutation la plus fréquente du gène *OPA1* (Lodi *et al.*, 2004). Une diminution de la synthèse d'ATP dirigée par les substrats du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été montrée dans les fibroblastes de patients atteints d'ADOA (Zanna *et al.*, 2008) alors qu'aucun déficit énergétique n'a été retrouvé dans les lymphoblastes (Mayorov *et al.*, 2008). Finalement, la similarité de présentation clinique existant entre l'ADOA et une pathologie d'origine mitochondriale, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), renforce l'hypothèse d'une anomalie énergétique dans cette pathologie (Carelli *et al.*, 2004a), et cela d'autant plus que les cellules ganglionnaires de la rétine font partie des cellules les plus consommatrices d'oxygène de l'organisme (Yu et Cringle, 2001).

## **B. Neuropathies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial**

### **1. Le génome mitochondrial**

Les mitochondries possèdent leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt humain est une molécule d'ADN circulaire double brin de 16.569 paires de bases (*cf.* figure 16) (Anderson *et al.*, 1981). Le génome mitochondrial comporte un brin lourd (H, heavy) et un brin léger (L, light). Il est localisé dans la matrice mitochondriale et comporte 37 gènes dont 13 codent des protéines impliquées dans les phosphorylations oxydatives, 22

codent des ARN de transfert et 2 codent des ARN ribosomiaux. L'information génétique mitochondriale est compacte puisque les séquences codantes sont contiguës et sans introns. La région non codante représente seulement 5% du génome. C'est une région régulatrice appelée boucle D ou « D-Loop » qui contient les régions promotrices des brins H et L et l'origine de réplication du brin H. La réplication de l'ADNmt est effectuée grâce à l'ADN polymérase  $\gamma$  qui est codée par le génome nucléaire. Elle est principalement bidirectionnelle et asynchrone (Clayton, 1982) commençant par le brin H puis par le brin L. Lors de la réplication, la fréquence d'erreurs provoquant des mutations est beaucoup plus importante que celle du génome nucléaire (Brown *et al.*, 1979). L'hétéroplasmie correspond à la coexistence de molécules d'ADNmt mutées et non mutées au sein d'une même cellule alors que lorsque toutes les molécules sont identiques, on parle d'homoplasme. La transmission de l'ADNmt se fait par voie maternelle compte tenu de la richesse mitochondriale des ovocytes et de l'élimination spécifique des quelques copies d'ADNmt apportées par le spermatozoïde lors de la fécondation (Sutovsky *et al.*, 2000).

Ainsi, les maladies dues à des mutations ponctuelles de l'ADNmt ont un mode de transmission maternel et leur expression est en relation avec le taux d'hétéroplasmie. Ce sont des pathologies le plus souvent multi-systémiques affectant les tissus les plus énergiedépendants, tels que les muscles squelettiques et cardiaques, le système nerveux et neurosensoriel. Parmi ces pathologies, on retrouve la neuropathie optique héréditaire de Leber.

## **2. La neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)**

### **a. Aspects Cliniques**

La LHON est caractérisée par une perte rapide et sans douleur de la vision centrale qui débute en général chez l'adulte jeune, l'âge moyen de survenue se situant entre 18 et 35 ans. C'est une maladie à expressivité variable et pénétrance incomplète affectant préférentiellement les hommes. Les manifestations cliniques comportent classiquement une phase aiguë avant laquelle l'individu atteint est tout à fait asymptomatique et une phase chronique. La phase aiguë se caractérise par une baisse de la vision généralement sévère (moins de 1/10), brutale et souvent unilatérale. Dans ce cas, l'atteinte devient bilatérale en moyenne 8 semaines plus tard (Newman *et al.*, 2002). La vision centrale est généralement profondément altérée avec un scotome centrocaecal et une préservation plus ou moins importante de la périphérie du champ visuel. La vision des couleurs est également très

perturbée, en particulier au niveau de l'axe rouge-vert. Après six mois d'évolution, la phase chronique se caractérise par la dégénérescence des fibres ganglionnaires laissant place à un aspect non spécifique d'atrophie optique qui peut être temporaire ou globale (Man *et al.*, 2002). Bien que la diminution de l'acuité visuelle soit habituellement la seule manifestation, d'autres anomalies ont été rapportées (encéphalopathies, troubles de conduction cardiaque, dystonie, ataxie...). Le terme « Leber plus » est utilisé pour définir l'association de la LHON avec ces autres signes cliniques (Nikoskelainen *et al.*, 1995).

### **b. Génétique moléculaire de la LHON**

La LHON est due à des mutations de l'ADNmt au niveau de gènes codant pour les sous-unités NADH déshydrogénase du complexe I de la chaîne respiratoire (Wallace *et al.*, 1988). Les trois mutations les plus fréquentes affectent les nucléotides 11778, 3460 et 14484 des gènes ND4, ND1 et ND6 (NADH déshydrogénase 4, 1 et 6) respectivement. Dans la plupart des cas, les mutations sont à l'état homoplasmique mais quelques cas d'hétéroplasmie ont également été retrouvés (Man *et al.*, 2003 ; Harding *et al.*, 1995). Le taux d'hétéroplasmie semble influencer l'expression de la maladie puisque certaines études rapportent que le risque d'atteinte visuelle est réduit chez les patients ayant un taux correspondant à moins de 60% d'ADNmt mutés dans le sang (Chinnery *et al.*, 2001). Il existe également une corrélation génotype-phénotype, la mutation m.11778G>A donnant généralement le phénotype le plus sévère alors que la mutation m.14484 est associée au meilleur pronostic. La mutation m.3460G>A donne un phénotype intermédiaire.

### **c. Physiopathologie de la LHON**

Une diminution de l'activité enzymatique et de la respiration mitochondriale liées au complexe I ont été retrouvées dans des lymphoblastes porteurs des trois mutations les plus fréquentes (Brown *et al.*, 2000). Dans des lignées cybrides issues de la fusion de cellules 143B dépourvues d'ADNmt ( $\rho^0$ ) avec les plaquettes sanguines de patients porteurs de ces trois mutations, une diminution de la synthèse d'ATP mitochondriale dirigée par le complexe I a été montrée (Baracca *et al.*, 2005). Ces mutations confèrent également au complexe I une diminution de la sensibilité à son inhibiteur spécifique, la roténone (Ghelli *et al.*, 1997 ; Cock *et al.*, 1999). De plus, elles augmentent le taux d'apoptose de cellules cybrides lorsque celles-ci sont cultivées en milieu galactose (Zanna *et al.*, 2005) et lors d'un stress oxydatif (Battisti *et al.*, 2004). Une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

semble également intervenir dans la physiopathologie de la LHON (Qi *et al.*, 2003 ; Yen *et al.*, 2006).

## **IV. La fonction énergétique mitochondriale**

Les mitochondries sont des organites impliqués dans un grand nombre de voies métaboliques et de processus physiologiques tels que la  $\beta$ -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la synthèse des hormones stéroïdes, certaines étapes de la néoglucogenèse, du cycle de l'urée et de la synthèse de l'hème, la thermogenèse, l'homéostasie calcique, la production de ROS et l'apoptose. Cependant, leur principale fonction consiste en la production d'ATP, molécule énergétique utilisable par la cellule. Cette production d'énergie se fait par le système des phosphorylations oxydatives qui se déroulent au niveau de la membrane interne mitochondriale.

### **A. Les phosphorylations oxydatives**

#### **1. Fonctionnement**

Les phosphorylations oxydatives (*cf.* figure 17) assurent la production d'ATP (environ 70 kg par jour pour un homme au repos) à partir de l'oxygène et des nutriments. Le catabolisme des glucides, acides aminés et acides gras va permettre la réduction de coenzymes ( $\text{NAD}^+$  et FAD). Les équivalents réduits sous forme de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  vont être fournis à une chaîne d'oxydoréduction constituée de quatre complexes protéiques : complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), complexe III (ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase), complexe IV (cytochrome *c* oxydase) et de deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome *c*. Ces coenzymes réduits sont alors réoxydés par transfert de leurs électrons le long de cette chaîne vers un accepteur final qui est l'oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ). Le NADH cède ses électrons au complexe I et le  $\text{FADH}_2$  au complexe II. Les électrons sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Finalement les électrons sont pris en charge par le cytochrome *c* (Cyt *c*) puis libérés au niveau du complexe IV, où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Ce transfert d'électrons repose donc sur une série de réactions d'oxydoréductions au niveau de la chaîne respiratoire où les électrons vont transiter du composé ayant le plus faible potentiel redox ( $\text{NAD}^+$ ) vers des molécules à plus

fort potentiel pour arriver jusqu'à l'oxygène ayant le potentiel le plus élevé (*cf.* figure 18). Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce mouvement de protons crée un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et engendre un potentiel de membrane (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement) au travers de la membrane interne d'environ -180 mV. La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique de protons, la force protonmotrice, qui permet le retour des protons dans la matrice au travers du complexe F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase et ainsi la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP par la force protonmotrice est à la base de la théorie chimio-osmotique émise par Mitchell en 1961.

## **2. Composition**

Le système des phosphorylations oxydatives est constitué d'une chaîne d'oxydoréduction et d'un complexe de phosphorylation. Les 13 gènes de l'ADNmt ne codent que 16% de la totalité des constituants de ce système. Ainsi, les 76 sous-unités restantes sont codées par le génome nucléaire et transférées à la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage précisant leur localisation mitochondriale.

### **a. La chaîne respiratoire mitochondriale**

Elle est constituée de quatre complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie et de deux transporteurs d'électrons mobiles : l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome *c* (*cf.* figure 17).

- **Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase)**

C'est le plus gros des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire avec une masse moléculaire d'environ 980 kDa. Il est composé de 45 sous-unités dont 38 sont codées par le génome nucléaire et 7 par le génome mitochondrial (Carroll *et al.*, 2006). L'assemblage de ces sous-unités constitue deux domaines majeurs. Le domaine hydrophile codé par le génome nucléaire contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide et huit ou neuf centres fer/soufre constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le domaine hydrophobe est constitué des sept sous-unités NADH déshydrogénase (ND) codées par le génome mitochondrial et contient le site de réduction des quinones et la machinerie de pompage des protons. Ce complexe catalyse le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone par

l'intermédiaire de la flavine mononucléotide et des centres fer/soufre. Pour chaque paire d'électrons transférés, quatre protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'inhibiteur du complexe I classiquement utilisé est la roténone. Elle agit au niveau du domaine hydrophobe du complexe, vraisemblablement au niveau du site de fixation de l'ubiquinone (Degli-Esposti, 1998).

- Le complexe II (Succinate-ubiquinone oxydoréductase)

Il a une masse moléculaire d'environ 200 kDa et est composé de 4 sous-unités codées par le génome nucléaire. Les sous-unités SDH (succinate déshydrogénase) A et B constituent le domaine hydrophile localisé dans la matrice mitochondriale tandis que les sous-unités SDH C et D permettent d'ancrer le complexe à la membrane interne (*cf.* figure 19). Ce complexe catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Bien que la réaction inverse soit rare chez l'homme, elle a été mise en évidence dans des conditions d'hypoxie, où elle semble jouer un rôle dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les vaisseaux pulmonaires (Paddenberg *et al.*, 2003). La sous-unité SDH A qui contient un groupement prosthétique FAD (flavine adénine dinucléotide) fixe les substrats (succinate et fumarate) ainsi que les régulateurs physiologiques (oxaloacétate et ATP). Les électrons sont ensuite transférés de la SDH A vers les centres fer/soufre au niveau de la sous-unité SDH B puis vers les sous-unités SDH C (CybL) et D (CybS) et ensuite vers l'ubiquinone.

Ce complexe présente certaines particularités par rapport aux autres complexes de la chaîne respiratoire. Il ne transloque pas de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire mais joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait partie à la fois de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. De plus, ce complexe est capable de contrôler l'état d'oxydo-réduction du pool de quinones et ainsi d'avoir une action pro- ou anti-oxydante (Rustin *et al.*, 2002). Ce complexe est également le seul à pouvoir fonctionner lorsque le statut redox de la chaîne respiratoire est fortement réduit (Brière *et al.*, 2005). Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich (Rotig *et al.*, 1997), la chorée de Huntington (Butterworth *et al.*, 1985) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (Bourgeron *et al.*, 1995). Contrairement aux autres acides organiques qui peuvent être métabolisés par plusieurs enzymes, le succinate s'accumule lorsque l'activité succinate déshydrogénase (SDH) du complexe II est diminuée. Ainsi, même des déficits partiels en SDH peuvent être délétères et provoquer des pathologies neurodégénératives (Birch-Machin *et al.*, 2000). Des mutations des gènes codant les sous-unités B, C et D du complexe II ont été

impliquées dans la tumorigénèse puisqu'elles conduisent au développement de paragangliomes et phéochromocytomes, deux types de tumeurs neuro-endocrines (Favier *et al.*, 2005). Il a été suggéré que la perte de capacité anti-oxydante du pool de quinone suite à l'inactivation de la SDH puisse intervenir dans la formation de ces tumeurs (Rustin *et al.*, 2002). Le complexe II est inhibé par le malonate et le thényltrofluoroacétone (TTFA). La malonate empêche l'utilisation du succinate et le TTFA inhibe le transfert d'électron des centres fer/soufre vers l'ubiquinone (Hatefi *et al.*, 1985).

- Le complexe III (Ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase)

Il a une masse moléculaire de 240 kDa et est constitué de 11 sous-unités dont trois portent les quatre groupements prosthétiques. Ainsi, les 2 cytochromes *b* (*b<sub>L</sub>* et *b<sub>H</sub>*) sont associés à la sous-unité 3, le cytochrome *c<sub>1</sub>* appartient à la sous-unité 4 et le centre fer/soufre est contenu dans la sous-unité 5. Seule la sous-unité 3 comprenant les cytochromes *b* est codée par le génome mitochondrial. Ce complexe catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome *c* associé au transfert de 4 protons au travers de la membrane interne. Il est inhibé par l'antimycine ou le myxothiazol.

- Le complexe IV (Cytochrome *c* oxydase)

Il a une masse moléculaire d'environ 200 kDa et contient 13 sous unités, les cytochromes *a* (cyt *a*) et *a<sub>3</sub>* (cyt *a<sub>3</sub>*) ainsi que deux atomes de cuivre CuA et CuB. Les sous-unités COX I, COX II et COX III sont codées par le génome mitochondrial et forment le site actif du complexe ou centre binucléaire composé d'un noyau hème (cytochrome *a<sub>3</sub>*) associé à un atome de cuivre (CuB). Ce complexe catalyse le transfert des électrons du cytochrome *c* vers l'oxygène et participe, comme les complexes I et III, à la translocation des protons. Les électrons du cytochrome *c* entrent dans le complexe par le centre CuA et le cyt *a* et sont transférés au centre binucléaire. Après réduction totale du complexe (4 électrons), l'oxygène se lie au niveau du site actif et est réduit en eau. La réduction du dioxygène en eau consomme 4 protons et l'énergie cédée par les électrons permet de transloquer 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. L'activité de ce complexe est inhibée par le cyanure de potassium (KCN) ou l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>).

**b. Le complexe de phosphorylation : l'ATP synthase**

Le complexe V (ATP synthase) a une masse moléculaire d'environ 600 kDa. Il est composé de deux sous complexes F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> et est également appelé F<sub>1</sub>- F<sub>0</sub> ATPase. La partie F<sub>0</sub>

est ancrée dans la membrane interne mitochondriale et forme un canal qui permet le passage des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice (Fillingame, 1999). Cette partie est composée de cinq sous-unités, les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $c$ ,  $d$  et OSCP (oligomycin sensitivity conferral protein). Le domaine catalytique  $F_1$  se trouve dans la matrice mitochondriale au contact de la membrane interne. Il utilise le gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce domaine est composé de cinq types de sous-unités ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\delta_1$ ,  $\gamma_1$ ,  $\epsilon_1$ ). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont agencées alternativement autour de la sous-unité  $\gamma$  (Abrahams *et al.*, 1994). Des protéines accessoires ( $e$ ,  $f$ ,  $g$  et  $F_6$ ) sont associées à ce complexe. Les 10 sous-unités  $c$  du domaine  $F_0$  sont connectées à la sous-unité  $\gamma$  du domaine  $F_1$  et forment un rotor tandis que les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $a_6$ ,  $b$ ,  $d$  et OSCP forment un stator. Le passage des protons à travers le stator va permettre la rotation des sous-unités  $c$  qui entraînent la sous-unité  $\gamma$ . C'est la rotation de cette dernière qui provoque un changement de conformation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du domaine  $F_1$  conduisant à la production d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Sambongi *et al.*, 1999). Le domaine catalytique  $F_1$  est également capable d'hydrolyser l'ATP (Wang et Oster, 1998). Dans ce cas, il existe un peptide, IF1, capable de fixer et d'inhiber l'ATP synthase (Corvest *et al.*, 2005). L'activité de ce complexe est inhibée par l'oligomycine.

Une fois synthétisé, l'ATP<sup>4-</sup> matriciel va être échangé contre l'ADP<sup>3-</sup> cytosolique par le transporteur des nucléotides adényliques (ANT). Ce dernier est localisé dans la membrane interne mitochondriale et est composé de deux monomères de 30 kDa chacun constitué de 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires. Chez l'homme, il existe trois isoformes d'ANT codées par trois gènes nucléaires distincts. L'isoforme ANT1 est tissu-spécifique et est majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur, l'ANT2 est exprimée dans les cellules en forte prolifération tandis que l'ANT3 est ubiquitaire (Stepien *et al.*, 1992). Comme pour l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire, l'importance physiologique de l'ANT est soulignée par l'existence de myopathies et d'ophtalmoplégies liées à des mutations entraînant un dysfonctionnement de l'ANT (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2006). L'atractyloside est un inhibiteur compétitif de l'ANT tandis que le carboxyatractyloside et l'acide bongkrékie sont des inhibiteurs non compétitifs.



### c. Les supercomplexes mitochondriaux

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de « supercomplexes », regroupant certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces unités fonctionnelles ont été révélées par des expériences de co-immunoprécipitation et d'électrophorèse sur gel en condition native (Blue-Native PAGE) (Shägger et Pfeiffer, 2000). Certaines expériences avaient préalablement montré que l'activité de transport d'électrons est modulée en fonction de la stœchiométrie des complexes OXPHOS (Ragan et Heron, 1978). De plus, des mutations de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire sont capables d'affecter la stabilité d'autres complexes (Acin-Perez *et al.*, 2004). Les complexes I, III, IV et V ont été retrouvés dans ces « supercomplexes » sous quatre formes différentes.

- Le supercomplexe I+III<sub>2</sub>

C'est le premier à avoir été analysé sur le plan structural. Il forme une interaction particulièrement stable chez la plante *Arabidopsis thaliana* et a donc été caractérisé chez cet organisme (Dudkina *et al.*, 2005). Il résulte d'une association latérale entre un dimère de complexe III et la partie membranaire du complexe I qui est repliée autour du dimère. Cette partie membranaire est plus longue chez *Arabidopsis* ce qui explique la stabilité du supercomplexe.

- Le supercomplexe III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>

Il a été mis en évidence chez la levure (Cruciat *et al.*, 2000). Il est composé de deux monomères de complexe IV associés à un dimère central de complexe III. Ce supercomplexe existe également sous une forme où un seul monomère de complexe IV est associé au dimère de complexe III.

- Le supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> (*cf.* figure 20)

Il représente la plus grande association existant entre les complexes de la chaîne respiratoire et est également appelé « respirasome » (Schägger et Pfeiffer, 2000). Les premières indications concernant l'architecture de ce supercomplexe ont été rapportées récemment chez le bœuf (Schäfer *et al.*, 2006). Comme pour le supercomplexe I + III<sub>2</sub>, le dimère de complexe III est associé latéralement à la partie membranaire du complexe I. Le complexe IV est associé à l'extrémité de la partie membranaire du complexe I mais interagit aussi latéralement avec le dimère de complexe III ce qui stabilise la structure.

- Le dimère d'ATP synthase

Il a été décrit pour la première fois chez la levure (Arnold *et al.*, 1998). Ce supercomplexe comporte trois sous-unités spécifiques de cet assemblage en dimère, les sous-unités e, g et k. Il a été montré que la délétion du gène codant pour la sous-unité g empêche la dimérisation de l'ATP synthase mais altère également l'ultrastructure mitochondriale et plus particulièrement la structure des crêtes formées par la membrane interne (Paumard *et al.*, 2002 ; Giraud *et al.*, 2002). Dès lors, il a été suggéré que l'assemblage de l'ATP synthase en dimère participe à la formation des crêtes mitochondriales. L'interaction entre les monomères d'ATP synthase se fait au niveau des domaines membranaires F<sub>0</sub>. Certains travaux ont également permis de mettre en évidence des oligomères d'ATP synthase (Krause *et al.*, 2005 ; Wittig et Schägger, 2005).

L'organisation supramoléculaire des complexes OXPHOS semble jouer un rôle fonctionnel majeur. Ces associations permettent d'augmenter la vitesse de transfert des électrons, interviennent dans l'ultrastructure de la membrane interne mitochondriale, augmentent la stabilité des complexes et leur capacité d'insertion dans la membrane interne (Boekema et Braun, 2007). Cependant, la différence de quantité de chacun des complexes suggère la coexistence de supercomplexes et de complexes isolés, ce qui semble intervenir dans la régulation du fonctionnement des OXPHOS. Les facteurs permettant la formation de ces supercomplexes ne sont pas bien connus mais il a été montré que la présence de cardiolipines est nécessaire (Zhang, *et al.*, 2002 ; Zhang, *et al.*, 2005b). Le fait que les interactions se fassent au niveau des domaines membranaires des complexes renforcent l'importance de la composition lipidique membranaire.

Il est intéressant de souligner que le complexe II ne fait partie d'aucun supercomplexe décrit à ce jour. Cependant, il a été montré par co-immunoprécipitation une association physique entre les sous-unités catalytiques SDH A et B du complexe II et la sous-unité  $\alpha$  du domaine catalytique F<sub>1</sub> de l'ATP synthase. L'ANT, le transporteur de phosphate inorganique (PIC) et la protéine mABC1 (mitochondrial ATP binding cassette 1) ont également été co-précipités (Ardehali *et al.*, 2004) (*cf.* figure 21). L'utilisation d'une fraction enrichie de membrane interne mitochondriale contenant les complexes II et V, l'ANT, PIC et mABC1 a permis de reconstituer le complexe dans des protéoliposomes. Il a alors été mis en évidence une activité de transport de potassium sensible aux modulateurs du canal potassique

mitochondrial sensible à l'ATP (mKATP) (Ardehali *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que le mKATP dont l'existence est controversée du fait de l'absence d'identité moléculaire, est constitué de ces protéines.

#### *d. Le canal potassium mitochondrial sensible à l'ATP (mK<sub>ATP</sub>)*

Le mK<sub>ATP</sub> fait partie de la famille des canaux potassiques à rectification entrante (K<sup>+</sup> inward rectifier) c'est-à-dire qu'il favorise les flux potassiques entrants par rapport aux flux sortants. Il est inhibé par l'ATP ce qui lui confère un rôle de senseur métabolique. Des canaux K<sub>ATP</sub> sont également retrouvés à la membrane plasmique des cellules et constituent les K<sub>ATP</sub> de surface. Ces canaux sont beaucoup mieux caractérisés que les mK<sub>ATP</sub> sur le plan structural. Ils forment un complexe octamérique composé de sous unités Kir 6.x (K<sup>+</sup> inward-rectifying) et d'un récepteur membranaire aux sulfonyles (SUR) appartenant à la famille des protéines ABC (ATP-binding cassette). Ces canaux K<sub>ATP</sub> furent d'abord découverts au niveau du cœur (Noma, 1983) puis retrouvés dans de nombreux tissus tels que les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Rorsman *et al.*, 1985), les muscles lisses et striés squelettiques (Standen *et al.*, 1989), le système nerveux central (Ashford *et al.*, 1988) et le rein (Hunter *et al.*, 1988). Ils interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la sécrétion d'insuline, l'excitabilité musculaire, cardiaque et neuronale. Les canaux K<sub>ATP</sub> furent par la suite retrouvés au niveau mitochondrial (Inoue *et al.*, 1991) et plus récemment au niveau nucléaire (Zhuo *et al.*, 2005).

Depuis leur découverte en 1991, de nombreuses études ont permis de caractériser les canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux sur le plan fonctionnel et pharmacologique mais leur structure exacte n'a toujours pas été clairement établie. Ce canal est donc sujet à controverse malgré les travaux supportant son existence (Foster *et al.*, 2008). Il a été proposé que leur structure soit identique à celle des canaux K<sub>ATP</sub> de surface. Cependant, aucune sous-unité SUR n'a été localisée à la mitochondrie et malgré la localisation de sous-unités Kir6.1 dans les mitochondries de plusieurs tissus (muscle, foie, cerveau et cœur), leur implication dans le fonctionnement du canal reste discutée (Seharaseyon *et al.*, 2000). Ces canaux ont été découverts grâce à des expériences de patch clamp réalisées sur des mitoplastes (mitochondries sans membrane externe) de foie de rat. Un courant sélectif aux ions K<sup>+</sup> et inhibable par la présence d'ATP dans la matrice mitochondriale a été identifié. Ce courant possède les mêmes caractéristiques que le courant généré par les canaux K<sub>ATP</sub> de la membrane plasmique et est bloqué par l'inhibiteur des canaux potassiques 4-aminopyridine et par le

glibenclamide (Inoue *et al.*, 1991). Le 5-hydroxydécanoate de sodium (5-HD) est un inhibiteur spécifique des canaux  $mK_{ATP}$  tandis que le diazoxide est un activateur.

L'intérêt porté aux  $mK_{ATP}$  est surtout lié à leur implication dans le mécanisme de préconditionnement ischémique tant au niveau du cœur (Garlid *et al.*, 2003) que du cerveau (Liu *et al.*, 2003) ou de la rétine (Roth *et al.*, 2006). Ce préconditionnement ischémique correspond au fait qu'une brève ischémie induit une protection endogène qui s'exprime lors d'une ischémie prolongée consécutive, en limitant les effets délétères de cette seconde ischémie. Le rôle du  $mK_{ATP}$  dans le préconditionnement a été mis en évidence grâce à l'utilisation de bloqueurs des canaux qui abolissent la protection procurée par le préconditionnement ischémique (Munch-Ellingsen *et al.*, 2000). En revanche, de nombreuses études ont montré que leurs activateurs, notamment le diazoxide, miment l'effet du préconditionnement ischémique (Liu *et al.*, 1998 ; Feng *et al.*, 2002 ; Ala-Rami *et al.*, 2003). Les signaux impliqués dans l'ouverture des canaux  $mK_{ATP}$  conduisent à l'activation de la voie PI3-kinase/Akt et à la phosphorylation de la NO synthase endothéliale (eNOS). Une fois phosphorylée, la eNOS produit du NO, ce qui active la guanylyl cyclase et entraîne la production de GMPc. Ce dernier active ensuite la protéine kinase G (PKG) (Oldenburg *et al.*, 2004 ; Costa *et al.*, 2008). La PKG transmet alors le signal protecteur du cytosol à la membrane interne mitochondriale et ouvre le  $mK_{ATP}$  via la protéine kinase c epsilon (PKC $\epsilon$ ) (Costa *et al.*, 2005 ; Jaburek *et al.*, 2006 ; Hassouna *et al.*, 2004 ; Raval *et al.*, 2007).

Le mécanisme de protection induit par l'ouverture du  $mK_{ATP}$  n'est pas encore élucidé. Cependant, trois hypothèses majeures ont été proposées (Ardehali et O'Rourke, 2005). L'ouverture du  $mK_{ATP}$  provoque la production de ROS (Pain *et al.*, 2000 ; Forbes *et al.*, 2001). La première hypothèse suggère que l'augmentation des ROS constitue un signal protecteur dépendant des PKC (Oldenburg *et al.*, 2003). La deuxième hypothèse est liée au fait que l'ouverture du  $mK_{ATP}$  limite l'accumulation de calcium dans la mitochondrie (Holmuhamedov *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2001), et de ce fait prévient l'ouverture du pore de transition de perméabilité (Murata *et al.*, 2001). Ceci expliquerait l'effet anti-apoptotique du  $mK_{ATP}$ . La troisième hypothèse est liée au gonflement de la matrice mitochondriale suite à l'ouverture du  $mK_{ATP}$ . Le gonflement matriciel empêcherait la contraction de la matrice, phénomène délétère pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kowaltowski *et al.*, 2001) et favoriserait le rapprochement des membranes mitochondriales interne et externe permettant l'augmentation du transport d'ADP et de la synthèse de l'ATP

nécessaire lors de la reperfusion (Garlid, 2000 ; Dos Santos *et al.*, 2002 ; Wakahara *et al.*, 2004).

## **B. Régulation des phosphorylations oxydatives**

Le système des phosphorylations oxydatives requiert l'expression coordonnée de gènes mitochondriaux et nucléaires. Cette coordination fait intervenir des facteurs de transcription tels que NRF1 et NRF2, et des co-activateurs transcriptionnels, qui régulent l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales mais également de facteurs impliqués dans la répllication et la transcription mitochondriale. Ces voies de régulations transcriptionnelles ne seront pas développées ici mais il est important de noter que parmi les co-activateurs, PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ -co-activator 1) est un facteur essentiel dans la régulation coordonnée du programme de biogénèse mitochondriale et du métabolisme cellulaire. Une voie de signalisation impliquant ce co-activateur et un membre de la famille des sirtuines, SIRT1, a été mise en évidence (Nemoto *et al.*, 2005). SIRT1 est une désacétylase NAD-dépendante. La désacétylation de PGC-1 $\alpha$  par SIRT1 va augmenter son activité transactivatrice.

En plus de cette régulation transcriptionnelle, les phosphorylations oxydatives sont régulées au niveau de la respiration mitochondriale et du taux de synthèse d'ATP mais également au niveau de l'efficacité de cette synthèse d'ATP.

### **1. Contrôle de la respiration mitochondriale**

Dès les années 1950, les travaux de Chance et Williams ont permis d'établir une relation entre la vitesse de respiration et la concentration en ADP (Chance et Williams, 1956). La dépendance de la vitesse de consommation d'oxygène vis-à-vis de la disponibilité en ADP et donc de l'utilisation de l'ATP est appelée « contrôle respiratoire ». Ce contrôle permet aux mitochondries d'adapter leur fonctionnement à la demande énergétique cellulaire. Ce mécanisme a été mis en évidence par le fait que la respiration des mitochondries isolées est stimulée en présence d'ADP (état 3) puis diminue au fur et à mesure de la conversion de l'ADP en ATP. Le rapport de contrôle respiratoire est donc défini par le rapport de la vitesse de respiration en présence d'ADP par la respiration avant son ajout. En plus du taux d'ADP, d'autres substrats de la chaîne respiratoire exercent un contrôle sur la respiration. Ainsi le ratio NADH/NAD<sup>+</sup> et la concentration en oxygène ont été montrés comme étant des paramètres importants (Erecinska *et al.*, 1982). Sur le principe selon lesquels les étapes

fonctionnant au voisinage de l'équilibre thermodynamique sont dépourvues de tout contrôle, il a été proposé que le complexe IV et l'ANT, au niveau desquels se déroulent les étapes les plus limitantes pour le fonctionnement des OXPHOS, soient les sites majeurs de contrôle respiratoire. Cependant, les mécanismes de contrôle des phosphorylations oxydatives sont beaucoup plus complexes et impliquent plusieurs étapes de ce système susceptibles de varier en fonction des conditions métaboliques (Groen *et al.*, 1982).

## **2. Régulation du rendement des phosphorylations oxydatives**

Il existe un couplage chimio-osmotique par la force protonmotrice entre la respiration et la phosphorylation mitochondriale (Mitchell, 1961). Ce couplage n'est cependant pas parfait. Il détermine l'efficacité des phosphorylations oxydatives appréciée par la mesure du rapport du taux de synthèse d'ATP par la quantité d'oxygène consommée (ATP/O). L'efficacité peut être diminuée par une baisse de la force protonmotrice liée une augmentation de la conductance de la membrane interne aux protons (« découplage extrinsèque »), par une baisse d'efficacité des pompes à protons (« découplage intrinsèque »), ou varier en fonction de la nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire (Rigoulet *et al.*, 1998).

### **a. Le découplage extrinsèque**

Le découplage extrinsèque implique tous les mécanismes qui augmentent la perméabilité de la membrane interne aux protons ou aux cations, provoquant ainsi une dissipation du gradient de protons. Dans ces conditions, une partie des protons retourne dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase et donc sans participer à la synthèse d'ATP. Le gradient de protons est alors dissipé sous forme de chaleur et participe à la thermogénèse. La consommation d'oxygène est donc augmentée afin de compenser cette « fuite de protons » et ainsi maintenir la force protonmotrice. Il existe deux types de fuite de protons : la fuite basale et la fuite inductible.

- **La fuite de protons basale**

La fuite de protons basale est présente dans les mitochondries de tous les tissus et varie selon les espèces (Brand *et al.*, 1991). Elle semble jouer un rôle physiologique très important puisqu'elle représente environ 20% de la respiration cellulaire totale des hépatocytes chez les mammifères (Porter et Brand, 1995). Bien que les causes de cette fuite ne soient pas totalement élucidées, elle semble liée aux propriétés physicochimiques de la

membrane interne. Ainsi, il existe une corrélation entre la perméabilité membranaire aux protons et sa composition lipidique, l'intensité de la fuite étant plus faible en présence d'acides gras mono-insaturés alors qu'elle croît avec l'index d'insaturation des acides-gras composant les phospholipides de la membrane (Porter *et al.*, 1996 ; Brookes *et al.*, 1998). Il a été démontré que la fuite basale est proportionnelle à la quantité de cardiolipines (Bobyleva *et al.*, 1997). La surface de la membrane mitochondriale interne est également un paramètre déterminant l'intensité de la fuite puisque cette dernière augmente avec la surface membranaire (Brand *et al.*, 1992). En plus des propriétés physicochimiques de la membrane, l'hypothèse que des protéines soient impliquées dans la fuite basale a été émise. Une étude réalisée chez la levure a permis de montrer que l'inactivation de 21 des 35 transporteurs de la membrane interne n'a pas d'influence sur la fuite de protons (Roussel *et al.*, 2002). Cependant, il a ensuite été démontré que la quantité d'ANT influence l'intensité de la fuite de protons indépendamment de son activité de transport d'ADP et d'ATP. En effet, la conductance de la membrane interne aux protons est diminuée de 50% dans le muscle de souris knockout ANT1<sup>-/-</sup>. Inversement, la surexpression de l'ANT chez la drosophile augmente la conductance aux protons même lorsque son activité est inhibée par le carboxyatractyloside (Brand *et al.*, 2005). De plus, il a été montré qu'une partie de la fuite basale des mitochondries du tissu adipeux brun est liée à l'ANT et que l'ANT1 serait responsable de cette fuite (Shabalina *et al.*, 2006).

- La fuite de protons inductible

La fuite de protons inductible est liée à la présence, dans la membrane interne, de protéines qui catalysent la translocation de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. A la différence de la fuite de proton basale, elle n'est présente que dans les mitochondries de certains tissus. Cette fuite de protons inductible a initialement été décrite dans le mécanisme de thermogénèse du tissu adipeux brun par la présence de la protéine UCP1 (uncoupling protein 1) (Nicholls et Locke, 1984). Des isoformes UCP2 à 5 ont par la suite été identifiées sur la base de leur homologie avec UCP1 (Fleury *et al.*, 1997 ; Boss *et al.*, 1997 ; Mao *et al.*, 1999 ; Sanchis *et al.*, 1998). Les UCPs sont régulées au niveau transcriptionnel mais également au niveau de leur activité. Il a d'ailleurs été montré des divergences entre le contenu en ARNm et en protéine (Pecqueur *et al.*, 2001). Les acides gras sont des activateurs du découplage induit par les UCPs alors que les nucléotides phosphate l'inhibent. Cependant, le mode d'action de la protéine UCP1 n'a pas encore été clairement établi. Cette protéine fonctionnerait soit comme un canal protonique prenant en charge le

proton grâce à un acide gras ionisé (Klingenberg *et al.*, 1999 ; Rial *et al.*, 2004), soit comme un transporteur d'acides gras anioniques prenant en charge un proton, ce dernier leur permettant de franchir la bicouche lipidique dans l'autre sens (Skulachev, 1991 ; Jezek *et al.*, 1994 ; Breen *et al.*, 2006). Les UCP2 et 3 possèdent une activité comparable à celle d'UCP1 (Jaburek *et al.*, 1999). Elles interviennent dans le transport de protons activé par les acides gras et inhibé par les nucléotides phosphates (Echtay *et al.*, 2001 ; Jaburek et Garlid, 2003). De plus, leur surexpression chez la levure induit un découplage partiel qui se traduit par une baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Fleury *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études montrent qu'il n'y a pas de relation entre l'expression de ces protéines et un découplage des OXPHOS (Stuart *et al.*, 2001 ; Cadenas *et al.*, 2002 ; Hesselink *et al.*, 2003). Il a donc été suggéré que leur implication dans le découplage soit liée à leur surexpression dans des proportions supérieures aux niveaux physiologiques. Ce rôle reste donc à être démontré *in vivo*. De plus, contrairement à UCP1, les protéines UCP2 et 3 ne semblent pas impliquées dans la thermogénèse (Arsenijevic *et al.*, 2000 ; Vidal-Puig *et al.*, 2000). En revanche, de nombreuses études montrent un rôle de ces protéines dans la régulation de la production de ROS. Ce rôle est basé sur le fait qu'un découplage léger entraînant une faible diminution du potentiel de membrane mitochondrial diminue fortement la production de ROS sans affecter la production énergétique (Starkov, 2006). Ce rôle a d'abord été mis en évidence pour la protéine UCP2 (Negre-Salvayre *et al.*, 1997). Par la suite, il a été montré que l'inactivation des gènes UCP2 et 3 chez des souris knockout augmente la production de ROS (Arsenijevic *et al.*, 2000 ; Vidal-Puig *et al.*, 2000). Finalement, il a été proposé que la régulation des ROS par les UCPs fonctionne par rétrocontrôle négatif, les ROS activant les UCP2 et 3 qui en retour vont limiter leur production (Brand *et al.*, 2004). Il a d'ailleurs été montré que l'augmentation du taux d'anion superoxyde endogène stimule la peroxydation des lipides et conduit à la production de 4-hydroxynonanal qui est un activateur des UCP2 et 3 (Echtay *et al.*, 2007).

D'autres protéines ont été impliquées dans la fuite de protons inductible. Le rôle de l'ANT a été mis en évidence pour la première fois en 1990 dans des mitochondries de foie (Brustovetsky *et al.*, 1990). Il a plus récemment été montré qu'une partie de la fuite des mitochondries du tissu adipeux brun est liée à l'ANT et que l'ANT2 serait impliquée dans la fuite induite par les acides gras (Shabalina *et al.*, 2006). La fuite de protons inductible par les acides gras a été mise en évidence pour l'ANT mais également pour le transporteur glutamate/aspartate (Samartsev *et al.*, 1997b ; Wojtczak et Wieckowski, 1999).



### **b. Le découplage intrinsèque**

Le découplage intrinsèque implique tous les mécanismes entraînant une diminution de l'efficacité des pompes à protons, c'est-à-dire une diminution de la stœchiométrie proton/électron ( $H^+/e^-$ ) ou une augmentation de la stœchiométrie protons/ATP ( $H^+/ATP$ ). Ce découplage est également appelé « patinage » des pompes à protons ou « slipping ».

#### ▪ Stœchiométrie $H^+/e^-$

La translocation des protons par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire se fait avec une stœchiométrie variable, c'est-à-dire avec une variation du nombre de protons pompés par électron transféré (Kadenbach, 2003). Le patinage des pompes à protons entraîne une diminution du nombre de protons transloqués vers l'espace inter-membranaire pour le transfert d'un même nombre d'électrons vers l'oxygène à travers la chaîne respiratoire. Cette baisse du nombre de protons transloqués entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène pour maintenir un même potentiel de membrane. Bien que ce patinage soit théoriquement possible au niveau de chacune des pompes à protons, il semble qu'*in vivo*, seul le complexe IV soit impliqué dans ce type de découplage (Papa *et al.*, 1991 ; Capitanio *et al.*, 1991). Plusieurs facteurs interviennent dans ce patinage du complexe IV. L'augmentation du potentiel de membrane (Murphy et Brand, 1987) ou du ratio ATP/ADP (Frank et Kadenbach, 1996) diminuent la stœchiométrie  $H^+/e^-$ . De plus, les isoformes tissus-spécifiques des sous-unités composant le complexe IV (Huttemann *et al.*, 2000) ou le nombre de cytochrome dans ce complexe influencent le patinage (Nogueira *et al.*, 2001).

#### ▪ Stœchiométrie $H^+/ATP$

Le nombre de molécules d'ADP phosphorylées par proton passant dans le complexe ATP synthase (stœchiométrie  $H^+/ATP$ ) n'est pas constant (Kadenbach, 2003). Par conséquent, pour une même consommation d'oxygène, l'efficacité de phosphorylation est diminuée puisqu'il faut un retour plus important de protons pour synthétiser la même quantité d'ATP. Ce patinage a été montré *in vitro* dans des mitochondries de foie de rat (Rigoulet *et al.*, 1990) mais son importance physiologique reste méconnue.

### **c. Nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire**

Les électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire sont fournis au niveau du complexe I par le  $NADH+H^+$  et au niveau du complexe II par le  $FADH_2$ . Les

électrons issus de l'oxydation du NADH sont transférés au travers de trois sites où les réactions d'oxydo-réductions sont couplées à un transport de protons au travers de la membrane mitochondriale interne (site de couplage), les complexes I, III et IV. En revanche, le complexe II n'intervient pas dans la translocation des protons. Les électrons issus de l'oxydation du FADH<sub>2</sub> sont donc transférés au travers de deux sites de couplage, les complexes III et IV. Ainsi, lors de l'oxydation du FADH<sub>2</sub>, la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> pour l'ensemble de la chaîne respiratoire est inférieure à celle de l'oxydation du NADH (Leverve *et al.*, 2007). La nature des substrats cellulaires influence également l'efficacité des phosphorylations oxydatives en modulant le ratio NADH/FADH<sub>2</sub>. L'oxydation des glucides fournit essentiellement du NADH alors que l'oxydation des acides gras fournit au final plus de FADH<sub>2</sub> que de NADH (Leverve *et al.*, 2007). Le cycle de Krebs qui est commun au métabolisme lipidique et glucidique fournit 3 NADH pour 1 FADH<sub>2</sub>. Le ratio NADH/FADH<sub>2</sub> et donc l'efficacité de synthèse d'ATP sont supérieurs pour l'oxydation des glucides que pour l'oxydation des lipides. Ainsi, dans des conditions limitantes en oxygène, le glucose est préférentiellement utilisé pour permettre une meilleure efficacité de synthèse d'ATP. A l'inverse, les lipides sont préférentiellement utilisés dans des conditions saturantes d'oxygène (Korvald *et al.*, 2000).

## **V. Problématique de la thèse**

Un des principaux sujets d'étude du laboratoire est l'exploration des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans les neuropathies héréditaires associées aux mutations de gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement aux gènes *OPA1* et *MFN2* impliqués dans la fusion mitochondriale, dont les mutations sont liées respectivement à une neuropathie optique, l'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) et à une neuropathie périphérique sensitivo-motrice, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A). Du fait de l'interdépendance existant entre la structure du réseau et la fonction énergétique mitochondriale, nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit énergétique puisse intervenir dans la physiopathologie de l'ADOA et de la CMT2A.

Pour tester et approfondir cette hypothèse, nous avons utilisé deux modèles d'étude principaux. Le premier est un modèle cellulaire, le fibroblaste. Nous avons constitué une

banque de fibroblastes cutanés collectés chez des sujets sains et chez des patients atteints d'ADOA et de CMT2A. Ces fibroblastes représentent un modèle intéressant pour notre étude puisque ce sont des cellules riches en mitochondries qui peuvent être prélevées de manière non-invasive. De plus, ces cellules expriment souvent des déficits de la chaîne respiratoire chez les patients porteurs de mutations de l'ADNmt. Elles sont donc largement utilisées pour étudier la fonction énergétique mitochondriale et constituent à l'heure actuelle un modèle admis pour l'étude des pathologies mitochondriales. Le second modèle que nous avons utilisé est un modèle murin de CMT2A. Ces souris expriment, sous le contrôle d'un promoteur neuronal, le cDNA humain du gène *MFN2* porteur de la mutation p.R94Q qui est la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de CMT2A. De plus, elles présentent une faiblesse musculaire distale, principal signe clinique retrouvé chez les patients, et une atrophie axonale dans la partie distale du nerf sciatique. Grâce à ce modèle, nous avons pu poursuivre notre étude sur des cellules neuronales qui correspondent au type cellulaire affecté dans la CMT2A.

La mesure des paramètres fonctionnels mitochondriaux (mesure de la consommation d'oxygène et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire), l'étude de l'expression de gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire ou impliqués dans la régulation du métabolisme mitochondrial et l'étude de la morphologie mitochondriale par microscopie à fluorescence ont permis de mettre en évidence des dérégulations métaboliques majeures dans ces pathologies et de souligner l'importance de la fonction énergétique mitochondriale pour la survie neuronale.

# RESULTATS ET DISCUSSION

# **I. ADOA et Métabolisme énergétique mitochondrial**

## **Article 1:**

### **Hereditary Optic Neuropathies Share a common mitochondrial coupling defect.**

Chevrollier A\*, Guillet V\*, Loiseau D, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Verny C, Ferre M, Dolfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P. \*Contribution égale de ces auteurs. *Ann Neurol.* 2008 Jun; 63(6):794-8.

## **Article 2:**

### **Ethambutol-Induced Optic Neuropathy Linked to OPA1 Mutation and Mitochondrial Toxicity.**

Guillet V\*, Chevrollier A\*, Cassereau J, Letournel F, Gueguen N, Richard L, Verny C, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D. \*Contribution égale de ces auteurs  
Soumis à PLoS ONE.

## **A. Introduction**

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'impact des mutations du gène *OPA1* sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Ce gène code une protéine de la membrane interne impliquée dans le processus de fusion des mitochondries, dans le remodelage des crêtes et dans la protection contre l'apoptose (Olichon *et al.*, 2003 ; Cipolat *et al.*, 2004). Les mutations du gène *OPA1* sont responsables d'une neuropathie optique héréditaire appelée atrophie optique autosomique dominante (ADOA) (Delettre *et al.*, 2000 ; Alexander *et al.*, 2000).

L'ADOA ainsi que la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), sont les deux formes les plus fréquentes d'atrophie optique d'origine génétique. Cependant, alors que le gène *OPA1* mis en cause dans l'ADOA est un gène nucléaire, les gènes responsables de LHON sont des gènes mitochondriaux codant pour les sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Wallace *et al.*, 1988). Ces mutations ont des répercussions sur l'activité de ce complexe et donc sur le métabolisme énergétique mitochondrial. En effet, une diminution de l'activité du complexe I associée à une baisse de la synthèse d'ATP en présence des substrats de ce complexe ont été retrouvées dans les leucocytes et dans une biopsie

musculaires de patients atteints de LHON (Oostra *et al.*, 1995 ; De Vries *et al.*, 1996). Un déficit de production d'ATP a aussi été retrouvé dans les muscles squelettiques de patients atteints d'ADOA, *in vivo*, par imagerie par résonance magnétique (Lodi *et al.*, 2004). L'ADOA et la LHON ont une présentation clinique très similaire et impliquent toutes deux des protéines de la membrane interne mitochondriale. Une forme plus rare d'atrophie optique autosomique dominante associée à une cataracte (ADOAC) est liée aux mutations du gène *OPA3* (Reynier *et al.*, 2004). Ce gène code une protéine également localisée à la membrane interne mitochondriale. Ces données nous ont permis de suggérer pour ces trois maladies l'existence d'un mécanisme pathogène commun impliquant une altération de la fonction énergétique mitochondriale. Nous avons donc réalisé une étude comparative du métabolisme énergétique et de la structure du réseau mitochondrial de fibroblastes de patients atteints d'ADOA, d'ADOAC et de LHON. Nous avons également exploré les fibroblastes de patients atteints des formes « ADOA plus » et « LHON plus » de ces maladies, caractérisées par un phénotype clinique plus sévère. Ces patients présentent une atrophie optique associée à des symptômes neurologiques plus larges (ataxie, surdité neuro-sensorielle, neuropathie sensitivo-motrice et myopathie, épilepsie...). Cette étude fait l'objet du premier article de la thèse.

Suite à ce travail, nous nous sommes intéressés au cas d'un patient porteur de la mutation p.I382M du gène *OPAI* dont les signes cliniques d'ADOA sont apparus suite à un traitement contre la tuberculose. Ce traitement repose sur la prise d'une association d'antibiotiques dont l'éthambutol. L'éthambutol conduit parfois à des effets secondaires dont le principal est une névrite optique généralement réversible, justifiant une surveillance ophtalmologique systématique. Cette réversibilité est controversée, d'autant plus qu'il a été rapporté récemment que l'éthambutol est responsable de 100.000 nouveaux cas de cécité chaque année dans le monde (Sadun and wang, 2008). Les causes de la toxicité oculaire de l'éthambutol ne sont pas clairement identifiées. Il a été montré qu'une excitotoxicité du glutamate était à l'origine de la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine induite par l'éthambutol chez le rat (Heng *et al.*, 1999). De plus il a été suggéré que la toxicité pouvait être liée à l'effet chélateur de l'éthambutol vis-à-vis des cations métalliques (Shepherd *et al.*, 1966) dont certains sont essentiels au métabolisme mitochondrial. Cependant, il a été montré que ni l'excitotoxicité du glutamate, ni la chélation du zinc ne sont à l'origine de ces effets secondaires, mais qu'au contraire, ils dépendent du zinc intracellulaire (Yoon *et al.*, 2000). Il est important de noter que plusieurs cas de LHON sont survenus au

cours d'un traitement par éthambutol (Dotti *et al.* 1998 ; De marinis, 2001 ; Hwang *et al.*, 2003 ; Ikeda *et al.*, 2006), ce qui suggère qu'une altération de la fonction mitochondriale peut favoriser la toxicité oculaire induite par l'éthambutol. Nous avons donc étudié l'effet de l'éthambutol sur le fonctionnement des phosphorylations oxydatives et sur la structure du réseau mitochondrial dans des fibroblastes de sujets sains (contrôles) et dans une lignée cellulaire neuronale, les cellules PC12, issues d'un phéochromocytome de rat (tumeur neuroendocrine). Nous avons également étudié les fibroblastes du patient porteur de la mutation p.I382M afin de déterminer si leurs caractéristiques biochimiques sont identiques à ceux des autres patients atteints d'ADOA et si la mutation du gène *OPA1* entraîne une sensibilité des fibroblastes vis-à-vis de l'éthambutol.

B. Article n°1

***Hereditary Optic Neuropathies Share a common mitochondrial coupling defect.***

*Arnaud Chevrollier\*, Virginie Guillet\*, Dominique Loiseau, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Marc Ferre, Hélène Dolfus, Sylvie Odent, Dan Milea, Cyril Goizet, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Pascal Reynier.*

*\*Contribution égale de ces auteurs.*

*Annals of Neurology*

*2008 Jun; 63(6): 794-8*



# Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect

Arnaud Chevrollier, PhD,<sup>1,2</sup> Virginie Guillet, BS,<sup>1</sup> Dominique Loiseau, PharmD,<sup>1,3</sup> Naïg Gueguen, PhD,<sup>1,2</sup> Marie-Anne Pou de Crescenzo, PhD,<sup>1,3</sup> Christophe Verny, MD, PhD,<sup>1,4</sup> Marc Ferre, Eng,<sup>1,2</sup> Hélène Dollfus, MD, PhD,<sup>5</sup> Sylvie Odent, MD, PhD,<sup>6</sup> Dan Milea, MD, PhD,<sup>7</sup> Cyril Goizet, MD, PhD,<sup>8</sup> Patrizia Amati-Bonneau, MD,<sup>1,2</sup> Vincent Procaccio, MD, PhD,<sup>9</sup> Dominique Bonneau, MD, PhD,<sup>1-3</sup> and Pascal Reynier, MD, PhD<sup>1-3</sup>

Hereditary optic neuropathies are heterogeneous diseases characterized by the degeneration of retinal ganglion cells leading to optic nerve atrophy and impairment of central vision. We found a common coupling defect of oxidative phosphorylation in fibroblasts of patients affected by autosomal dominant optic atrophy (mutations of *OPA1*), autosomal dominant optic atrophy associated with cataract (mutations of *OPA3*), and Leber's hereditary optic neuropathy, a disorder associated with point mutations of mitochondrial DNA complex I genes. Interestingly, the energetic defect was significantly more pronounced in Leber's hereditary optic neuropathy and autosomal dominant optic atrophy patients with a more complex phenotype, the so-called plus phenotype.

Ann Neurol 2008;63:794-798

Hereditary optic neuropathies involve the degeneration of retinal ganglion cells that transmit visual signals from the retina to the lateral geniculus via the optic

From the <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U694; <sup>2</sup>Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire; <sup>3</sup>Université d'Angers; <sup>4</sup>Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers; <sup>5</sup>Laboratoire de Génétique Médicale EA 3949, Université Louis Pasteur, Strasbourg; <sup>6</sup>Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France; <sup>7</sup>Department of Ophthalmology, Glostrup Hospital, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; <sup>8</sup>Laboratoire de Génétique Humaine, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France; and <sup>9</sup>Department of Pediatrics, Center for Molecular and Mitochondrial Medicine and Genetics, University of California, Irvine, CA.

Received Oct 2, 2007, and in revised form Feb 20, 2008. Accepted for publication Feb 22, 2008.

A.C. and V.G. contributed equally to this work.

Published online May 21, 2008, in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.21385

Address correspondence to Dr Chevrollier, INSERM U694, Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France.  
E-mail: archevrollier@chu-angers.fr

nerves leading to a decreased visual acuity.<sup>1,2</sup> The two most frequent forms of optic neuropathies are Leber's hereditary optic neuropathy (LHON; MIM #535000) and autosomal dominant optic atrophy (ADOA; MIM #165500). LHON, a subacute bilateral optic atrophy, is associated with mitochondrial DNA point mutations that affect various subunits of mitochondrial respiratory chain complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase: ND).<sup>3</sup> ADOA is a progressive, bilateral optic atrophy. Mutations in the optic atrophy 1 (*OPA1*) gene are implicated in about 60 to 80% of cases.<sup>4-8</sup> *OPA1* encodes for a ubiquitous dynamin-related protein, anchored to the mitochondrial inner membrane involved in mitochondrial plasticity.<sup>9,10</sup> In some cases, the clinical phenotype is aggravated by additional neurological symptoms, the so-called plus phenotype,<sup>11-13</sup> and designated as LHON+ and ADOA+.

The third form of hereditary optic atrophy involving an identified gene concerns ADOA associated with cataract (ADOAC; MIM #165300). This rare form of optic atrophy is due to mutations in the *OPA3* gene, identified as responsible for the Costeff's syndrome (MIM #258501).<sup>14,15</sup> Like *OPA1*, *OPA3* is located in the mitochondrial inner membrane, but its function is unknown. An energetic impairment in ADOA, similar to that found in LHON, has been previously demonstrated in vivo by magnetic resonance imaging.<sup>16</sup> Here we compare the energetic metabolism and mitochondrial structure in fibroblasts obtained from 16 patients presenting various LHON, ADOA, and ADOAC phenotypes.

## Patients and Methods

### Patients

Established criteria of ADOA, ADOAC, and LHON were used to select patients included in this study. *OPA1* and *OPA3* gene analysis was performed by direct sequencing of the entire coding region. The mutations of *OPA1* gene (Patient A: c.1334\_G>A; p.R445H; Patient B: c.985-1\_G>A, splice defect; Patient C: exon5b; c.740\_G>A; p.R247H transcript variant 8; Patient D: c.1146\_A>G; p.I382M; Patient E: c.2708\_2711del4; p.V903fsX905; Patient F: c.2197\_C>T; p.R733X and c.2341\_C>T; p.R781W), *OPA3* gene (c.313\_C>G; p.Q105E), and mitochondrial DNA were identified in the Department of Biochemistry and Genetics of the University Hospital of Angers (Angers, France). All LHON mutations were homoplasmic. The ADOA+ patient<sup>13</sup> (c.1937\_C>T; p.S646L) and two LHON+ patients (14484\_T>C; p.M64V; 3460\_G>A; p.A52T) had optic atrophy associated with a multiple sclerosis-like syndrome. The other two LHON+ patients (11778\_G>A, p.R340H; 14484\_T>C, p.M64V) presented with severe, progressive cerebellar ataxia and ophthalmoplegia; one of these patients suffered from spastic paraparesis. Hypersignals of the brain white matter were evidenced on T2-weighted magnetic resonance imaging in the five patients.

### Primary Cultures

Fibroblasts were obtained from skin biopsies taken after written consent from patients in the university hospitals of Angers, Bordeaux, Rennes, Strasbourg, and Paris (Pitié-Salpêtrière) in France. The nonsenescent state of the cells was verified by  $\beta$ -galactosidase staining.<sup>17</sup>

### Bioenergetic Analysis

Respiratory parameters and the relative mitochondrial membrane potential were determined as described elsewhere.<sup>18</sup> Cellular adenosine triphosphate (ATP) content, after 48 hours in glucose-free media supplemented with 10mM galactose, were determined using CellTiter-Glo luminescent kit (Promega, Madison, WI).

### Deconvolution Microscopy

Mitochondria were labeled using 100nM Mitotracker (Molecular Probes, CA) according to manufacturer's instructions.

### Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using Mann-Whitney *U* tests.

## Results

### Oxidative Phosphorylation Complex Activities Vary with the Type of Hereditary Optic Neuropathy

In LHON fibroblast lysates, we found a mean decrease of 39% in complex I activity (complex I/citrate synthase: control subjects:  $0.18 \pm 0.04$ ; LHON:  $0.09 \pm 0.05$ ; LHON+:  $0.11 \pm 0.01$ ;  $p < 0.05$ ). To our knowledge, this is the first report of complex I alteration in skin fibroblasts from patients with the three main LHON mutations. In ADOA and ADOAC fibroblasts, complex I activity was unaltered compared with control subjects, but there was a mean 25% decrease in complex IV activity (cytochrome *c* oxidase/citrate synthase: control subjects:  $0.68 \pm 0.02$ ; ADOA:  $0.50 \pm 0.09$ ;  $p < 0.01$ ) together with a mean 60% increase in complex V (F1-ATPase) activity (complex V/citrate synthase: control subjects:  $0.10 \pm 0.03$ ; ADOA:  $0.17 \pm 0.04$ ;  $p < 0.01$ ).

### Leber's Hereditary Optic Neuropathy, Autosomal Dominant Optic Atrophy, and Autosomal Dominant Optic Atrophy Associated with Cataract Fibroblasts Share a Common Mitochondrial Coupling Defect

Intact cells manifest different respiratory states in physiologically controlled conditions, that is, routine phosphorylating respiration (with endogenous substrates), resting respiration (with oligomycin inhibiting ATP synthase), and maximal respiration corresponding to the respiratory chain capacity (with an uncoupler carbonyl cyanide 4-[trifluoromethoxy] phenylhydrazone [FCCP]). The LHON fibroblasts had a lower respiratory capacity than controls ( $9.7 \pm 1.7$  vs  $14.5 \pm 0.9$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg protein;  $p < 0.01$ ), and the resting respiration was about twice as high in all LHON,

ADOA and ADOAC fibroblasts compared with controls, reflecting a proton leak or electron slip. The decreased values of the ratio of FCCP-uncoupled respiration to resting respiration, that is, the respiratory control ratio (Fig 1A), attest to partial mitochondrial uncoupling. This concurs with the reduction of the mitochondrial membrane potential assessed by the fluorescent probe JC-1 ratio measured in LHON, ADOA, and ADOAC fibroblasts (see Fig 1B).

In permeabilized fibroblasts, ATP/O measurements also demonstrated a common reduction of oxidative

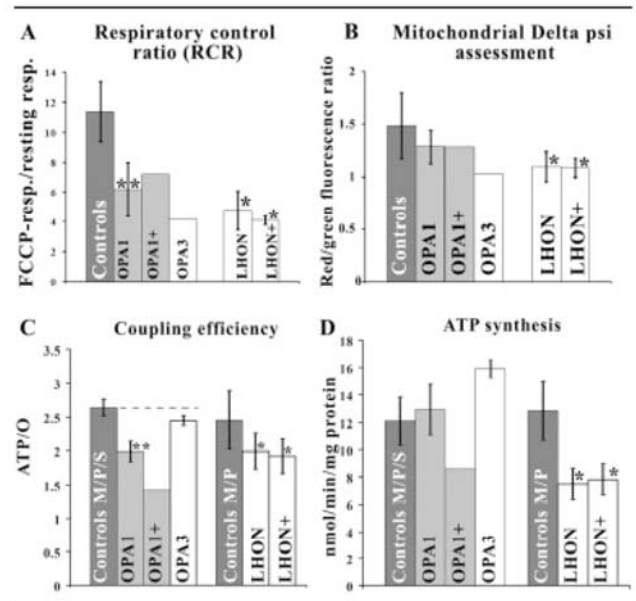


Fig 1. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), autosomal dominant optic atrophy (ADOA), and ADOA associated with cataract (ADOAC) share a common mitochondrial coupling defect. (A) In intact cells, the respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio of the carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)-uncoupled respiration, that is, the respiratory capacity, to the resting respiration, that is, the non-phosphorylating respiration. (B) The reduction of mitochondrial membrane potential was assessed using a spectrofluorometer with JC-1 as fluorochrome (5  $\mu$ g/ml). The reduction of both RCR and the Delta psi attest for a coupling defect. (C) In permeabilized cells, the coupling efficiency (adenosine triphosphate/oxygen [ATP/O]) was measured by polarography as the rate of nanomoles of ATP produced from ADP+Pi per nanomole of oxygen consumed by permeabilized cells. The efficiency of the respiratory chain was tested using malate/pyruvate (M/P) as substrates in LHON and LHON+ fibroblasts and malate/pyruvate/succinate (M/P/S) as substrates in ADOA and ADOAC fibroblasts. (D) The rate of mitochondrial ATP synthesis was measured by luminescence from aliquot samples in a polarographic chamber. Mitochondrial ATP production is maintained only in ADOA fibroblasts despite a reduction of the ATP/O ratio in LHON and ADOA cells. At least three independent measurements were performed on each sample. Statistical significance: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

phosphorylation efficiency in LHON, ADOA, and ADOAC fibroblasts (mean, 75%) (see Fig 1C). In LHON fibroblasts, the reduction of the respiratory capacity and the ATP/O ratio may compromise a compensatory mechanism of ATP synthesis that was sharply reduced in these cells (see Fig 1D). In contrast, ADOA fibroblasts appear to compensate the low efficiency of ATP synthesis because the level of ATP synthesis was similar to that of controls (see Fig 1D).

Figure 2A shows the negative correlation between the ATP/O ratio and complex V activity in ADOA fibroblasts, indicating that these fibroblasts may maintain their mitochondrial ATP synthesis by inducing increased F1-ATPase activity. No such correlation was found in the case of LHON fibroblasts.

In intact ADOA fibroblasts, in the absence of control by the phosphorylation system, the respiratory capacity varied linearly with maximal cytochrome c oxidase (COX) activity (see Fig 2B). COX capacity was not a limiting factor in electron transfer because it was largely in excess compared with the respiratory capacity (about threefold in affected fibroblasts and twofold in controls). In contrast, no such correlation was observed with LHON fibroblasts (data not shown).

The ratio of routine respiration, which reflects the ATP needs of the cell, to that of FCCP-uncoupled respiration indicated that LHON, ADOA, and ADOAC

cells used a greater proportion of their respiratory capacity than controls ( $87 \pm 9\%$ ,  $73 \pm 8\%$ , and  $79\%$ , respectively, vs  $60 \pm 10\%$  for controls). This suggests that the affected cells tended to compensate for partial uncoupling by higher electron transport in routine conditions.

*Leber's Hereditary Optic Neuropathy Plus and Autosomal Dominant Optic Atrophy Plus Fibroblasts Have a Worse Energetic Profile Than Leber's Hereditary Optic Neuropathy and Autosomal Dominant Optic Atrophy Fibroblasts*

Adjunction of galactose in the glucose-free medium preferentially induces a mitochondrial ATP synthesis rather than glycolytic production.<sup>3</sup> This metabolic change decreased cellular ATP content, from 100% in glucose medium to  $63.8 \pm 11.9\%$  in controls,  $69.7 \pm 8.3\%$  in ADOA,  $68.8\%$  in ADOAC, and  $63.1 \pm 10.1\%$  in LHON. The major decrease in ATP content occurred in fibroblasts from the four LHON+ patients ( $46.2 \pm 5.5\%$ ;  $p < 0.01$ ) and from the OPA1+ patient (55%). Moreover, as in the case of LHON+ fibroblasts, ADOA+ fibroblasts appear to have the weakest compensatory mechanism for mitochondrial ATP synthesis, that is, low routine respiration and respiratory capacity (see Fig 2B). Despite these observations, no significant additional defects of mitochondrial respiratory complex activity were found in LHON+ and ADOA+ fibroblasts.

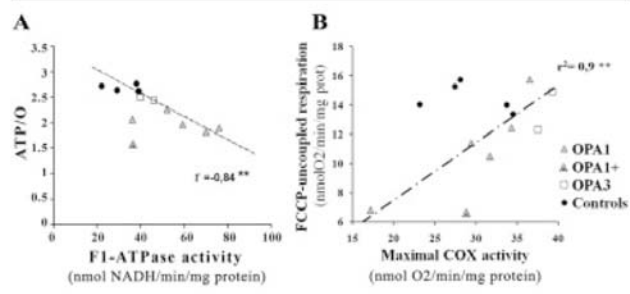


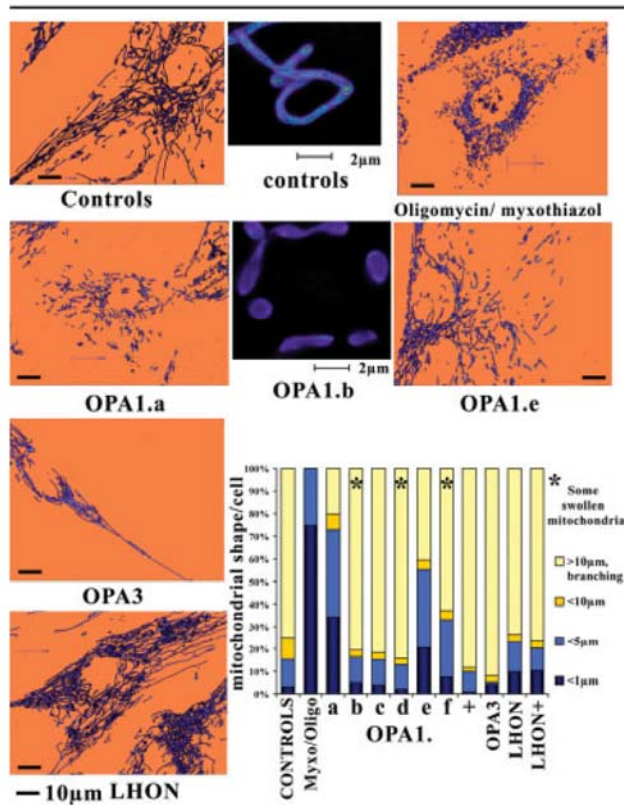
Fig 2. In autosomal dominant optic atrophy (ADOA) fibroblasts, the efficacy of adenosine triphosphate (ATP) synthesis varies inversely with complex V activity. (A) ATP/oxygen (ATP/O) ratios, determined in permeabilized cells, are shown plotted against measurements of F1-ATPase (complex V) activity on whole-cell extracts for ADOA/ADOA associated with cataract (ADOAC) fibroblasts. ADOA+ fibroblast data are shown (dotted triangle) but were not included in the calculation of correlation. (B) The respiratory capacities (FCCP-uncoupled respiration rates) of intact ADOA fibroblasts were correlated to the maximal cytochrome c oxidase (COX) activities, that is, COX capacities (N,N,N,N Tetramethyl-p-phenyldiimine [TMPD]-ascorbate respiration rates in intact cells). (A, B) ADOA, ADOAC, and control fibroblast data were used to calculate Pearson's correlation (r); statistical significance:  $**p < 0.01$ . No statistical correlation was found for LHON and control cells. Gray triangles denote optic atrophy 1 (OPA1); open squares denote OPA3; solid circles denote controls.

*Microscopic Studies of Fibroblasts from Patients with Hereditary Optic Atrophy Show No Systematic Alterations of Mitochondrial Network Morphology*

In ADOA fibroblasts, depending on the OPA1 mutation involved, the mitochondrial network varied from normal to highly fragmented. In contrast, LHON fibroblasts possessed an intricate network of highly interconnected mitochondria (Fig 3).

**Discussion**

This comparative analysis of mitochondrial energetic metabolism in fibroblasts from patients with LHON, ADOA, and ADOAC shows that these ophthalmological disorders share a common mitochondrial uncoupling associated with reduced efficiency of ATP synthesis. In the routine respiratory state, the affected fibroblasts use a greater proportion of their respiratory capacity than controls (80 vs 60%), thus retaining a low "reserve" capacity to face greater energy requirements. These defects are clearly related to complex I deficiency in LHON and are associated with impaired ATP production. In ADOA and ADOAC fibroblasts, the reduction of COX activity appears unlikely to be the primary cause of the mitochondrial defect because respiratory chain activity was readily stimulated by



**Fig 3.** Mitochondrial morphology in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), autosomal dominant optic atrophy associated with cataract (ADOAC), and autosomal dominant optic atrophy (ADOA) fibroblasts. Mitochondria were stained using the Mitotracker probe. Z-stack fluorescent images were acquired (Leica DMI600B; Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) using Metamorph software. Representative deconvolved images of the mitochondria network are shown. Details of mitochondrial shape: normal, thin tubular mitochondria (top box); and round, swollen mitochondria as seen in some ADOA fibroblasts (bottom box). A treatment of control fibroblasts with oxidative phosphorylation (OXPHOS) inhibitors, oligomycin (10µM)/myxothiazol (2µM), for 2 hours led to a fragmented network, providing a control for the alteration of mitochondrial morphology. Thresholded images were used to quantify mitochondrial size and shape per cell (diagram bar). The presence of swollen mitochondria is indicated by an asterisk. Each bar graph is the mean of at least 50 control or mutated cells. Light yellow denotes >10µm, branching; orange denotes <10µm; light blue denotes <5µm; dark blue denotes <1µm.

ADP, indicating that COX activity was not rate limiting.<sup>19</sup> This reduction may exercise a control function by avoiding excessive respiratory chain activity. ADOA and ADOAC fibroblasts also showed significantly enhanced complex V activity without modification of protein expression, and the mitochondrial ATP production was normal despite the reduced efficiency of ATP synthesis. Our results suggest that F1-ATPase activity could be modified by *OPA1/3* mutations. All the biochemical features that we observed were shared by

fibroblasts carrying either *OPA1* or *OPA3* mutations. This suggests that the function of *OPA3*, which is still unknown, could be related to that of *OPA1*.

Whereas the mitochondrial energetic defect was common to LHON, ADOA, and ADOAC fibroblasts, these cells did not show similar mitochondrial structural modifications. This suggests that the pathophysiology of ADOA could be related to the mitochondrial energetic defect rather than to the impairment of mitochondrial structure, which has been the main focus of research in the *OPA1* field until now. The origin of the proton leak or slip in ADOA remains to be investigated.

Finally, our results in LHON+ and ADOA+ fibroblasts suggest that the more complex phenotypes may be related to the inability of the cells to compensate the mitochondrial energetic deficiency and to greater impairment of energetic metabolism than in LHON and ADOA fibroblasts.

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University Hospital of Angers (PHRC 04-12), the University of Angers, Retina France, and the "Ouvrir les yeux" patients' associations (A.C., P.A.-B., D.B., P.R.).

We thank Dr G. Lenaers for the *OPA1* antibodies and Dr A. Lombès for LHON patients' cells. We are grateful to J. Hodbert and C. Wetterwald, to the technicians of the laboratory for technical assistance, and to K. Malkani for critical reading and comments on the manuscript.

## References

- Huizing M, Brooks BP, Anikster Y. Optic atrophies in metabolic disorders. *Mol Genet Metab* 2005;86:51–60.
- Carelli V, La Morgia C, Iommarini L, et al. Mitochondrial optic neuropathies: how two genomes may kill the same cell type? *Biosci Rep* 2007;27:173–184.
- Carelli V, Rugolo M, Sgarbi G, et al. Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658:172–179.
- Kjer P, Jensen OA, Klinken L. Histopathology of eye, optic nerve and brain in a case of dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1983;61:300–312.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, et al. *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;26:211–215.
- Delettre C, Lenaers G, Griffioen JM, et al. Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;26:207–210.
- Ferre M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, et al. eOPA1: an online database for *OPA1* mutations. *Hum Mutat* 2005;25:423–428.
- Amati-Bonneau P, Guicher A, Olichon A, et al. *OPA1* R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 2005;58:958–963.
- Olichon A, Baricault L, Gas N, et al. Loss of *OPA1* perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:7743–7746.

10. Baricault L, Segui B, Guegan L, et al. OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp Cell Res* 2007;313:3800–3808.
11. Dutta R, McDonough J, Yin X, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:478–489.
12. Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, et al. Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain* 1992;115:979–989.
13. Verny C, Loiseau D, Scherer C, et al. Multiple sclerosis-like disorder in OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 2008;70:1152–1153.
14. Anikster Y, Kleta R, Shaag A, et al. Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *Am J Hum Genet* 2001;69:1218–1224.
15. Reynier P, Amati-Bonneau P, Verny C, et al. OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *J Med Genet* 2004;41:e110.
16. Lodi R, Tonon C, Valentino ML, et al. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* 2004;56:719–723.
17. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363–9367.
18. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, et al. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 2007;61:315–323.
19. Pecina P, Capkova M, Chowdhury SK, et al. Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2003;1639:53–63.

C. Article n°2

***Ethambutol-Induced Optic Neuropathy Linked to OPA1 Mutation  
and Mitochondrial Toxicity***

*Virginie Guillet\*, Arnaud Chevrollier\*, Julien Cassereau, Franck Letournel, Naïg Gueguen,  
Laurence Richard, Christophe Verny, Vincent Procaccio, Patrizia Amati-Bonneau,  
Pascal Reynier, Dominique Bonneau. \*Contribution égale de ces auteurs.*

*Soumis à Mitochondrion.*

*En revision.*

# **Ethambutol-Induced Optic Neuropathy Linked to OPA1 Mutation and Mitochondrial Toxicity**

Virginie GUILLET<sup>1,2\*</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,3\*</sup>, Julien CASSEREAU<sup>4</sup>, Franck LETOURNEL<sup>2,5</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,3</sup>, Laurence RICHARD<sup>6</sup>, Christophe VERNY<sup>1,2,4</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>2,3,7,8</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,3</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2,3</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U694, Angers, F-49000 France; <sup>2</sup>Université d'Angers, Faculté de Médecine, Angers, F-49000, France; <sup>3</sup>CHU d'Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers, F-49000, France; <sup>4</sup>CHU d'Angers, Département de Neurologie, Angers, F-49900, France; <sup>5</sup>CHU d'Angers, Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, UF de Neurobiologie et Neuropathologie, Angers, F-49000, France; <sup>6</sup>Département de Neurobiologie, Limoges, F-87000, France; <sup>7</sup>CNRS, UMR6214, F-49000 Angers, France; <sup>8</sup>INSERM, U771, F-49000 Angers, France. \*equally contributors.

Corresponding author :

Dr A. Chevrollier, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49033 ANGERS Cedex, France.

Tel ++ 33 241 355 487

Fax ++ 33 241 354 017

[archevrollier@chu-angers.fr](mailto:archevrollier@chu-angers.fr)

## **ABSTRACT**

Ethambutol (EMB) is an antimycobacterial drug widely used in the treatment of tuberculosis. Toxic optic neuropathy, a major side effect of EMB, may account for about 100,000 new cases worldwide of blindness each year. The mechanism leading to retinal ganglion cell degeneration is not known but a mitochondrial defect is believed to be involved. Patients carrying mitochondrial DNA mutations have been reported to develop Leber's hereditary optic neuropathy following EMB treatment. We report the case of a man carrying the p.I382M\_OPA1 mutation, related to autosomal dominant optic atrophy (ADOA), in whom the administration of EMB induced the development of optic neuropathy. We investigated the mitochondrial energetic metabolism in fibroblasts from the ADOA patient, from control subjects and in PC12 neuronal cells. We also examined the consequences of EMB treatment on the structure of cell organelles. EMB treatment induced a mitochondrial coupling defect together with a 25% reduction in complex IV activity in control fibroblasts; both these energetic defects were also found in ADOA fibroblasts. In most cells, EMB induced the formation of vacuoles, associated with a decrease of the mitochondrial membrane potential and fragmentation of the mitochondrial network. Moreover, the endoplasmic reticulum network was highly disorganized and mitochondrial contacts with the endoplasmic reticulum greatly reduced. Our results demonstrate the direct impact of EMB on mitochondrial network structure and energetic metabolism. Mitochondrial genetic variation may therefore predispose to EMB induced ocular injury.

**Keywords:** Ethambutol; OPA1; autosomal dominant optic atrophy ; mitochondria

**Abbreviations:** EMB, Ethambutol; ADOA, Autosomal Dominant Optic Atrophy; OPA1, Optic Atrophy 1; LHON, Leber Hereditary Optic Neuropathy; OXPHOS, oxidative phosphorylation.



## INTRODUCTION

Ethambutol (EMB) is one of the first-line antimycobacterial agents used for the treatment of tuberculosis. The precise molecular basis of the action of EMB is not known but it has been reported to inhibit RNA synthesis in mycobacteria [1]. EMB, which acts as a chelating agent, has been shown to interfere with the metal-containing enzyme systems essential to bacterial metabolism [2]. Moreover, its target enzyme is an arabinosyl transferase involved in the biosynthetic pathway of the arabinogalactan cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* [3].

Since EMB was first used in the 1960s, ocular side effects manifesting as optic neuritis have been described [4]. The classical symptoms of ocular toxicity are a progressive blurring of vision and decreased colour perception. Ophthalmologic examination reveals decreased bilateral visual acuity, central scotoma and dyschromatopsia [5]. EMB toxicity is described as dose- and time-dependent but its reversibility remains controversial. EMB has been estimated to be responsible for 100,000 new cases of blindness each year as about 1.5% to 2% of patients treated with EMB develop an optic neuropathy [6,7]. This justifies the importance of studies aimed at elucidating the molecular mechanisms underlying the ocular toxicity induced by EMB.

The toxic effect of EMB on retinal ganglion cells has been confirmed *in vivo* and *in vitro* in rodents [8,9]. It was suggested that neuronal ganglion cell death may be mediated through EMB-induced glutamate excitotoxic pathway [8]. However, Yoon *et al.*, (2000) demonstrated that EMB induced the formation of vacuoles in neuronal retinal cells and that, contrary to the current theories, EMB-induced toxicity was not mediated by glutamate excitotoxicity or zinc chelation, but by a process involving intracellular zinc [9]. In fact, this toxicity has recently been shown to be mediated by zinc and lysosomal membrane permeabilization [10]. Moreover, it has been suggested that EMB may interact with mitochondrial cytochrome *c* oxidase activity (complex IV) through a copper-chelating action [11].

The mitochondrial hypothesis has aroused interest since Dotti *et al.* (1997) first described a case of an EMB-induced optic neuropathy in a patient carrying a Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) mitochondrial mutation at nucleotide 11778 [12]. This maternally-transmitted hereditary optic neuropathy is linked to mutations of mitochondrial DNA, affecting genes coding for subunits of mitochondrial complex I, and thereby reducing the specific activity of this complex [13,14]. In fibroblasts from LHON patients, we found a 40%

decrease of complex I activity, a decrease in ATP synthesis and an oxidative phosphorylation (OXPHOS) coupling defect [15]. The first report of a case of LHON related to EMB was followed by several others [16-18], suggesting that EMB may be a pharmacological risk factor for the occurrence of LHON.

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is another hereditary optic neuropathy related to a mitochondrial energetic defect. ADOA is linked to mutations in the *OPA1* gene [19,20] which encodes a GTPase, localized at the inner mitochondrial membrane, and involved in mitochondrial fusion and apoptosis [21,22], as well as mitochondrial DNA maintenance [23]. We have shown that fibroblasts from ADOA patients present a 25% decrease in complex IV activity, and that LHON and ADOA fibroblasts share a common mitochondrial coupling defect [15].

We report the case of a patient, carrying the *OPA1*\_p.I382M mutation, who developed ADOA during EMB treatment, similarly to the LHON cases described previously. Despite strong suspicion of the mitochondrial toxicity of the drug, the direct biological impact of EMB on mitochondrial energetic metabolism has not yet been established. We therefore investigated the effect of EMB on mitochondrial structure and function in primary human skin fibroblast cultures from the ADOA patient, from control subjects, and in neuronal PC12 cells.

## **PATIENT, MATERIAL AND METHODS**

### **Patient**

A 62-year-old male was followed-up for 30 years in the Department of Ophthalmology for bilateral loss of vision after treatment with ethambutol (EMB). In 1974, the patient had received EMB, isoniazid and rifampicin at standard doses for pulmonary tuberculosis. Three months after the beginning of this treatment, he was admitted to the Department of Ophthalmology for sudden bilateral loss of vision to 3/10 in each eye. Fundus examination showed bilateral papillary pallor. There were no signs of hyperemia or capillary dilatation. Visual field tests revealed bilateral centrocecal scotoma. Colour vision was abnormal with bilateral deuteranopia. Considering the possibility of EMB-related optic neuropathy, the EMB treatment was immediately stopped. However, despite this, the visual acuity of the patient did not improve. He was followed up for 30 years. The optic discs became paler with time, finally

presenting the aspect of bilateral optic atrophy. In 2005, genetic analysis led to the discovery of a heterozygous mutation in the *OPA1* gene (c.1146A>G; p.I382M). Mitochondrial DNA sequencing revealed several polymorphisms excluding any pathological mutation (Table S1).

### **Sequencing**

For the *OPA1* gene analysis, genomic DNA was amplified by PCR with specific primers designed to amplify all exons and flanking intronic regions as previously described [23]. To exclude the presence of any rare mitochondrial DNA mutation, we sequenced entirely the mitochondrial genome. The mtDNA was PCR amplified in eight fragments and PCR products were purified and sequenced as described elsewhere [24].

### **Cell cultures**

Fibroblast primary cultures were obtained from skin biopsies taken after written consent from control subjects and from the patient. The cells were cultivated in Dulbecco's minimum essential medium (Gibco, Cergy-Pontoise, France) in the presence of 10% foetal bovine serum. They were grown in a 75 cm<sup>2</sup> flask, either in the control medium or in a medium supplemented with 1 mM EMB for 28 days, or 1 to 5 mM EMB for 24 hours. These concentrations were comparable to the approximate tissue level of EMB in patients with tuberculosis after an intravenous injection of 15 mg/kg EMB [10] and our cellular toxicity assay at 5 mM EMB showed no signs of toxicity (data not shown). All experiments were conducted on cells with similar passage numbers, ranging from 5 to 20, to avoid artefacts due to senescence.

PC12 cells were grown in RPMI media (Lonza, Levallois-Perret, France), containing 10% foetal calf serum, 1% L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) as previously described [25]. At 80% confluence, cells were trypsinized and harvested on coverslips (10,000 cells per ml). They were differentiated using NGF (150 ng/ml) for 10 days (Promega, Charbonnières, France) and treated with EMB.

### **Respiratory parameters in intact cells**

To study the patient's mitochondrial metabolism and to test the effect of adding EMB in the culture medium on mitochondrial respiration, we investigated the respiratory parameters in intact fibroblasts by polarography with a Clark-type oxygen electrode (Rank-Brothers, Cambridge, United Kingdom) as described elsewhere [26]. The basal respiration rate of intact

cells ( $3$  to  $5 \cdot 10^6$  cells placed in  $500 \mu\text{l}$  Dulbecco's minimum essential medium at  $37^\circ\text{C}$ ) was determined by measuring the linear rate of oxygen consumption. Oligomycin ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) was then added, and the resting respiration rate, i.e. the non-phosphorylating respiration rate, was recorded. Next, the maximal uncoupled respiration rate was measured using  $0.5$ - $5 \mu\text{M}$  uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP). Finally, respiration was inhibited by sequential addition of  $1.25 \mu\text{M}$  rotenone and  $3 \mu\text{M}$  antimycin. The mitochondrial respiratory control ratio (RCR) of the cells was calculated as the ratio of oxygen consumed by the fibroblasts in the presence of the uncoupler FCCP (i.e. the response of respiration to the collapse of  $\Delta\Psi\text{m}$ ) to that in the presence of oligomycin, an inhibitor of ATP synthase (i.e. the response of respiration to the inhibition of mitochondrial ATP synthesis).

### **Coupling efficiency and adenosine triphosphate production in permeabilized cells**

The rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio were determined on cells permeabilized by exposure to digitonin. Cells were resuspended in the respiratory buffer ( $10 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $300 \text{ mM}$  mannitol,  $10 \text{ mM KCl}$ , and  $5 \text{ mM MgCl}_2$ , pH  $7.4$ ) supplemented with  $2 \text{ mM}$  iodoacetate and  $2 \text{ mM}$  EDTA, so as to prevent glycolytic ATP synthesis and ATP hydrolysis by cellular ATPases [27]. The respiratory rates of  $3 \cdot 10^6$  to  $5 \cdot 10^6$  cells were recorded at  $37^\circ\text{C}$  in  $2 \text{ ml}$  glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). ATP synthesis was started by the addition of  $5 \text{ mM}$  malate,  $5 \text{ mM}$  pyruvate, and  $10 \text{ mM}$  succinate, and the subsequent addition of  $1.5 \text{ mM}$  adenosine diphosphate. Aliquots were sampled each minute after quenching with an equal volume of  $1\%$  trichloroacetic acid (TCA) solution and neutralized by adding  $25 \text{ mM}$  4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES),  $2 \text{ mM}$  EDTA, pH  $7.75$  buffer. The ATP synthesized *in situ* was measured using the Enliten ATP assay (Promega, Madison, WI, USA). Luminescence was measured on a Miniluma luminometer (Berthold Technologic, Bad Wilbad, Germany) using a  $10$ -second integration period. Standardization was performed with known quantities of ATP measured under the same conditions.

### **Microscopy**

Mitochondria were labeled using several fluorescent probes. For mitochondrial structure studies,  $100 \text{ nM}$  MitoTracker® Red or Green FM (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) were used according to the manufacturer's instructions. Mitochondrial membrane potential

was estimated using the JC-1 probe (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) (Molecular Probes), 2.5µg/ml in DMEM without phenol red. TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester per chlorate) (Molecular Probes), a lipophilic cation which accumulates in polarized mitochondria in proportion to their transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was also used, loading cells with 0.4 nM of the product for 20 min at 37°C.

Transient transfections of fibroblasts with pDsRed2-endoplasmic reticulum and pAcGFP1-Golgi vectors (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) were performed using FuGENE 6 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Total amount of 200 ng of DNA and 0.6 µl of FuGENE 6 were used per well. Cells were incubated 30 min with 0.5 µM LysoTracker green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to stain lysosomal acidic organelles. Z-stack images were acquired with a Leica (DMI6000B, Microsystems, Wetzlar, Germany) and a Roper CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany). We took 21 plane images along the Z-axis at 0.3 µm or 0.2 µm increments. Stacked images were deconvolved using a Meinel algorithm. Acquisition driving and image analysis were performed using Metamorph 7.6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Electron microscopy**

Mitochondrial ultrastructure was examined as described elsewhere [28]. Fibroblasts were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Cells were postfixated in 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M phosphate buffer, dehydrated in an ascending series of ethanol, and embedded in epoxy resin. Thin sections were examined with a JEOL JME 1011 electron microscope.

### **Statistical analysis**

Statistical comparisons were made with the Mann-Whitney U test; differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Ethambutol induces a mitochondrial coupling defect**

Ethambutol (EMB) is usually prescribed for the treatment of pulmonary tuberculosis during the first two months of drug therapy. Human skin fibroblasts from controls and from the patient carrying the OPA1\_p.I382M mutation in whom the administration of EMB had

induced the development of optic atrophy were treated with 1 mM EMB during 7, 14, 21 and 28 days before the respiratory parameters were evaluated (Fig. 1).

In the absence of EMB, a higher basal respiratory rate, i.e. the respiratory rate of intact cells with endogenous substrates, was found in the OPA1\_p.I382M patient's fibroblasts (Fig. 1A). As reported in the case of ADOA fibroblasts, a resting respiratory rate about twice as high as that in controls was found in the OPA1\_p.I382M patient's fibroblasts after the addition of oligomycin, which inhibits ATP synthase (Fig. 1B). This indicated an increase in the non-phosphorylating respiration in the patient's cells, reflecting a proton leak or an electron slip.

While EMB had no effect on the endogenous basal respiration (Fig. 1A), 1 mM EMB treatment induced an increase of this resting respiration in the patient's fibroblasts and in controls with significant effects following 14 days of treatment (Fig. 1B). The FCCP-induced maximal respiration, which indicates the maximal respiratory chain capacity, was not significantly different between controls and the patient's fibroblasts, and EMB treatment had no effect on this respiratory parameter (data not shown). Consequently, in the patient's cells, the respiratory control ratio (RCR), which provides information about the respiratory chain coupling state, was lower than in controls ( $6.9 \pm 1.9$  vs.  $12.0 \pm 1.5$ ). The RCR decreased with EMB treatment, with a more pronounced effect in controls than in the patient's cells (Fig. 1C).

Phosphorylating oxygen consumption, or ATP/O measurements, were then performed on permeabilized fibroblasts. The OXPHOS efficiency was reduced in fibroblasts from the OPA1\_p.I382M patient, as previously reported in cells from ADOA patients [15]. EMB treatment decreased OXPHOS efficiency, i.e. the ATP/O ratio, in fibroblasts from ADOA patients and controls by 30% and 40 % respectively (Fig. 1D). However, EMB treatment did not affect mitochondrial ATP synthesis in controls or in the fibroblasts from the OPA1\_p.I382M patient after 28 days of treatment (Fig. 1E).

It should be noted that all the respiratory investigations were carried out in the absence of EMB since the fibroblasts were harvested and washed with the incubation medium without EMB before the measurements were made. Hence, these results rather reflect a metabolic adaptation of cells in response to EMB than an acute effect on fibroblast respiration. EMB titration on isolated mitochondria showed no protonophore effect (data not shown).

### **Ethambutol reduced the activity of mitochondrial complex IV (cytochrome *c* oxidase)**

The enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were measured in control fibroblasts treated with 1 mM EMB during 7, 14, 21 and 28 days (Table 1). A specific reduction of OXPHOS complex IV activity was found. Interestingly, the activity decreased over time, becoming significant after 14 days and reaching a 25% decrease at 28 days. In cells from ADOA patients, complex IV activity was lower than in controls (1.18 vs. 1.45±0.14 nmol/min/mg of protein); this reduction was not modified by EMB treatment (data not shown).

### **Ethambutol induces non-homogeneous formation of vacuoles in culture cells**

EMB treatment has been shown to induce the formation of vacuoles, with the number and diameter of vacuoles increasing with concentration and time [9]. Phase-contrast microscopy of fibroblasts and neuronal PC12 cells showed that EMB treatment, at concentrations from 1 to 5 mM, induced the formation of vacuoles (Fig. S1). Interestingly, the distribution of vacuoles was heterogeneous, with vacuoles accumulating in some cells but not in others (Fig. 2A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E).

### **Ethambutol alters mitochondrial membrane potential and structure**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was explored in fibroblasts treated with 5 mM EMB during 24 hours. Using two fluorescent probes, we found a strong decrease of  $\Delta\Psi_m$  in cells that had accumulated vacuoles (Fig. 2). The green-fluorescent JC-1 probe exists as a monomer at low concentrations, or at low values of mitochondrial membrane potential. However, at higher concentrations, or higher values of  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 forms red-fluorescent "J-aggregates". As shown in Fig. 2 (A<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), there were fewer red J-aggregates in fibroblasts or PC12 neuronal cells laden with vacuoles than in cells without vacuoles. The same result was obtained with the TMRM dye, which accumulated preferentially in cells without vacuoles (Fig. 2D), indicating a reduction of  $\Delta\Psi_m$  in vacuole laden cells.

EMB treatment also induced fragmentation of the mitochondrial network (Fig. 2A<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>). The MitoTracker probe, which is less sensitive to  $\Delta\Psi_m$ , confirmed the alteration of the mitochondrial network (Fig. 3). However, no modification of mitochondrial ultrastructure was observed with electronic microscopy (Fig. 4A<sub>3</sub>).

## **Ethambutol disorganizes the endoplasmic reticulum**

Following the recent work of Chung *et al.* (2009) [10], we identified EMB-induced vacuoles using the LysoTracker probe (Fig. 5); this indicated the acidic lysosomal origin of the vacuoles. The LysoTracker probe accumulated massively, with high fluorescence intensity, in lysosomes or late endosomes as found in non-treated cells, but only partially in the large vacuoles induced by EMB (Fig. 5B, C). Electron microscopy of EMB treated cells (Fig. 4) showed that large vacuoles, corresponding to the EMB-induced macro-vacuoles, were less dense than the lysosomal structures. Interestingly, most of these large vacuoles were bordered by endoplasmic reticulum (ER) (Fig. 4A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>). Using the pDsRed2-ER vector, we showed that the reticulum endoplasmic was highly disrupted after EMB treatment, forming a vacuolar network different to that found in non-treated fibroblasts, in which the ER presented a dense, string-like network (Fig. 6A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>). As compared to controls, mitochondrial and ER co-labelling showed reduced connections between organelles (Fig. 6B<sub>3</sub>, Video S1 and S2). In addition to the biochemical properties of vacuoles, the encumbrance due to large numbers of vacuoles is likely to be involved in the disorganization of mitochondrial and ER networks. The Golgi apparatus, however, seemed to be unaffected by EMB treatment (Fig. S2). Moreover, despite the preferential accumulation of vacuoles in the soma of neuronal PC12 cells, vacuoles were also observed in the axon-like structures. The diameter of some of these vacuoles corresponded to that of the axon-like structures, impeding the progress of mitochondria and cargo trafficking along the axon (Fig. 7, Video S3).

## **DISCUSSION**

Tuberculosis is one of the commonest causes of morbidity worldwide. The guidelines of the World Health Organization recommend the use of standardized treatment regimens of selected anti-tuberculosis drugs, including ethambutol (EMB), to prevent drug resistance [29]. To our knowledge, the present study is the first report of a case of autosomal dominant optic atrophy (ADOA), linked to the *OPA1* gene mutation, triggered by the EMB treatment prescribed for tuberculosis. The incidence of EMB ocular toxicity in a highly sensitive genetic context has been regularly reported in cases of Leber's hereditary optic neuropathy, which is associated with mitochondrial DNA mutations [12,16-18]. This strongly suggests that a mitochondrial defect is a central mechanism in EMB-induced optic neuropathy. However, the link between EMB toxicity, retinal ganglion cell degeneration and mitochondrial impairment



remains to be elucidated. Our study of the effects of EMB on healthy control fibroblasts suggests that EMB is directly implicated in mitochondrial toxicity. In these fibroblasts, EMB decreased complex IV activity with time, leading to a 25% decrease at 28 days, without affecting ATP production. In addition, the OXPHOS efficiency was clearly affected by EMB as attested by the reduction of the ATP/O ratio. Interestingly, the impact of EMB on control fibroblasts was qualitatively and quantitatively similar to that in fibroblasts from patients carrying *OPA1* mutations, including fibroblasts from the patient described in this report. Indeed, as previously shown in these cells, complex IV activity and the ATP/O ratio of OPA1\_p.I382M fibroblasts was 25% lower than in controls [15]. In fibroblasts from the patient carrying OPA1\_p.I382M mutations, EMB treatment did not lead to any additional reduction of complex IV activity. This may be explained by a threshold value of complex IV activity below which cellular viability might be compromised. However, the ATP/O ratio was slightly affected by EMB treatment in cells from ADOA patients.

The biochemical properties of EMB suggest that the drug could target mitochondria. Thus, the reduced complex IV activity may be explained by the metal-chelating property of EMB, especially with regard to copper, an essential cofactor of electron transfer in complex IV activity. Ethylenediiminodibutyric acid, an EMB metabolite, has been reported to alter copper metabolism by chelating metal ions [30,31]. We found that EMB treatment decreased OXPHOS efficiency; however, contrary to other antibiotics, EMB does not act as a protonophore [32,33]. Indeed, antibacterial agents are commonly known to impair mitochondrial function, some acting as inhibitors of mitochondrial RNA and protein synthesis [34,35], and others acting as inhibitors or uncouplers of OXPHOS [36-39]. Several studies have demonstrated that the penetrance of mitochondrial disorders due to mtDNA mutations may be affected by additional nuclear loci, and environmental or pharmacological factors. For example, the A1555G mitochondrial 12S ribosomal ribonucleic acid gene mutation has been associated with irreversible hearing loss following the administration of aminoglycoside antibiotics in several families [40,41]; however, the penetrance was variable due to nuclear-encoded modifier genes [42,43]. The A1555G mutation changes the conformation of the human 12SrRNA at the aminoglycoside binding site, making the mitochondrial ribosome more like a bacterial ribosome [44]. This particular mitochondrial sensitivity to antibiotic toxicity is therefore likely to be related to the prokaryotic origin of mitochondria [45], making modern mitochondria more likely to share some specific targets with bacteria.

The study of the action of EMB on fibroblasts and neuronal cells also provided new data concerning the consequences of the intracellular vacuoles. We observed the extensive formation of vacuoles, increasing with EMB concentration and exposure time, similar to the vacuoles described in retinal cell cultures [9,10]. The distribution of vacuoles was heterogeneous, with some cells presenting very few vacuoles as compared to others. Interestingly, the accumulation of vacuoles in cells correlated strongly with a decrease in the mitochondrial membrane potential. Vacuoles observed in axon-like extensions of neuronal PC12 cells were also locally associated with a loss of mitochondrial membrane potential. This lower  $\Delta\Psi_m$  could result from the uncoupling effect of EMB discussed above. In our study, no cell deaths were observed up to 36 hours of EMB exposure, and vacuole formation was reversible upon EMB starvation, indicating a non-apoptotic effect of the  $\Delta\Psi_m$  decrease (data not shown). However, studies on rat primary retinal ganglion cells have reported a loss of axons proportional to EMB concentration after 24 hours of treatment [8,9], indicating the higher sensitivity of these cells [46,47].

Our study showed that the acidic composition of EMB-induced vacuoles was characteristic of lysosomes, confirming the observations of Chung *et al.* [10]. These authors have suggested that EMB-induced toxicity may be mediated by zinc, implying lysosomal membrane permeabilization and the release of the pro-apoptotic factor cathepsin D in the cytosol [10]. Apoptotic pathways induced by EMB should therefore be further explored since lysosomal as well as mitochondrial permeabilization has been implicated in programmed cell death [48-50].

In addition, EMB toxicity seems to be a consequence of the mechanical alteration of organelles. We noted that EMB induced fragmentation of the mitochondrial network, but we did not observe any mitochondrial swelling as previously reported in a retinal cell culture [9]. The space taken up by the vacuoles may play a role in mitochondrial fragmentation, and consequently in mitochondrial uncoupling and the decrease in mitochondrial membrane potential. These abnormalities of the mitochondrial network and bioenergetic alterations may lie at the origin of the increased susceptibility of retinal cells to apoptosis.

Electronic microscopy of the EMB-treated fibroblasts showed that the vacuoles were essentially bordered by endoplasmic reticulum. Fluorescent imaging revealed that EMB led to a disorganization of the ER network and decreased the contacts between the ER and

mitochondria. Such contacts have been shown to be necessary for the calcium exchange required by mitochondrial metabolism [51]. Our findings suggest that the decreased interaction between ER and mitochondria may play a role in EMB pathogenicity. For mechanical reasons, the space required by vacuoles, even of a small size, may also have major consequences on intracellular structure and exchanges. As suggested by our observations, small vacuoles could clog axon channels, impeding the progress of mitochondria necessary for supplying ATP to a region with high energy demands.

Our study demonstrates that EMB toxicity involves biochemical as well as mechanical factors affecting energetic metabolism and mitochondrial network structure as well as inter-organelle interactions. The occurrence of optic atrophy during EMB treatment in a patient with an *OPA1* mutation reinforces the strong impact of the genetic background on EMB toxicity. It also shows the strong influence of pharmacological toxicity on the penetrance of mitochondrial diseases. Future studies should therefore combine a pharmacogenetic approach with clinical determinants to avoid the prescription of EMB in susceptible patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the “*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*”, the University Hospital of Angers, the University of Angers, Retina France, AMMi, UNADEV, and the “*Ouvrir les yeux*” patients’ associations.

We are grateful to J. Hodbert and C. Wetterwald, to the technicians of the laboratory for technical assistance, and to K. Malkani for critical reading and comments on the manuscript.

## REFERENCES

1. Forbes M, Kuck NA, Peets EA (1965) Effect of ethambutol on nucleic acid metabolism in mycobacterium smegmatis and its reversal by polyamines and divalent cations. *J Bacteriol* 89: 1299-1305.
2. Shepherd RG, Baughn C, Cantrall ML, Goodstein B, Thomas JP et al. (1966) Structure-activity studies leading to ethambutol, a new type of antituberculous compound. *Ann N Y Acad Sci* 135: 686-710.
3. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT et al. (1996) The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan

biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11919-11924.

4. Carr RE, Henkind P (1962) Ocular manifestations of ethambutol, Toxic amblyopia after administration of an experimental antituberculous drug. *Arch Ophthalmol* 67: 566-571.
5. Chan RY, Kwok AK (2006) Ocular toxicity of ethambutol. *Hong Kong Med J* 12: 56-60.
6. Lee EJ, Kim SJ, Choung HK, Kim JH, Yu YS (2008) Incidence and clinical features of ethambutol-induced optic neuropathy in Korea. *J Neuroophthalmol* 28: 269-277.
7. Sadun AA, Wang MY (2008) Ethambutol optic neuropathy: how we can prevent 100,000 new cases of blindness each year. *J Neuroophthalmol* 28: 265-268.
8. Heng JE, Vorwerk CK, Lessell E, Zurakowski D, Levin LA et al. (1999) Ethambutol is toxic to retinal ganglion cells via an excitotoxic pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 190-196.
9. Yoon YH, Jung KH, Sadun AA, Shin HC, Koh JY (2000) Ethambutol-induced vacuolar changes and neuronal loss in rat retinal cell culture: mediation by endogenous zinc. *Toxicol Appl Pharmacol* 162: 107-114.
10. Chung H, Yoon YH, Hwang JJ, Cho KS, Koh JY et al. (2009) Ethambutol-induced toxicity is mediated by zinc and lysosomal membrane permeabilization in cultured retinal cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 235: 163-170.
11. Buyske DA, Peets E, Sterlin W (1966) Pharmacological and biochemical studies on ethambutol in laboratory animals. *Ann N Y Acad Sci* 135: 711-725.
12. Dotti MT, Plewnia K, Cardaioli E, Manneschi L, Rufa A et al. (1998) A case of ethambutol-induced optic neuropathy harbouring the primary mitochondrial LHON mutation at nt 11778. *J Neurol* 245: 302-303.
13. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA (2004) Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 23: 53-89.
14. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF (2009) Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 46: 145-158.
15. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA et al. (2008) Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63: 794-798.
16. De Marinis M (2001) Optic neuropathy after treatment with anti-tuberculous drugs in a subject with Leber's hereditary optic neuropathy mutation. *J Neurol* 248:818-819.
17. Hwang JM, Kim J, Park SS (2003) Leber's hereditary optic neuropathy mutations in ethambutol-induced optic neuropathy. *J Neurol* 250: 87-89.
18. Ikeda A, Ikeda T, Ikeda N, Kawakami Y, Mimura O (2006) Leber's hereditary optic neuropathy precipitated by ethambutol. *Jpn J Ophthalmol* 50: 280-283.
19. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C et al. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207-210.

20. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S et al. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26: 211-215.
21. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A et al. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278: 7743-7746.
22. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV et al. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126: 177-189.
23. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B et al. (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131: 338-351.
24. Nochez Y, Arsene S, Gueguen N, Chevrollier A, Ferré M et al. (2009) Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect. *Mol Vis* 15: 598-608.
25. Letournel F, Bocquet A, Perrot R, Dechaume A, Guinut F et al. (2006) Neurofilament high molecular weight-green fluorescent protein fusion is normally expressed in neurons and transported in axons: a neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments. *Neuroscience* 137: 103-111.
26. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N et al. (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61: 315-323.
27. Ouhabi R, Boue-Grabot M, Mazat JP (1998) Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values in situ. *Anal Biochem* 263: 169-175.
28. Vallat JM, Magy L, Lagrange E, Sturtz F, Magdelaine C et al. (2007) Diagnostic value of ultrastructural nerve examination in Charcot-Marie-Tooth disease: two CMT 1B cases with pseudo-recessive inheritance. *Acta Neuropathol* 113: 443-449.
29. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC (2005) Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA* 293: 2767-2775.
30. Cole A, May PM, Williams DR (1981) Metal binding by pharmaceuticals. Part 1. Copper(II) and zinc(II) interactions following ethambutol administration. *Agents Actions* 11: 296-305.
31. Solecki TJ, Aviv A, Bogden JD (1984) Effect of a chelating drug on balance and tissue distribution of four essential metals. *Toxicology* 31: 207-216.
32. Pressman BC (1968) Ionophorous antibiotics as models for biological transport. *Fed Proc* 27: 1283-1288.
33. Henderson PJ, McGivan JD, Chappell JB (1969) The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. The role of induced proton permeability. *Biochem J* 111: 521-535.
34. Kroon AM, Van den Bogert C (1983) Antibacterial drugs and their interference with the biogenesis of mitochondria in animal and human cells. *Pharm Weekbl Sci* 5: 81-87.

35. Zhang L, Ging NC, Komoda T, Hanada T, Suzuki T et al. (2005) Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation. *FEBS Lett* 579: 6423-6427.
36. Lardy HA, Johnson D, McMurray (1958) Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Arch Biochem Biophys* 78: 587-597.
37. Newton BA (1965) Mechanisms of antibiotic action. *Annu Rev Microbiol* 19: 209-240.
38. Reed PW, Lardy HA (1975) Uncoupling and specific inhibition of phosphoryl transfer reactions in mitochondria by antibiotic A20668. *J Biol Chem* 250: 3704-3708.
39. Gallagher M, Weinberg R, Simpson MV (1986) Effect of the bacterial DNA gyrase inhibitors, novobiocin, nalidixic acid, and oxolinic acid, on oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 261: 8604-8607.
40. Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M et al. (1993) A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 21: 4174-4179.
41. Scrimshaw BJ, Faed JM, Tate WP, Yun K (1999) Rapid identification of an A1555G mutation in human mitochondrial DNA implicated in aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Hum Genet* 44: 388-390.
42. Fischel-Ghodsian N, Kopke RD, Ge X (2004) Mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Mitochondrion* 4: 675-694.
43. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang H, Estivill X et al. (2004) Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes MTO1 and GTPBP3. *Mol Genet Metab* 83: 199-206.
44. Hamasaki K, Rando RR (1997) Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 36: 12323-12328.
45. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.
46. Barron GJ, Tepper L, Iovine G (1974) Ocular toxicity from ethambutol. *Am J Ophthalmol* 77: 256-260.
47. Lessell S (1976) Histopathology of experimental ethambutol intoxication. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15: 765-769.
48. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL et al. (2003) Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* 22: 3927-3936.
49. Yin L, Stearns R, González-Flecha B (2005) Lysosomal and mitochondrial pathways in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of alveolar type II cells. *J Cell Biochem* 94: 433-445.
50. Jäättelä M, Candé C, Kroemer G (2004) Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ* 11: 135-136.
51. McCormack JG, Denton RM (1993) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci* 15: 165-173.

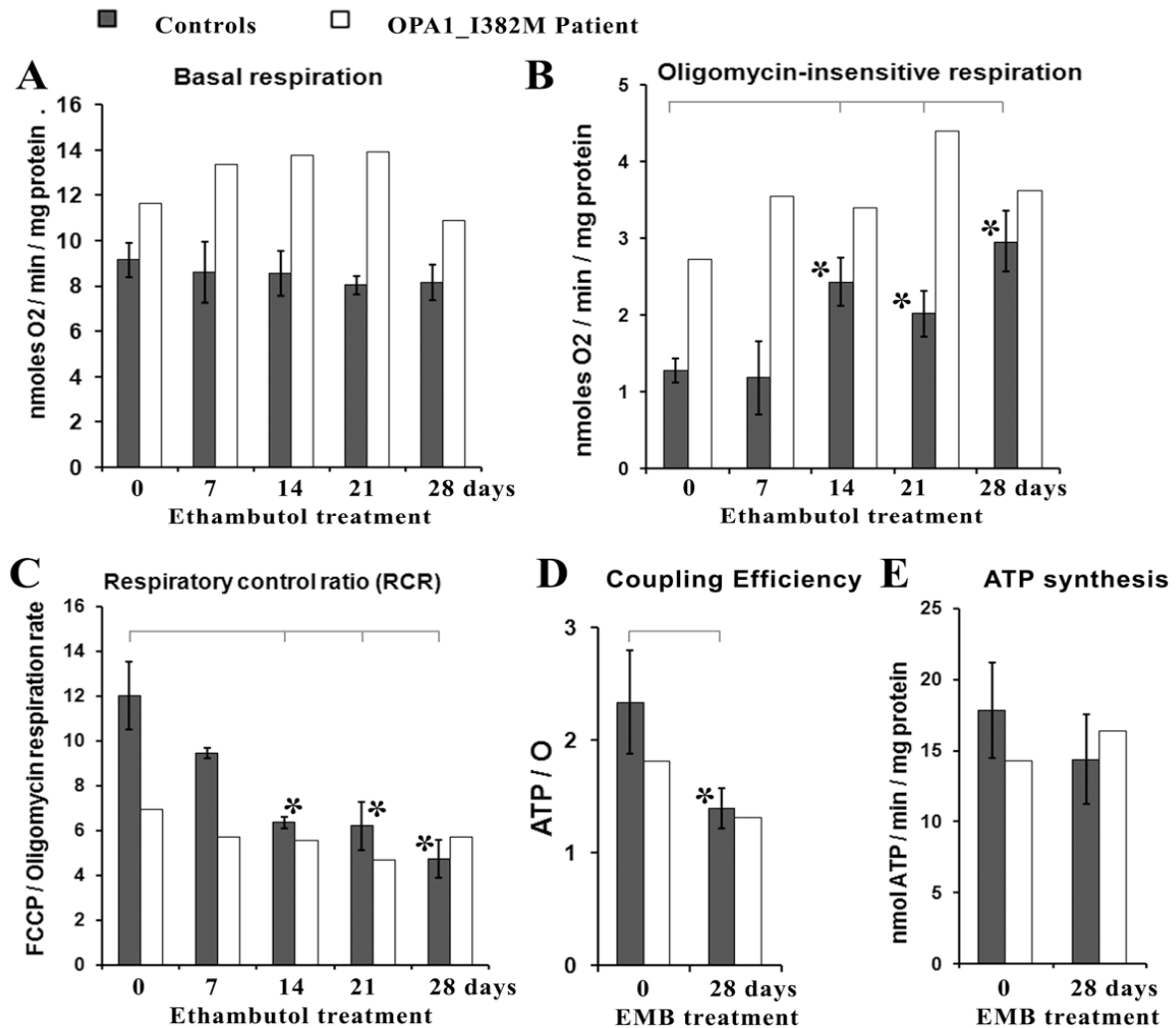
## TABLES

**Table 1. Ethambutol treatment decreases mitochondrial complex IV activity.**

	Controls				
	J0	J7	J14	J21	J28
<b>Complex I / CS</b>	<b>0.38 ± 0.03</b>	<b>0.35 ± 0.07</b>	<b>0.40 ± 0.03</b>	<b>0.48 ± 0.14</b>	<b>0.48 ± 0.06</b>
<b>Complex II / CS</b>	<b>0.17 ± 0.01</b>	<b>0.15 ± 0.04</b>	<b>0.18 ± 0.04</b>	<b>0.19 ± 0.04</b>	<b>0.16 ± 0.01</b>
<b>Complex III / CS</b>	<b>0.83 ± 0.20</b>	<b>1.02 ± 0.05</b>	<b>1.06 ± 0.14</b>	<b>1.08 ± 0.29</b>	<b>0.86 ± 0.15</b>
<b>Complex IV / CS</b>	<b>1.45 ± 0.14</b>	<b>1.21 ± 0.22</b>	<b>1.15 ± 0.11 *</b>	<b>1.10 ± 0.18 *</b>	<b>1.09 ± 0.07 *</b>
<b>Complex V / CS</b>	<b>0.30 ± 0.07</b>	<b>0.25 ± 0.10</b>	<b>0.23 ± 0.09</b>	<b>0.26 ± 0.08</b>	<b>0.34 ± 0.07</b>

Control fibroblasts were exposed to 1 mM EMB during 7, 14, 21 and 28 days in two independent experiments. The activities of the mitochondrial complexes were measured in duplicate on frozen pellets and then expressed in terms of citrate synthase (CS). Values are the means ± SD. Statistical significance: \*p < 0.05.

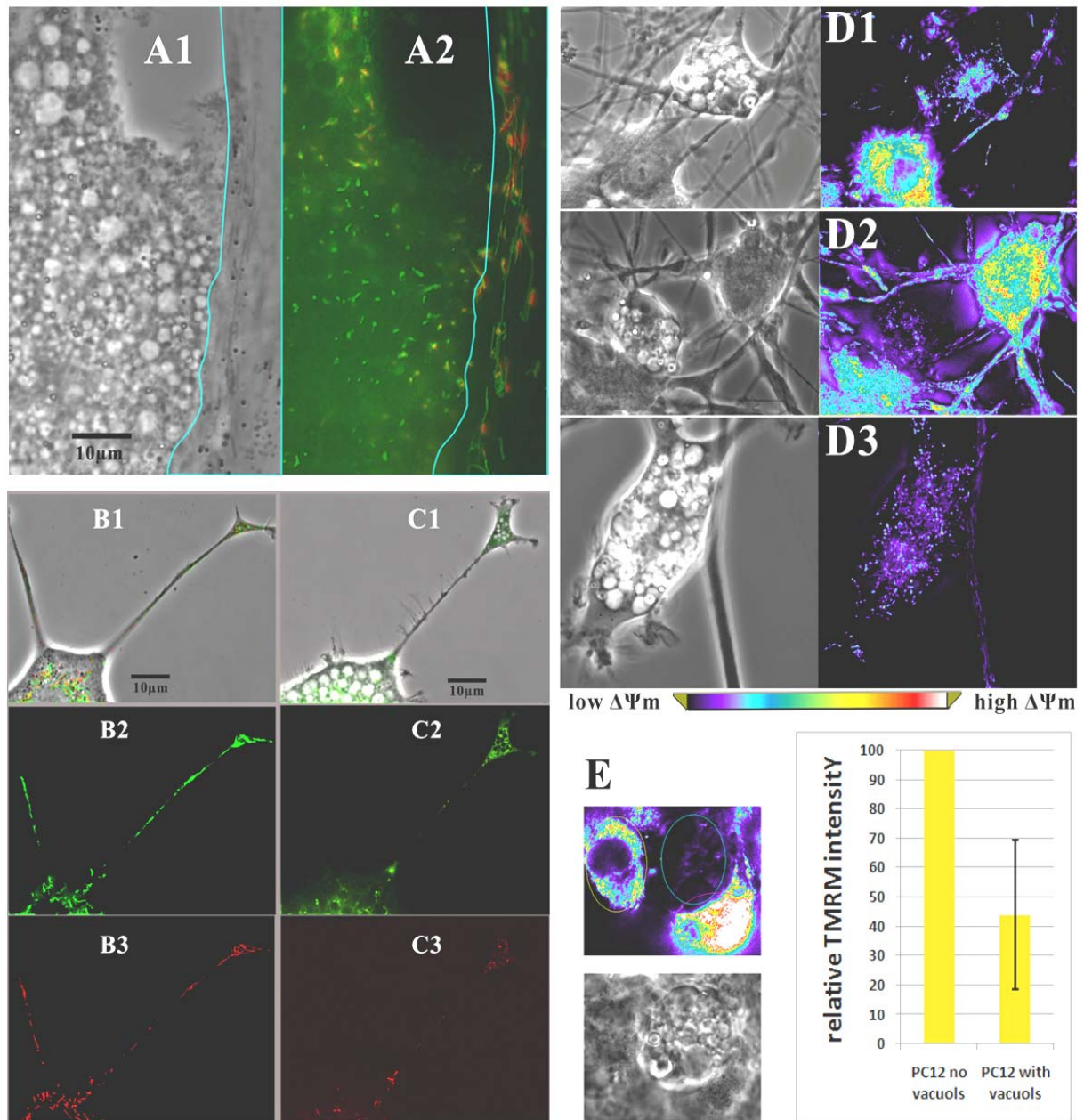
## FIGURES



**Figure 1. Ethambutol exposure induces a mitochondrial coupling defect.**

Respiratory parameters of control and patient's fibroblasts were determined after 7, 14, 21 or 28 days of 1 mM EMB treatment. The basal oxygen consumption of non-permeabilized cells was measured by polarography (A). The resting respiration was determined in the presence of the adenosine triphosphate (ATP) synthase inhibitor oligomycin (8 $\mu$ g/ml) (B). The respiratory control ratio was calculated as the ratio of the FCCP-uncoupled respiratory rate to the oligomycin-insensitive respiratory rate in intact fibroblasts (C). The coupling efficiency (ATP/oxygen [ATP/O]) was measured by polarography as the rate of nanomoles of ATP produced per nanomole of oxygen consumed by digitonin-permeabilized cells (D). The rates of mitochondrial ATP synthesis were measured by luminescence from aliquots sampled in the polarographic chamber (E). Values are means  $\pm$  SD of measurements made in at least three independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$ .





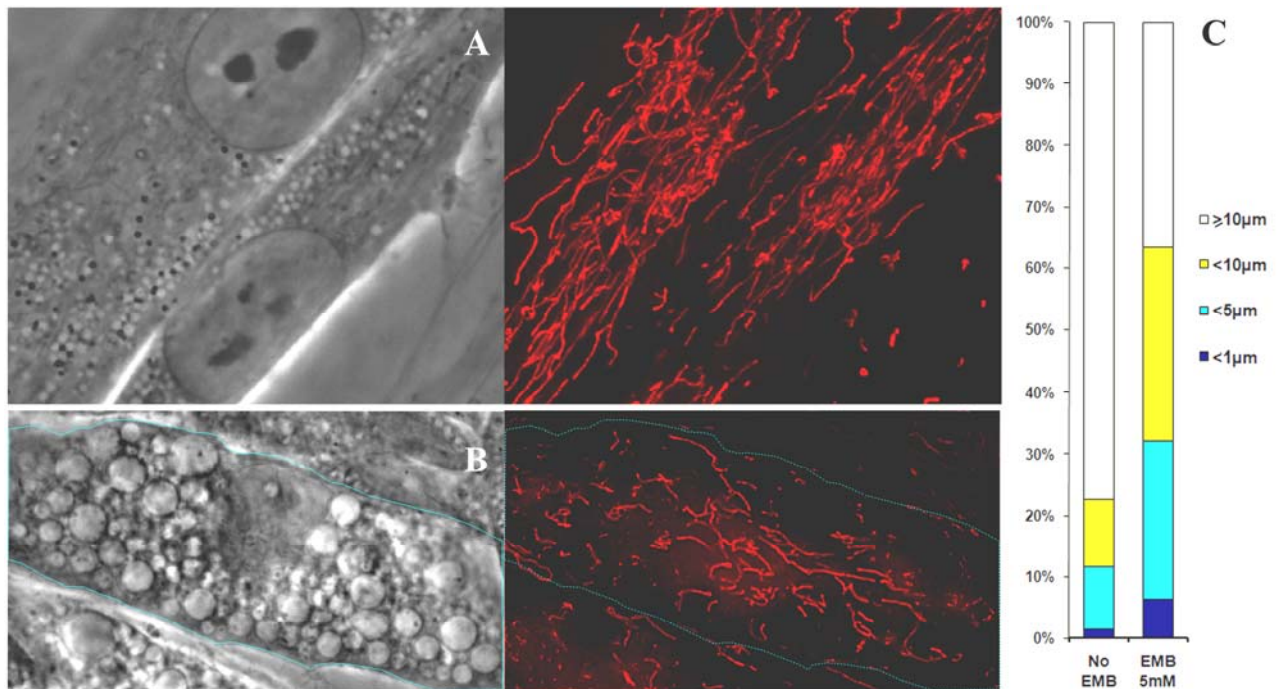
**Figure 2. Mitochondrial membrane potential decreases in cells accumulating ethambutol-induced vacuoles.**

Controls fibroblasts were treated with 5 mM EMB for 24h and stained with  $\Delta\Psi_m$ -sensitive dye JC-1 probe. EMB-induced vacuoles formed only in the left cell (delimited by the blue line) as seen under phase contrast (A1), absence of red-fluorescent “J-aggregates” indicates a lower mitochondrial membrane potential as shown in the fluorescence image (A2).

Neuronal PC12 cells unexposed (B1-3), or exposed (C1-3), to 5 mM EMB for 24h, were similarly stained with the JC-1 probe. EMB induced the formation of vacuoles as shown in (C1), and led to a reduction of the mitochondrial membrane potential as compared to untreated

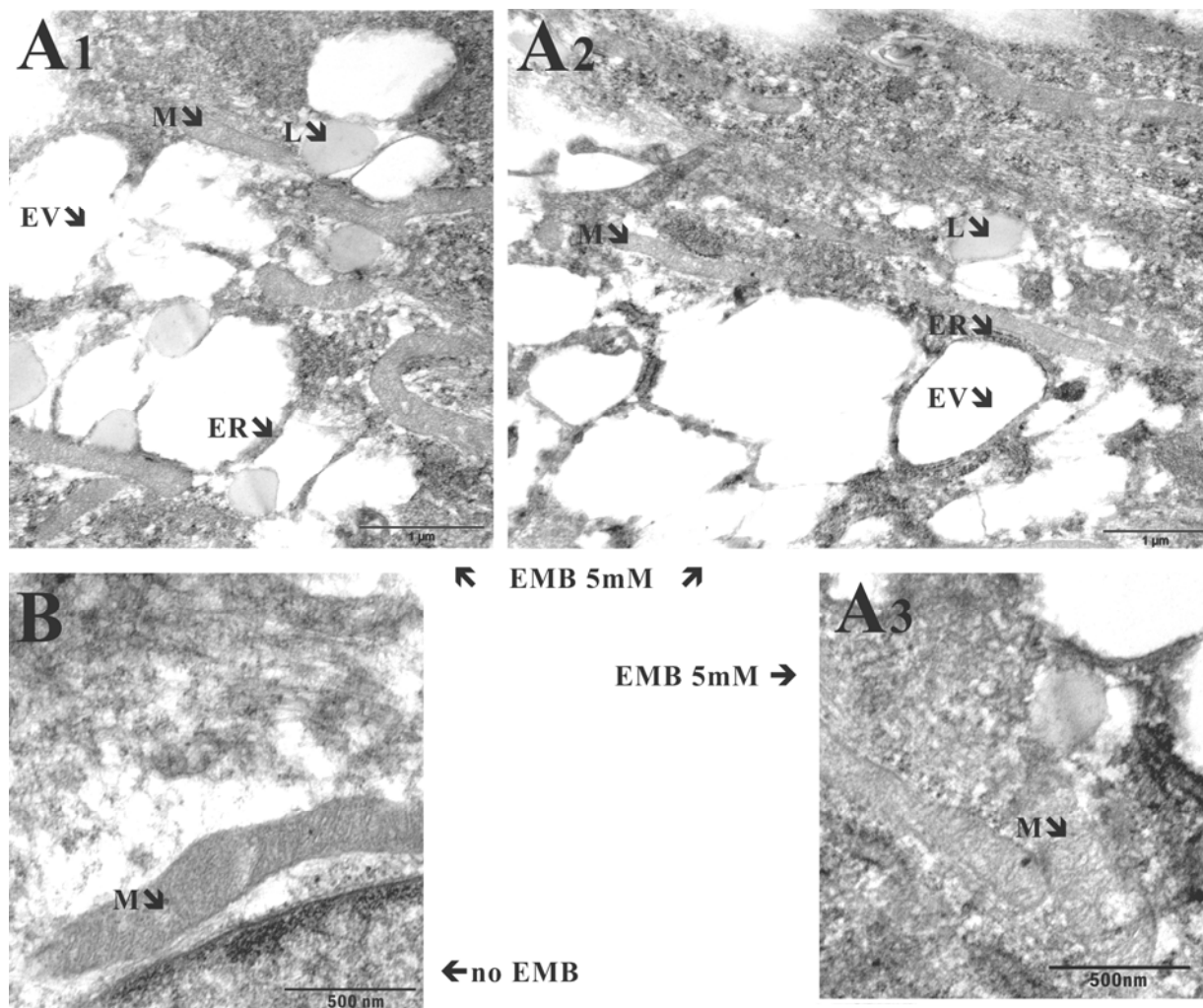
cells. Overlay image under phase contrast (B1, C1) of the green emission (B2, C2) and the red emission of JC-1 (B3, C3).

Neuronal PC12 cells were treated with 5 mM EMB for 24h and stained with TMRM to assess  $\Delta\Psi_m$ . Representative images under phase contrast (*left*), and fluorescence microscopy (*right*) are shown ( $D_{1-3}$ ). Pseudocolors were assigned on the basis of TMRM intensity. Neuronal cells without vacuoles show a higher mitochondrial membrane potential than PC12 cells with vacuoles. Relative TMRM intensities were calculated in the regions of interest defined around cells as shown in (*E*) and expressed in terms of intensities in cells without vacuoles. Scale bar: 10 $\mu$ m.



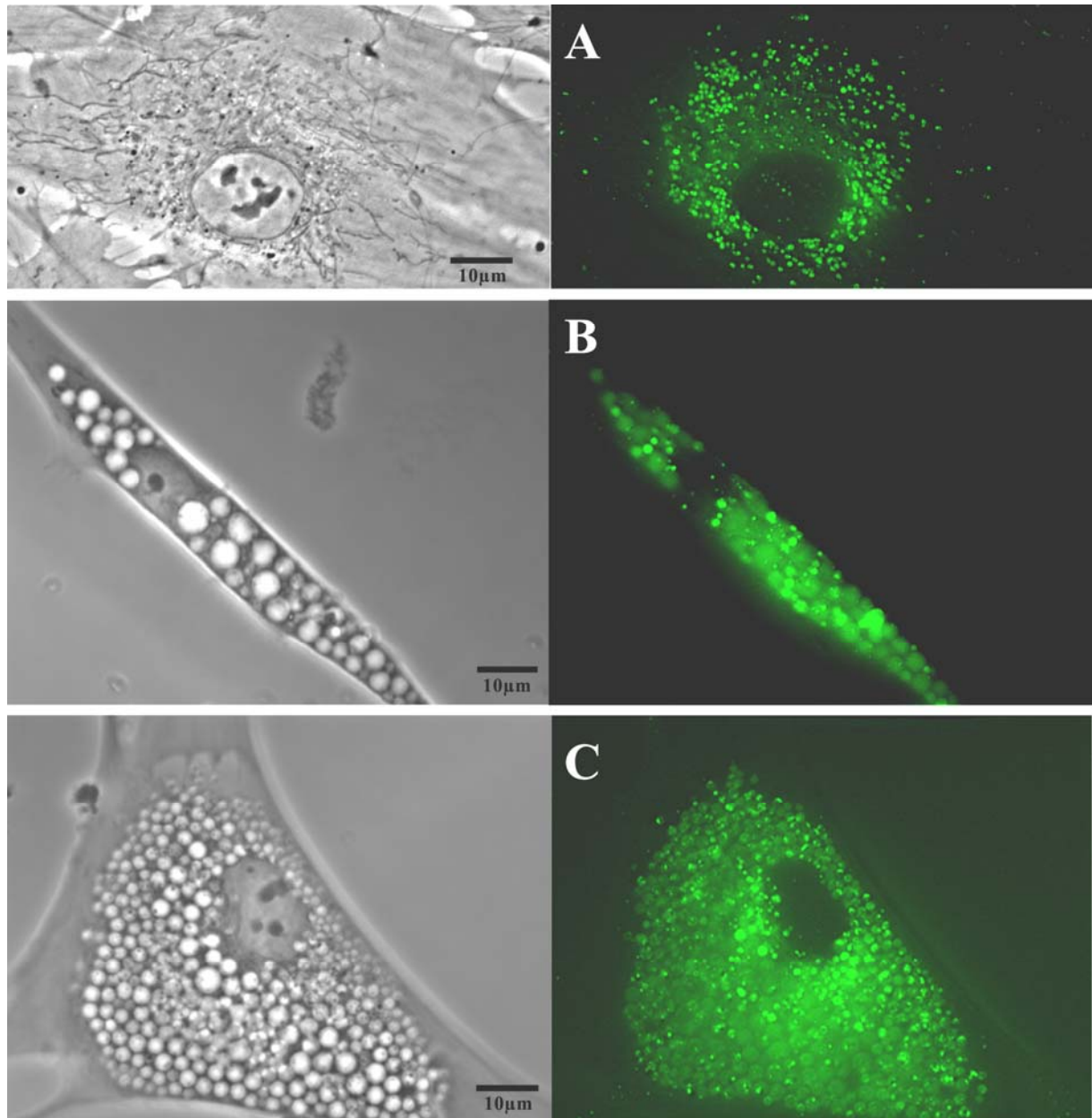
**Figure 3. Mitochondrial fragmentation in fibroblasts exposed to ethambutol.**

Phase contrast and fluorescence microscopy images of skin fibroblasts: (A) non-exposed; and (B) exposed to 5 mM EMB for 24h. Mitochondria were visualized with the MitoTracker red dye. Representative pictures of three independent experiments are shown. EMB treatment resulted in a fragmentation of the mitochondrial network. Thresholded fluorescent images were used to quantify mitochondrial length per cell; there was a higher proportion of short mitochondria. Each bar graph is the mean of at least 50 untreated control cells, or 5mM EMB treated cells (C). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .



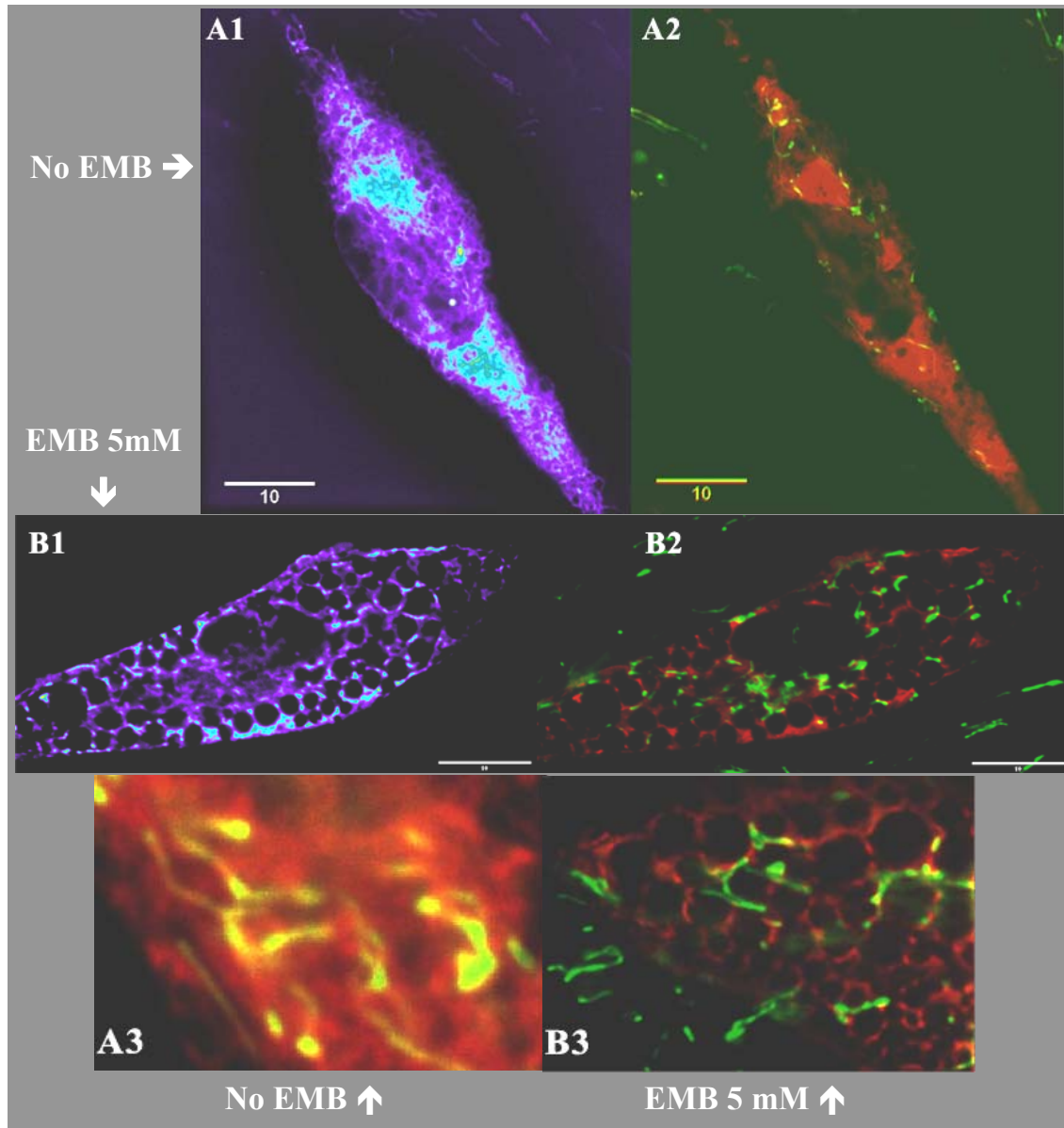
**Figure 4. Mitochondrial ultrastructure is not affected by ethambutol treatment.**

Representative electron micrographs of non-exposed fibroblasts (B) and exposed fibroblasts to 5 mM EMB for 24h (A<sub>1-3</sub>). Arrows indicate normal mitochondria (M), lysosomes (L), endoplasmic reticulum (ER) and vacuoles induced by EMB (EV). Scale bars: 1 μm and 500 nm.



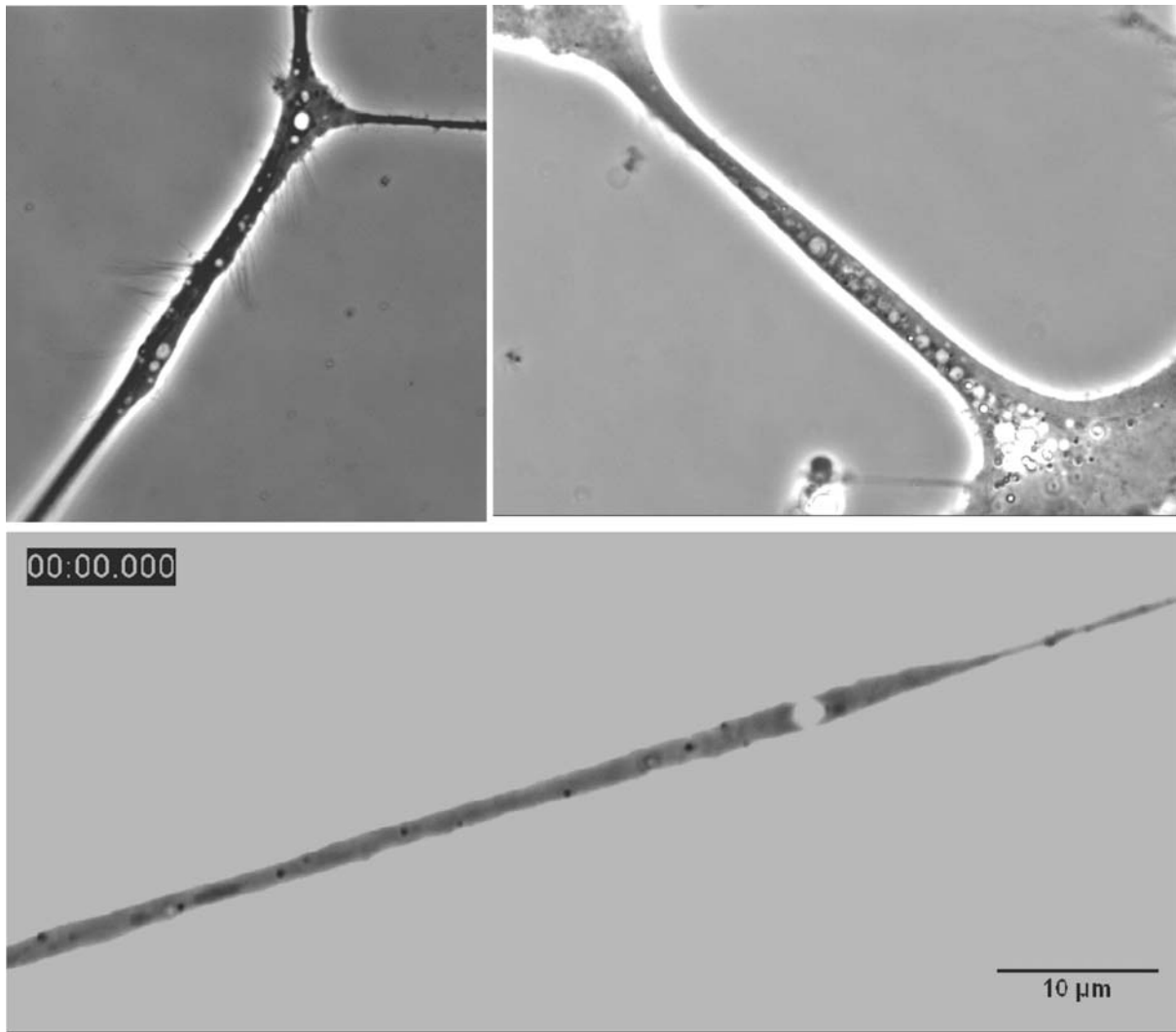
**Figure 5. Ethambutol induced vacuoles are acidic compartments.**

Lysosomes were visualized with LysoTracker green dye. Representative phase contrast and fluorescence microscopy images of unexposed fibroblasts (A); and fibroblasts exposed to 5 mM EMB for 24h (B and C). EMB vacuoles were partially stained with LysoTracker dye. Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Figure 6. Ethambutol treatment comminutes the endoplasmic reticulum and reduces ER-mitochondria interaction.**

Endoplasmic reticulum was observed with transitory transfected fluorescent pDsRed-ER and represented in pseudocolor imaging in (A1) and (B1). Highly diffused and thin, connected endoplasmic reticulum networks were seen in cells untreated with EMB (A1). Disorganized and fragmented ER networks were found in fibroblasts exposed to 5 mM EMB for 24h (B1). In the overlay pictures (A2-3) and (B2-3), ER is represented in red, and mitochondria in green. The yellow colouring indicates possible contact between organelles. Control fibroblasts showed greater interaction between organelles than EMB-treated cells. Scale bar: 10  $\mu$ m. Sequences in the Z-axis of (A) and (B) are shown in Video S1.



**Figure 7. Localisation of ethambutol-induced vacuoles in the axon-like structures of neuronal PC12 cells.**

Representative phase contrast microscopy of axon-like structures of neuronal PC12 cells treated with 1 mM EMB for 24h.

## SUPPLEMENTARY DATA

**Table S1. mtDNA sequence variations identified in patient's DNA.**

Nucleotide position	Amino acid substitution	Locus	Presence in Mitomap database	Presence in MtDB (2704)	Interspecies conservation	Status
m.73A>G	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.146T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.152T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.195T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.263A>G	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.309insCCT	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.310T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.499G>A	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.524insAC	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.567A>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.750A>G	-	MT-RNR1	Yes			Poly
m.1243T>C	-	MT-RNR1	Yes			Poly
m.1438A>G	-	MT-RNR1	Yes			Poly
m.1811A>G	-	MT-RNR2	Yes			Poly
m.2706A>G	-	MT-RNR2	Yes			Poly
m.4646T>C	p.Y59Y	MT-ND2	Yes			Poly
m.4769A>G	p.M100M	MT-ND2	Yes			Poly
m.5999T>C	p.A32A	MT-CO1	Yes			Poly
m.6047A>G	p.L48L	MT-CO1	Yes			Poly
m.7028C>T	p.A375A	MT-CO1	Yes			Poly
m.7664G>A	p.A27T	MT-CO2	No	Yes (10)	28%	Poly
m.7705T>C	p.Y40Y	MT-CO2	Yes			Poly
m.8860A>G	p.T112A	<u>MT-ATP6</u>	Yes			Poly
m.11332C>T	p.A191A	<u>MT-ND4</u>	Yes			Poly
m.11339T>C	p.L194L	<u>MT-ND4</u>	Yes			Poly
m.11467A>G	p.L236L	<u>MT-ND4</u>	Yes			Poly
m.11719G>A	p.G320G	<u>MT-ND4</u>	Yes			Poly
m.12308A>G	-	<u>MT-TL2</u>	Yes			Poly
m.12372G>A	p.L12L	<u>MT-ND5</u>	Yes			Poly
m.12717C>T	p.I127I	<u>MT-ND5</u>	Yes			Poly
m.13528A>G	p.T398A	<u>MT-ND5</u>	Yes	Yes (2)	36%	described as <u>LHON-like</u> ,
m.13565C>T	p.S410F	<u>MT-ND5</u>	No	Yes (2)	19%	probably
m.14082C>G	p.G582G	<u>MT-ND5</u>	Yes			poly
m.14620C>T	p.G18G	<u>MT-ND6</u>	Yes			probably
m.14766C>T	p.T7I	MT-CYB	Yes			poly
m.15326A>G	p.T194A	MT-CYB	Yes			Poly
m.15693T>C	p.M316T	MT-CYB	Yes			Poly
m.16189T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.16248C>T	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.16356T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly
m.16519T>C	-	MT-DLOOP	Yes			Poly



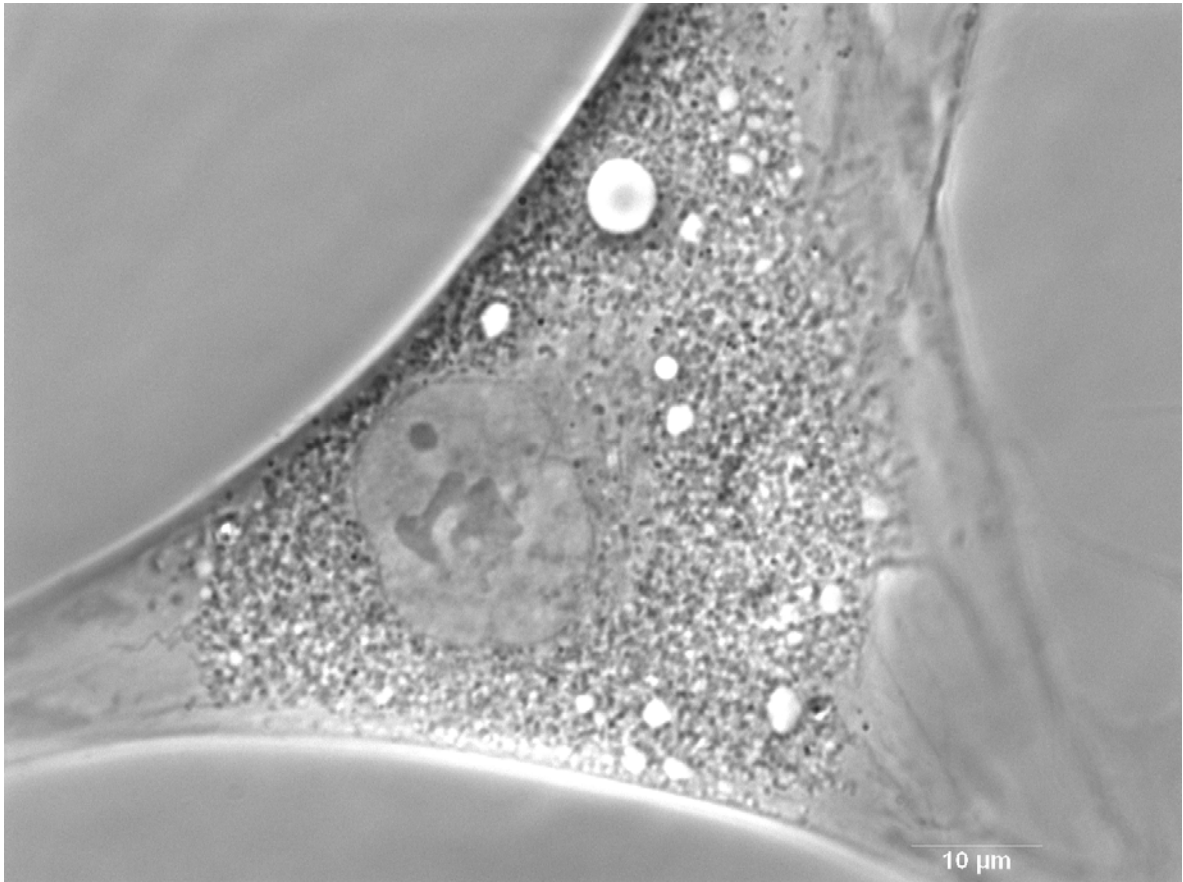
PCR amplification and direct sequencing of the entire mitochondrial genome was performed. The large majority of mtDNA base substitutions represented previously reported mtDNA polymorphisms in the Mitomap and/or mtDB databases [1,2]. This patient belongs to mitochondrial caucasian haplogroup U4b.

A heteroplasmic G to A transition at nucleotide 7664 of the CO2 gene changing an alanine in threonine was detected in proband's DNA. However, the m.7664G>A variant found several times in mtDB database did not show a high interspecies conservation (28% conservation index) based on a set of 61 species. This substitution was either an alanine or a threonine at this position, and then do not argue in favor of a deleterious nature of this variant.

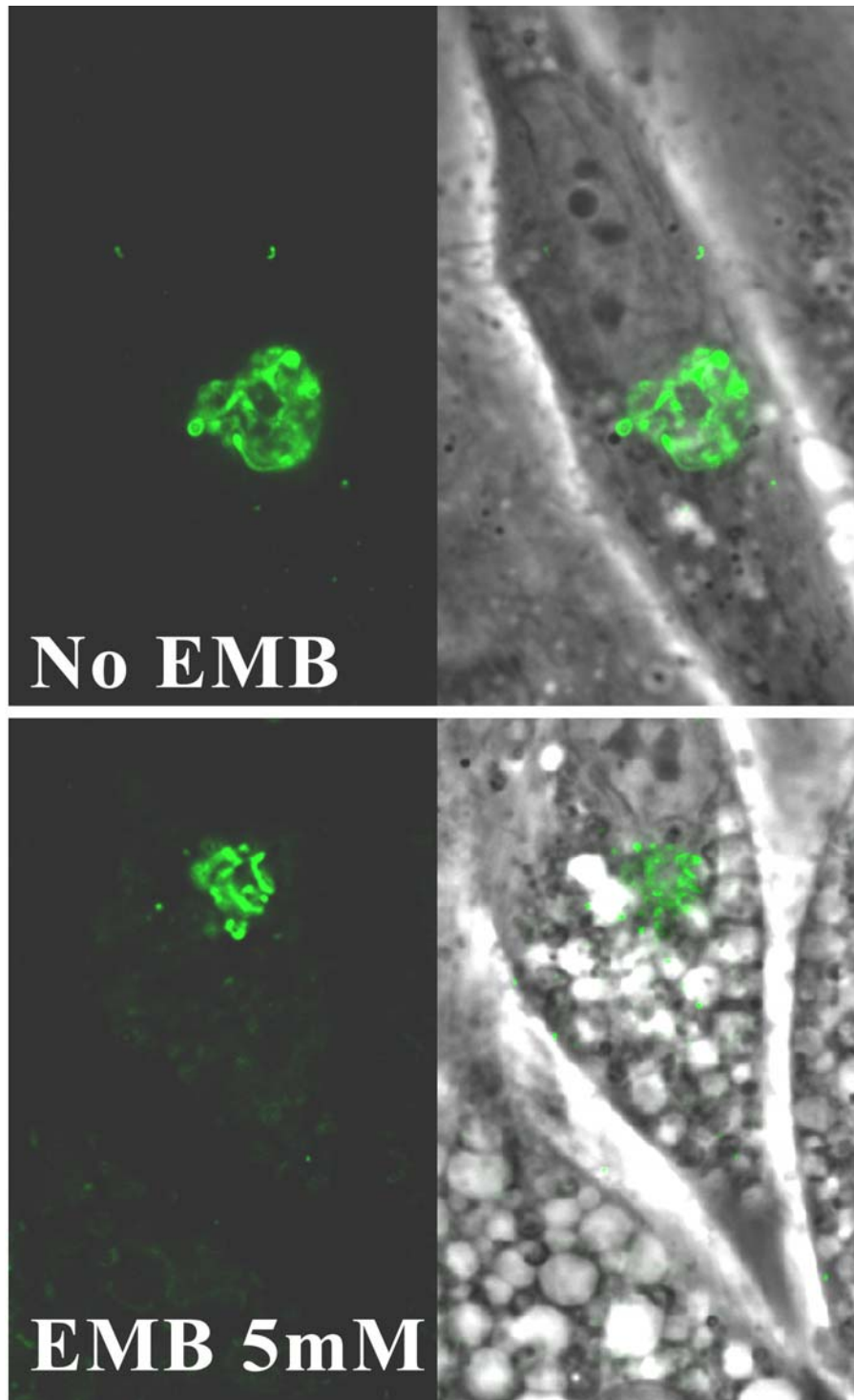
In addition, two homoplasmic variants, m.13528A>G and m.13565C>T were identified with a poor conservation index, 36% and 19% respectively. The m.13528A>G substitution has been previously reported with LHON like symptoms [3], but predicted to be associated with a very low score of mitochondrial pathogenicity [4]. Moreover, both m.13528A> G and m.13565C>T variants were also found in 2 mtDNA sequences of the mtDB database, which belong to the same U4b haplogroup similar to our patient, strongly suggesting that these substitutions are more likely polymorphisms

Numbers in brackets indicate the number of sequences harboring the same substitution among a total of 2704 sequences found in the mtDB database. A total of 61 mammal sequences were used for interspecies comparison for mtDNA polypeptides from GiiB-JST mtSNP (mitochondrial      Single      Nucleotide      Polymorphism)      database ([http://mitsnp.tmig.or.jp/mitsnp/search\\_mtSAP\\_evaluation\\_e.html](http://mitsnp.tmig.or.jp/mitsnp/search_mtSAP_evaluation_e.html)). Poly: Polymorphism.

1. Ruiz-Pesini E., Lott M., Procaccio V., Poole J., Brandon M., Mishmar D., Yi C., Kreuziger J., Baldi P., Wallace D., 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. Nucl. Acids Res. 35, D823-D828.
2. Ingman M., Gyllensten U., 2006. mtDB: Human mitochondrial genome database, a resource for population genetics and medical science. Nucl. Acids Res. 34, D749-D751.
3. Batandier, C., Picard, A., Tessier, N., Lunardi, J. (2000) "Identification of a novel T398A mutation in the ND5 subunit of the mitochondrial complex I and of three novel mtDNA polymorphisms in two patients presenting ocular symptoms". Human Mutation. 16 (6): 532
4. Mitchell, A. L., Elson, J. L., Howell, N., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. (2006) "Sequence variation In mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism?". Journal of Medical Genetics. 43 (2): 175-179



**Figure S1. Ethambutol treatment induced formation of vacuoles from 1 mM upwards.** Phase contrast microscopy of fibroblasts exposed to 1 mM EMB for 28 days. The cytoplasm of the cells contained vacuoles.



**Figure S2. The ethambutol treatment did not disrupt the Golgi apparatus.**

The Golgi apparatus was observed with pEYFP-Golgi fluorescence. Representative phase contrast and fluorescence microscopy images of non-exposed fibroblasts (A); and fibroblasts exposed to 5 mM EMB for 24h (B).

**Video S1 and S2. The number of close contacts between endoplasmic reticulum and mitochondria was reduced.**

Movie showing several fields (every 300 nm) along the Z-axis of the mitochondrial network (green) and reticulum endoplasmic (red). The yellow colouring indicates possible contact between these organelles.

**Video S3. Ethambutol-induced vacuoles clog mitochondrial and cargo traffic in the axon-like structures of neuronal PC12 cells.**

Representative time-lapse of a phase contrast microscopy of axon-like structures of neuronal PC12 cells treated with 1 mM EMB for 24h. Orange colour corresponds to darkness structures observed in phase contrast microscopy as mitochondria and cargos. The EMB vacuole (arrow) limited the progression of these structures along the axon-like extension. Images are shown every 15 sec.

## **D. Résultats**

**Dans notre première étude**, nous avons analysé les fibroblastes de 10 sujets sains, de 7 patients atteints d'ADOA dont une forme « ADOA plus », de 2 patients atteints d'ADOAC et de 7 patients atteints de LHON dont 4 ayant la forme « LHON plus ».

Nous avons mesuré l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et mis en évidence une diminution de 39% de l'activité du complexe I dans les fibroblastes de patients LHON. Pour les fibroblastes ADOA et ADOAC, nous avons montré une diminution de 25% de l'activité du complexe IV et une augmentation de 60% de l'activité du complexe V.

Les paramètres respiratoires des fibroblastes ont par la suite été déterminés.

Sur fibroblastes intacts, la respiration non phosphorylante mesurée en présence d'oligomycine est augmentée de deux fois pour tous les patients LHON, ADOA et ADOAC par rapport aux contrôles. En revanche, la capacité respiratoire maximale de la chaîne mesurée en présence de FCCP, un agent découplant, est abaissée pour tous les patients. Ainsi, le RCR (rapport de contrôle respiratoire) qui est le rapport de la capacité respiratoire maximale mesurée en présence de FCCP par la respiration non couplée à la synthèse d'ATP mesurée en présence d'oligomycine est diminué. Ceci traduit l'utilisation d'une part plus importante de la capacité respiratoire maximale pour compenser la fuite de protons et indique une augmentation de la fuite de protons pour ces trois affections neurologiques.

Sur fibroblastes perméabilisés, nous avons mesuré la consommation d'oxygène maximale en conditions phosphorylantes (état 3) et la synthèse d'ATP mitochondriale. Ces mesures nous ont permis de montrer une diminution du rapport ATP/O dans les fibroblastes de patients LHON, ADOA et ADOAC par rapport aux contrôles indiquant une baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives.

Afin de déterminer le potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), nous avons utilisé la sonde JC-1. Ce composé fluoresce dans le vert sous forme monomérique à faible concentration et à faible potentiel alors qu'il s'accumule dans les mitochondries à fort potentiel où il forme des agrégats qui fluorescent dans le rouge. Nous avons montré une diminution du  $\Delta\Psi_m$  dans les fibroblastes des patients atteints de LHON, ADOA et ADOAC.

Ces données indiquent un défaut de couplage des phosphorylations oxydatives commun aux trois pathologies.

Le rapport de la respiration basale (i.e. respiration qui permet de satisfaire les besoins cellulaires en conditions basales), par la capacité respiratoire maximale mesurée en présence de FCCP est augmenté dans les fibroblastes de patients LHON, ADOA et ADOAC ce qui indique qu'ils utilisent une plus grande part de leur capacité respiratoire maximale par rapport aux contrôles, vraisemblablement afin de compenser le défaut de couplage. Nous avons également montré que dans les fibroblastes de patients atteints d'ADOA et ADOAC, la capacité respiratoire maximale mesurée en présence de FCCP est corrélée à la capacité fonctionnelle maximale du complexe IV mesurée en présence d'ascorbate et de TMPD sur fibroblastes intacts, bien que cette capacité maximale du complexe IV soit supérieure et donc en excès par rapport à la capacité respiratoire maximale de la chaîne. Il existe également une corrélation négative entre la baisse du rapport ATP/O et l'augmentation de l'activité du complexe V dans les fibroblastes de patients ADOA et ADOAC suggérant que ces fibroblastes compensent leur défaut de couplage et maintiennent leur synthèse d'ATP par une augmentation de l'activité du complexe V.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au contenu cellulaire en ATP des fibroblastes cultivés dans un milieu où le glucose est remplacé par du galactose. Ce milieu favorise la synthèse d'ATP mitochondriale par rapport à la production glycolytique (Carelli *et al.*, 2004b). Ce changement de milieu diminue le contenu en ATP des fibroblastes contrôles, LHON, ADOA et ADOAC d'un pourcentage équivalent sauf pour les fibroblastes des quatre patients « LHON plus » et du patient « ADOA plus » qui ont un contenu en ATP plus faible.

L'étude de la morphologie du réseau mitochondrial montre que la structure du réseau mitochondrial n'est pas affectée dans les fibroblastes de patients atteints de LHON et ADOAC. En revanche, dans les fibroblastes ADOA, le réseau est fragmenté chez certains patients alors qu'il apparaît normal et interconnecté chez d'autres patients.

Ainsi, cette étude met en évidence un défaut de couplage des phosphorylations oxydatives dans les fibroblastes porteurs de mutations du gène *OPA1*, sans relation avec la morphologie du réseau mitochondrial.

**Dans notre deuxième étude**, nous avons analysé les effets d'un traitement par éthambutol 1 mM pendant 7, 14, 21 et 28 jours sur les paramètres respiratoires des fibroblastes contrôles et d'un patient porteur de la mutation p.I382M du gène *OPA1* dont les signes cliniques d'ADOA sont apparus suite à un traitement anti-tuberculeux par éthambutol.

Nous avons montré que les fibroblastes du patient présentent une augmentation de la respiration basale, une augmentation de la respiration non phosphorylante en présence d'oligomycine et une diminution du rapport ATP/O par rapport aux fibroblastes contrôles. Ces données indiquent une augmentation de la fuite de protons, une baisse d'efficacité et donc un défaut de couplage des phosphorylations oxydatives. En revanche, la synthèse d'ATP est maintenue dans les fibroblastes du patient.

Le traitement par éthambutol n'a pas d'effet sur la respiration basale mais provoque une augmentation de la respiration non phosphorylante à la fois chez le patient et chez les contrôles avec une augmentation significative à partir de 14 jours de traitement. Le rapport ATP/O reflétant l'efficacité des phosphorylations oxydatives est également abaissé après 28 jours de traitement, à la fois chez les contrôles et chez le patient. Cependant, les effets de l'éthambutol sont beaucoup plus prononcés pour les fibroblastes contrôles que pour les fibroblastes du patient. Nous avons également montré que le traitement par éthambutol n'altère pas la synthèse d'ATP mitochondriale.

L'étude des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale des fibroblastes du patient nous a permis de montrer une baisse de l'activité du complexe IV (1,18 vs 1,45±0,14), comme observée chez les autres patients atteints d'ADOA. De manière intéressante, l'éthambutol diminue spécifiquement l'activité du complexe IV des fibroblastes contrôles mais n'a pas d'effet chez le patient pour lequel l'activité est déjà affectée. Cette diminution évolue avec le temps, atteignant une baisse de 25% après 28 jours de traitement (i.e. le niveau atteint dans les fibroblastes ADOA).

Dans les cellules traitées par de l'éthambutol, nous avons observé la présence de vacuoles au sein des cellules, dont la distribution n'est pas homogène puisqu'elles s'accumulent préférentiellement dans certaines cellules. Pour étudier les conséquences de cette accumulation de vacuoles, nous avons poursuivi notre étude par un traitement de 5 mM pendant 24 heures. A l'aide de la sonde JC-1 nous avons montré une diminution du potentiel de membrane mitochondrial spécifiquement dans les fibroblastes chargés de vacuoles. Ces résultats ont été confirmés sur la lignée neuronale PC12 en présence de JC-1 et de TMRM, une autre sonde dont l'accumulation mitochondriale est proportionnelle au potentiel de membrane. Nous avons également constaté que l'éthambutol induit une fragmentation importante du réseau mitochondrial. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de l'éthambutol sur la structure des autres organites intracellulaires. La sonde fluorescente LysoTracker® s'accumule avec une forte intensité de fluorescence dans les organites acides

comme les lysosomes et les endosomes tardifs. La plupart des vacuoles induites par l'éthambutol sont marquées par la sonde avec une plus faible intensité de fluorescence, suggérant un contenu acide d'origine lysosomal. L'observation des cellules traitées par l'éthambutol au microscope électronique montre que les vacuoles se distinguent des lysosomes et qu'elles sont bordées de réticulum endoplasmique. Nous avons également montré que la morphologie du réticulum endoplasmique est perturbée par l'éthambutol et forme un réseau vacuolaire dont le nombre de zones de contacts avec les mitochondries est diminué. En revanche, la structure de l'appareil de Golgi n'est pas affectée par le traitement. Enfin, nous avons remarqué que bien que les vacuoles s'accumulent préférentiellement dans le soma des cellules neuronales PC12, certaines sont retrouvées dans les prolongements cellulaires.

## ***E. Discussion***

### **➤ Article 1**

#### ***Défaut de couplage des OXPHOS commun aux fibroblastes ADOA, ADOAC et LHON***

Dans notre première étude, nous avons mis en évidence un défaut de couplage des phosphorylations oxydatives commun aux fibroblastes de patient atteints d'ADOA, d'ADOAC et de LHON. Cette baisse d'efficacité commune des phosphorylations oxydatives peut être à l'origine des similarités cliniques existant entre les pathologies. La description de nombreuses variations phénotypiques rend le diagnostic différentiel difficile, et souvent, seule la génétique moléculaire permet de distinguer ces neuropathies optiques avec certitude. Le cas d'un patient porteur d'une mutation du gène *OPA1* possédant les symptômes cliniques de la LHON (atrophie optique aigüe de survenue tardive) a d'ailleurs été récemment décrit (Nochez *et al.*, 2009). De plus, des signes de sclérose multiple ont été associés aussi bien à la LHON (Harding *et al.*, 1992) qu'à l'ADOA (Verny *et al.*, 2008). Le défaut de couplage mis en évidence s'accompagne d'une baisse du potentiel de membrane mitochondrial. Cela indique que les mutations du gène *OPA1* ont des répercussions sur le métabolisme énergétique mitochondrial, comme cela avait été décrit pour les mutations associées à la LHON.

#### ***Altérations métaboliques associées au défaut de couplage***

Les altérations métaboliques associées à ce défaut de couplage sont différentes. La diminution de capacité respiratoire maximale mesurée en présence de FCCP peut être



attribuée à la baisse d'activité du complexe I pour les fibroblastes LHON et à la baisse d'activité du complexe IV pour les fibroblastes ADOA et ADOAC. En effet, dans ces derniers, la capacité respiratoire maximale est corrélée à la capacité fonctionnelle maximale du complexe IV, indiquant un contrôle de la respiration par ce complexe. Il a d'ailleurs été montré que dans de nombreux types cellulaires, y compris les fibroblastes, la capacité fonctionnelle maximale de la cytochrome *c* oxydase n'est que légèrement supérieure au taux de respiration endogène *in vivo* suggérant un contrôle étroit de la respiration par le complexe IV (Villani *et al.*, 1998).

### Conséquences de la baisse d'efficacité des OXPHOS

Les conséquences de la baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives sont différentes entre les trois pathologies. La baisse d'activité du complexe I provoque une diminution de la synthèse d'ATP en présence des substrats du complexe I dans les fibroblastes de patients LHON. En revanche, la synthèse d'ATP est maintenue chez les patients ADOA et ADOAC en présence des substrats des complexes I et II. Ceci indique que la baisse d'activité du complexe IV n'est pas limitante pour le maintien de la synthèse d'ATP. En effet, nous avons montré que la capacité maximale fonctionnelle de ce complexe est supérieure à la capacité maximale de la chaîne respiratoire. Ceci suggère que la baisse du complexe IV n'est probablement pas la cause primaire du défaut énergétique. Cette diminution d'activité pourrait être liée au rôle de la protéine OPA1 dans la structuration des crêtes mitochondriales. En effet, la majorité du cytochrome *c* (>80%) est séquestrée plus particulièrement au niveau des crêtes mitochondriales (Arnoult *et al.*, 2005). Si les mutations du gène *OPA1* provoquent une déstructuration des crêtes, il est possible qu'une diminution de la concentration en cytochrome *c* à proximité du complexe IV puisse conduire à une baisse de son activité.

### Compensation du défaut de couplage dans les fibroblastes ADOA et ADOAC

Le maintien de la production d'ATP dans les fibroblastes ADOA et ADOAC indique la mise en place d'un mécanisme de compensation du défaut de couplage. Nous avons montré qu'il existe une corrélation négative entre la baisse du rapport ATP/O et l'augmentation de l'activité du complexe V dans les fibroblastes de patients ADOA et ADOAC. Cela suggère que ces fibroblastes compensent leur défaut de couplage et maintiennent leur synthèse d'ATP par une augmentation de l'activité du complexe V. Il est intéressant de rappeler que *mgm1p*,

l'orthologue de OPA1 chez la levure, intervient dans l'assemblage en dimère du complexe V (ATP synthase) et ainsi dans la formation des crêtes permettant de concentrer le cytochrome *c* (Amutha *et al.*, 2004). De plus, l'état d'oligomérisation du complexe V est important pour la formation du complexe cytochrome *c*-complexe IV et donc pour l'activité du complexe IV (Saddar *et al.*, 2008) mais également pour le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Bornhövd *et al.*, 2006). Ainsi, telle *mgm1p*, la protéine OPA1 pourrait intervenir dans l'assemblage du complexe V, ce qui expliquerait les répercussions des mutations sur l'activité des complexes IV et V et sur le potentiel de membrane.

#### Corrélation phénotype clinique-phénotype biochimique

De manière intéressante, nous avons mis en évidence une corrélation entre le phénotype biochimique des fibroblastes et le phénotype clinique des patients. En effet, lorsqu'ils sont cultivés en milieu galactose, les fibroblastes de patients atteints des formes « LHON plus » et « ADOA plus » ont un contenu en ATP plus faible que les fibroblastes LHON et ADOA. Ceci indique que le défaut énergétique est plus prononcé dans les fibroblastes de patients atteints des formes « plus » dont le phénotype clinique est plus sévère. En revanche, aucun lien n'a pu être établi entre le type de pathologie et la structure du réseau mitochondrial, les mutations du gène *OPA1* ne conduisant pas systématiquement à une fragmentation du réseau.

#### Pathogenèse de l'ADOA et métabolisme énergétique

Nos données sont en faveur d'un mécanisme d'haplo-insuffisance dans la pathogenèse de l'ADOA. En effet, les fibroblastes ADOA présentent une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, une diminution d'activité du complexe IV et une fragmentation du réseau pour trois des patients. Or, il a été montré que l'inhibition de l'expression de *OPA1* par siRNA dans les cellules HeLa conduit à une dissipation du potentiel de membrane, à une déstructuration des crêtes et à une fragmentation du réseau mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003). Les conséquences des mutations des gènes *OPA1* et *OPA3* sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale étant identiques, il est probable que le rôle de la protéine OPA3 puisse être lié à celui de OPA1.

D'autres études de la fonction mitochondriale sur des cellules de patients atteints d'ADOA et porteurs de mutations du gène *OPA1* ont été réalisées. Ainsi, Zanna *et al.*, (2008)

ont montré une diminution de la synthèse d'ATP dirigée par les substrats du complexe I dans les fibroblastes de 10 patients. Nos expériences ayant été réalisées en présence des substrats des complexes I et II pour les fibroblastes ADOA, il est possible qu'une compensation par le complexe II puisse masquer le déficit présent au niveau du complexe I. Par ailleurs, la baisse d'activité du complexe IV n'a pas été retrouvée dans les lymphoblastes de six patients atteints d'ADOA et porteurs de mutations du gène *OPA1* (Mayorov *et al.*, 2008). Bien que la plupart des déficits des complexes de la chaîne respiratoire présents dans les fibroblastes le soient également dans les lymphoblastes, il arrive que certains ne soient présents que dans les fibroblastes (Kirby *et al.*, 1999), ce qui souligne l'importance du type cellulaire étudié.

L'altération métabolique mise en évidence dans les fibroblastes des patients LHON, ADOA et ADOAC ne conduit pas à une augmentation du taux de mortalité cellulaire par rapport aux fibroblastes contrôles. En revanche, nous avons montré qu'ils utilisent pour leur respiration basale une plus grande part de leur capacité respiratoire maximale. Cela suggère que la capacité de réserve respiratoire des fibroblastes est plus faible et donc moins appropriée pour faire face à des conditions de demande énergétique accrue. Les cellules neuronales qui doivent mobiliser une importante quantité d'énergie pour propager l'influx nerveux seront certainement plus sensibles dans ces conditions. De plus, le découplage des phosphorylations oxydatives entraîne une chute du potentiel de membrane mitochondrial dans les fibroblastes de patients. Or, il existe une corrélation entre le transport axonal des mitochondries et le potentiel de membrane ; les mitochondries polarisées étant transportées vers le cône de croissance à l'extrémité de l'axone et les mitochondries dépolarisées à faible potentiel membranaire étant transportées vers le corps cellulaire (Miller et Sheetz, 2004). Il serait alors intéressant d'étudier le transport axonal mitochondrial dans un modèle neuronal d'ADOA ainsi que l'influence de modulateurs de la chaîne respiratoire sur ce transport et sur la viabilité neuronale afin de déterminer si une anomalie des mouvements mitochondriaux au sein des axones peut intervenir dans le mécanisme de neurodégénérescence.

## ➤ Article 2

Les symptômes d'atrophie optique d'un patient porteur de la mutation p.I382M du gène *OPA1* sont apparus suite à un traitement antituberculeux associant plusieurs antibiotiques dont l'éthambutol. Ce cas d'ADOA déclenchée par l'éthambutol est le premier

rapporté à ce jour alors que plusieurs avaient été décrits dans le cas de la LHON (Dotti *et al.*, 1998 ; De marinis, 2001 ; Hwang *et al.*, 2003 ; Ikeda *et al.*, 2006). Cet effet synergique et délétère existant entre les mutations responsables d'ADOA/LHON et le traitement par éthambutol nous a conduits à étudier l'influence d'un traitement par éthambutol sur la fonction énergétique mitochondriale.

Effets de l'éthambutol sur le fonctionnement des OXPHOS :

o *dans les fibroblastes contrôles*

Nous avons exposé des fibroblastes contrôles à de l'éthambutol 1 mM pendant 7, 14, 21 et 28 jours. Nos résultats montrent que l'éthambutol ne modifie pas la respiration basale mais augmente la respiration insensible à l'oligomycine de deux fois à partir du 14<sup>ème</sup> jour. Le rapport de la capacité respiratoire maximale, mesurée en présence de FCCP, par la respiration non phosphorylante, mesurée en présence d'oligomycine, ou RCR est alors diminué de moitié. Le rapport du taux de synthèse d'ATP par la consommation d'oxygène (ATP/O) est fortement abaissé ce qui indique une baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives alors que la synthèse d'ATP mitochondriale en elle-même n'est pas modifiée. L'éthambutol a donc un effet découplant sur les phosphorylations oxydatives. De plus, nous avons montré que ce traitement diminue l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire de manière significative à partir du 14<sup>ème</sup> jour, atteignant une baisse de 25% à 28 jours. Il est intéressant de souligner que ces modifications métaboliques sont les mêmes que celles retrouvées dans les fibroblastes des patients atteints d'ADOA (1<sup>er</sup> article).

o *dans les fibroblastes du patient porteur de la mutation p.I382M du gène OPA1*

Les effets de l'éthambutol sur le métabolisme mitochondrial pourraient expliquer l'effet synergique de ce traitement et de la mutation p.I382M du gène *OPA1*. Nous avons alors exposé les fibroblastes du patient *OPA1\_p.I382M* au même traitement et avons montré une augmentation de la respiration non phosphorylante, une diminution du RCR et du rapport ATP/O, paramètres déjà altérés par la mutation *OPA1\_p.I382M*. Cependant, l'activité du complexe IV, déjà abaissée chez le patient, n'est pas affectée par l'éthambutol et l'effet sur les paramètres respiratoires est beaucoup moins prononcé que pour les contrôles, ce qui suggère l'existence d'un seuil au-delà duquel le métabolisme ne peut être affecté sans compromettre la survie cellulaire. De la même manière, il a été préalablement montré sur des lignées neuronales cybrides NT2/D1 issues de teratocarcinome qu'il n'y a pas de synergie entre le

traitement à l'éthambutol et la mutation de l'ADNmt G11778A responsable de LHON, sur la fonction énergétique et la réplication de l'ADNmt (Pommer *et al.*, 2008). Cependant, ces résultats n'excluent pas que l'effet de l'éthambutol puisse être potentialisé par de telles mutations dans les cellules ganglionnaires de la rétine qui correspondent au type cellulaire le plus vulnérable aux effets toxiques de l'éthambutol (Barron *et al.*, 1974 ; Lessell, 1976).

De nombreux autres antibiotiques sont connus pour leur effet dommageable sur la mitochondrie. Il a d'ailleurs été démontré dans plusieurs études que des facteurs environnementaux, génétiques et/ou pharmacologiques, peuvent influencer la pénétrance de maladies mitochondriales liées à des mutations de l'ADNmt. Par exemple, la mutation A1555G localisée dans le gène codant l'ARNr12S augmente considérablement la sensibilité à la surdité induite par les aminoglycosides (Hutchin *et al.*, 1993), antibiotiques connus pour leur effet sur la traduction bactérienne. Cette mutation a été retrouvée à l'état homoplasmique dans plusieurs familles atteintes de surdité induite par les aminoglycosides transmise maternellement et dont la pénétrance dépend de gènes modificateurs nucléaires (Fischel-Ghodsian *et al.*, 2004 ; Bykhovskaya *et al.*, 2004). Il a été montré que la mutation A1555G provoque un changement de conformation de l'ARNr12S humain, rendant le ribosome mitochondrial plus proche du ribosome bactérien (Hamasaki *et al.*, 1997). Ces données suggèrent que la sensibilité mitochondriale aux antibiotiques puisse être liée à l'origine procaryote des mitochondries (Gray *et al.*, 1999). Certains antibiotiques agissent comme des inhibiteurs de la transcription et de la traduction mitochondriales (Kroon et Van den Bogert, 1983 ; Zhang *et al.*, 2005a) alors que d'autres inhibent ou découplent les OXPHOS (Lardy *et al.*, 1958 ; Newton, 1965 ; Reed et Lardy, 1975 ; Gallagher *et al.*, 1986). La majorité des antibiotiques connus pour leur effet découplant sont des ionophores agissant directement sur la mitochondrie (Pressman, 1968 ; Hendersson *et al.*, 1969). En revanche, l'effet de l'éthambutol a été mis en évidence à partir de 14 jours de traitement grâce à l'étude de paramètres respiratoires mesurés après avoir lavé les cellules et donc sans éthambutol dans le milieu de respiration. Nous avons aussi constaté que l'éthambutol n'a pas d'effet protonophore sur des mitochondries isolées lorsqu'il est injecté dans la cuve de respiration en cours d'oxygraphie. Ceci suggère que l'éthambutol n'a pas d'effet aigu mais entraîne une adaptation du métabolisme mitochondrial conduisant au découplage des phosphorylations oxydatives.

Plusieurs éléments peuvent expliquer l'effet inhibiteur de l'éthambutol sur le complexe IV de la chaîne respiratoire. Il est important de souligner que ce complexe contient des atomes de cuivre nécessaires à son activité. L'éthambutol ainsi que son métabolite, l'éthylenediiminodibutyric acid, sont connus pour leur effet chelateur vis-à-vis des cations métalliques (Cole *et al.*, 1981 ; Solecki *et al.*, 1984) et peuvent donc interférer avec le métabolisme de cuivre conduisant ainsi à l'inhibition du complexe IV. Cependant, alors que le complexe I contient de nombreux centre fer/soufre, son activité n'est pas altérée par l'éthambutol. De manière intéressante, il a été montré que l'effet toxique de l'éthambutol était lié à un mécanisme nécessitant la présence de zinc intracellulaire (Yoon *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 2009). Or, il a été rapporté que le zinc a un effet inhibiteur sur l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Kuznetsova *et al.*, 2005).

#### *Les vacuoles induites par l'éthambutol participent aux altérations métaboliques*

L'observation microscopique des cellules traitées à l'éthambutol 1 mM pendant 28 jours nous a permis de noter la présence de petites vacuoles au sein des fibroblastes. Cette formation de vacuoles a été préalablement décrite comme étant dépendante de la dose utilisée ainsi que du temps d'exposition (Yoon *et al.*, 2000). En utilisant de plus fortes concentrations d'éthambutol (2,5 mM et 5 mM) pendant 24 heures sur des fibroblastes contrôles et sur des cellules neuronales de la lignée PC12, nous avons observé la présence de plus grandes vacuoles occupant la quasi-totalité du cytoplasme cellulaire. Cependant, bien que la majorité des cellules soient touchées par cette accumulation de vacuoles, certaines cellules en sont dépourvues. L'utilisation de sondes sensibles au potentiel de membrane mitochondrial nous a permis de montrer une diminution du  $\Delta\Psi_m$  spécifique des cellules chargées de vacuoles. Cette diminution de potentiel est probablement une conséquence de l'effet découplant de l'éthambutol mais elle montre également que les vacuoles en elles-mêmes participent aux altérations métaboliques. En plus de cette baisse de  $\Delta\Psi_m$ , l'accumulation de vacuoles s'accompagne d'une fragmentation importante du réseau mitochondrial. De manière intéressante, la protéine OPA1 joue le rôle d'intermédiaire entre le métabolisme et la structure du réseau mitochondrial. En effet, il a été montré que la dissipation du  $\Delta\Psi_m$  conduit à un clivage protéolytique de la protéine OPA1 conduisant à une fragmentation mitochondriale (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006 ; Griparic *et al.*, 2007).

Les vacuoles induites par l'éthambutol interviennent donc dans les altérations métaboliques et leur encombrement cytoplasmique perturbe la morphologie intracellulaire. Le

lysotracker s'accumule partiellement dans les vacuoles induites par l'éthambutol, suggérant un contenu acide. Cependant, les études de microscopie électronique réalisées sur des fibroblastes traités ont montré que les vacuoles correspondent à des structures différentes des lysosomes et sont bordées de réticulum endoplasmique (RE). Suite au traitement par éthambutol, le RE est totalement déstructuré. Il forme un réseau vacuolaire dont les zones de contacts avec les mitochondries participant aux échanges calciques sont réduites. Le calcium étant un régulateur de certaines déshydrogénases impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial (McCormack et Denton, 1993), il est possible que ces altérations structurales participent aux effets néfastes de l'éthambutol sur la fonction énergétique mitochondriale. L'encombrement structural lié à la présence de vacuoles peut également affecter le transport axonal puisque certaines d'entre-elles sont localisées au niveau des structures « axon-like », c'est-à-dire dans les prolongements des cellules PC12. Le transport axonal est d'ailleurs critique pour la survie neuronale puisque des anomalies à ce niveau ont été rapportées dans certaines maladies neurodégénératives (Chang *et al.*, 2006 ; Baloh *et al.*, 2007), notamment suite à la présence de vacuoles (Chow *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008).

En conclusion, nous avons mis en évidence des altérations biochimiques communes aux effets de l'éthambutol et des mutations du gène *OPA1* (*cf.* figure 22). Le couplage des phosphorylations oxydatives, le potentiel de membrane mitochondrial, l'activité du complexe IV ainsi que la structure du réseau mitochondrial sont autant de paramètres qui, lorsqu'ils sont affectés, peuvent conduire à la neurodégénérescence. Finalement, comme pour la LHON, le fait que les symptômes de l'ADOA soient survenus suite à un traitement affectant le métabolisme énergétique mitochondrial souligne l'importance de ce dernier dans le mécanisme physiopathologique de ces neuropathies optiques.

## **II. CMT2A et Métabolisme énergétique mitochondrial**

### **Article 3:**

**Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease.**

Guillet V, Gueguen N, Verny C, Ferre M, Homedan C, Loiseau D, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Chevrollier A. Soumis à Neurogenetics. En révision.

### **Article 4:**

**Mitochondrial complexes II and V deficiencies associated with mK<sub>ATP</sub> channel opening in the brain tissue of MFN2 p.R94Q mice.**

Guillet V\*, Gueguen N\*, Cartoni R, Chevrollier A, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Martinou JC, Reynier P. \*Contribution égale de ces auteurs. En préparation.

### **A. Introduction**

Dans les deux études suivantes, nous nous sommes intéressés à l'impact des mutations du gène *MFN2* sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Ce gène code pour la protéine mitofusine 2 (MFN2), un composant essentiel de la machinerie de fusion mitochondriale chez les mammifères (Santel et Fuller, 2001). Il est le principal gène mis en cause dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A), une neuropathie périphérique sensitivo-motrice à transmission autosomique dominante (Zuchner *et al.*, 2004).

Certaines maladies neurodégénératives sont liés à des mutations de gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale ce qui suggère que les cellules neuronales sont particulièrement sensibles aux conditions compromettant l'équilibre existant entre la fission et la fusion de ces organites. L'hypothèse d'une dérégulation de la dynamique mitochondriale dans la physiopathologie de la CMT2A a été proposée. En ce sens, des études menées dans des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris (Detmer et Chan, 2007), de neurones de ganglions rachidiens de rat (Baloh *et al.*, 2007) et dans les neurones moteurs de souris transgéniques exprimant l'allèle pathogène MFN2<sup>T105M</sup> (Detmer *et al.*, 2008), montrent que l'expression de mutations du gène *MFN2* associées à la CMT2A induit une agrégation mitochondriale. Deux études réalisées à partir des nerfs périphériques de patients atteints de



CMT2A et porteurs de mutations du gène *MFN2* montrent une accumulation et une agrégation des mitochondries dans les axones (Verhoeven *et al.*, 2006 ; Vallat *et al.*, 2008). Plus récemment, la protéine MFN2 a également été impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial. La répression de son expression conduit à une diminution de l'oxydation du glucose, du potentiel de membrane mitochondrial, de la respiration cellulaire et de la fuite de protons (Bach *et al.*, 2003). De plus, une baisse de l'expression de *MFN2* est retrouvée dans des cas de diabète de type 2 et d'obésité, conditions pathologiques fréquemment associées à un défaut énergétique (Bach *et al.*, 2005). Enfin, MFN2 intervient dans la régulation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Pich *et al.*, 2005).

L'organisation du réseau mitochondrial et la fonction bioénergétique sont deux processus interdépendants reliés par un rapport bidirectionnel. En effet, il a été montré qu'une altération de structure du réseau mitochondrial perturbe la fonction énergétique et qu'à l'inverse, une altération du métabolisme a des répercussions sur le réseau mitochondrial (Benard *et al.*, 2007). De plus, les neurones sont très consommateurs d'énergie et de ce fait, sont particulièrement touchés par les maladies énergétiques mitochondriales. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une anomalie énergétique pouvait également intervenir dans la physiopathologie de la CMT2A. Pour tester et approfondir cette hypothèse, nous avons utilisé deux modèles d'étude de la CMT2A : Un modèle cellulaire, le fibroblaste qui est une cellule riche en mitochondries et dont la culture peut être facilement développée à partir de biopsies de peau de patients ; et un modèle animal murin de CMT2A.

Une précédente étude menée au laboratoire a permis de déterminer l'impact de mutations du gène *MFN2* sur la structure du réseau et la fonction énergétique mitochondriale dans des fibroblastes cutanés de quatre patients atteints de CMT2A (Loiseau *et al.*, 2007). Aucune anomalie de la structure du réseau mitochondrial n'a été mise en évidence. Cependant, il a été montré que les mutations du gène *MFN2* sont associées à une augmentation de la fuite de protons qui se traduit par une baisse du potentiel de membrane mitochondrial et à une diminution de l'efficacité des phosphorylations oxydatives. Aucune modification de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire, ni du taux de synthèse d'ATP n'a été retrouvée. Ceci permettait de suggérer l'existence d'un mécanisme compensatoire permettant de maintenir la synthèse d'ATP malgré la baisse d'efficacité de cette synthèse et ainsi assurer la production énergétique correspondant aux besoins cellulaires

mais cela, à un coût énergétique bien plus important. Si ces résultats montraient une anomalie du métabolisme énergétique dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A, ils ne permettraient pas d'en comprendre la cause. L'objectif de l'étude décrite dans le troisième article était donc d'explorer les mécanismes mis en jeu dans cette baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence de la nature des substrats utilisés par la chaîne respiratoire sur l'efficacité des OXPHOS, à l'expression des protéines découplantes (UCP) et à l'expression et l'activité du transporteur des nucléotides adényliques (ANT) qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la production mitochondriale d'ATP.

La CMT2A étant une maladie neurodégénérative, une approche expérimentale sur des cellules neuronales nous est apparue essentielle. Dans ce cadre, nous avons étudié un modèle murin de CMT2A élaboré par l'équipe de J.C Martinou à l'Université de Genève. Ces souris expriment, au niveau de leur tissu nerveux, l'ADNc *MFN2* humain porteur de la mutation p.R94Q et présentent les principaux symptômes cliniques retrouvés chez les patients atteints de CMT2A tels qu'une faiblesse musculaire distale et une diminution de la force de préhension. Une atrophie axonale dans la partie distale du nerf sciatique affectant préférentiellement les axones de grand diamètre a également été retrouvée. Il est important de souligner que l'expression du transgène dans ce modèle ne conduit pas à une agrégation des mitochondries, particularité fréquemment retrouvée dans les modèles de surexpression de la mitofusine 2, notamment dans un autre modèle murin de CMT2A (Detmer *et al.*, 2008). L'expression du transgène est ici modérée, ce qui permet d'avoir un modèle d'étude plus proche des conditions physiopathologiques. De plus, dans l'hypothèse d'un défaut énergétique majeur, ce modèle permettait d'envisager la mise en place de tests *in vivo* offrant ainsi des perspectives thérapeutiques. Ce quatrième article porte ainsi sur l'étude de la fonction énergétique des mitochondries isolées du cerveau de ce modèle murin. Etant donné les résultats obtenus sur les fibroblastes de patients, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'influence des substrats fournis à la chaîne respiratoire sur la consommation d'oxygène, la synthèse d'ATP et le potentiel de membrane mitochondrial. Nous avons également exploré les mécanismes associés à la modification du métabolisme mitochondrial et discuté leur éventuelle relation avec la mitofusine 2.

B. Article n°3

***Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease.***

*Virginie Guillet, Naïg Gueguen, Christophe Verny, Marc Ferre, Chadi Homedan, Dominique Loiseau, Vincent Procaccio, Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, Arnaud Chevrollier.*

*Neurogenetics 2009.*

# Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in *MFN2*-related Charcot–Marie–Tooth type 2A disease

Virginie Guillet · Naïg Gueguen · Christophe Verny · Marc Ferre · Chadi Homedan ·  
Dominique Loiseau · Vincent Procaccio · Patrizia Amati-Bonneau ·  
Dominique Bonneau · Pascal Reynier · Arnaud Chevrollier

Received: 24 April 2009 / Accepted: 29 June 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Charcot–Marie–Tooth type 2A disease (CMT2A), a dominantly inherited peripheral neuropathy, is caused by mutations in *MFN2*, a mitochondrial fusion protein. Having previously demonstrated a mitochondrial coupling defect in CMT2A patients' fibroblasts, we here investigate mitochondrial oxygen consumption and the expression of adenine nucleotide translocase (ANT) and uncoupling proteins from eight other patients with the

disease. The mitochondrial uncoupling was associated with a higher respiratory rate, essentially involving complex II proteins. Furthermore, a twofold increase in the expression of ANT led to the reduced efficiency of oxidative phosphorylation in CMT2A cells, suggesting that *MFN2* plays a role in controlling ATP/ADP exchanges.

**Keywords** Charcot–Marie–Tooth · CMT2A · *MFN2* · Mitochondria · Adenine nucleotide translocase

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10048-009-0207-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Guillet · N. Gueguen · C. Verny · M. Ferre · D. Loiseau ·  
P. Amati-Bonneau · D. Bonneau · P. Reynier · A. Chevrollier (✉)  
INSERM, U694,  
Angers 49000, France  
e-mail: archevrollier@chu-angers.fr

N. Gueguen · M. Ferre · C. Homedan · V. Procaccio ·  
P. Amati-Bonneau · D. Bonneau · P. Reynier · A. Chevrollier  
Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers,  
Angers 49000, France

V. Guillet · C. Verny · M. Ferre · D. Loiseau · V. Procaccio ·  
D. Bonneau · P. Reynier  
Faculté de Médecine, Université d'Angers,  
Angers 49000, France

C. Verny  
Département de Neurologie, CHU d'Angers,  
Angers 49000, France

V. Procaccio  
CNRS UMR6214, INSERM U771,  
49000 Angers, France

## Abbreviations

CMT2A	Charcot–Marie–Tooth type 2A disease
MFN2	Mitofusin 2
ANT	Adenine nucleotide translocase
OPA1	Optic atrophy 1
cATR	Carboxyatractylolide
UCP	Uncoupling protein
MP	Malate pyruvate
SR	Succinate rotenone

## Introduction

Charcot–Marie–Tooth disease (CMT) is a hereditary motor and sensory neuropathy affecting peripheral nerves [1]. CMT2A (MIM 609260) is the most common axonal form of this heterogeneous group of disorders. The main symptoms linked to axonal degeneration are distal muscle weakness and atrophy often associated with sensory loss, depressed tendon reflexes, and high-arched feet. The expressivity of the disease is highly variable among patients even within a given family. *MFN2*, one of the main genes known to be associated with CMT2A [2], is predominantly

expressed in the heart, skeletal muscle, and brain [3]. *MFN2* encodes the mitochondrial outer membrane protein mitofusin 2 (MFN2; MIM 608507) containing a large GTPase domain and two heptad repeat domains flanking a bipartite transmembrane segment [4]. Mitofusin oligomerization by the assembly of a dimeric, antiparallel coiled coil is essential for mediating fusion [4]. In CMT2A, the *MFN2* mutations are heterozygous missense mutations acting as dominant negative mutations [5]. *MFN2* mutations, in this as in other dominant diseases, are thought to cause disease by toxic gain-of-function mechanisms [6].

Mitochondria are dynamic organelles that undergo changes maintaining a continuous balance between fission and fusion [7]. This dynamic balance is finely regulated to ensure the maintenance of mitochondrial and cellular functions. MFN2, together with mitofusin 1 and optic atrophy 1 (OPA1) are essential components of the mitochondrial fusion machinery. Indeed, it has been shown in various model studies that functional loss of MFN2 leads to fragmentation of the mitochondrial network [5, 8]. Furthermore, mutations in *OPA1* as well as in *MFN2* are responsible for neurodegenerative diseases [2, 9], suggesting that neuronal cells are particularly sensitive to defects causing imbalance between mitochondrial fission and fusion [10].

Functional mitochondrial studies have shown that energetic metabolism is correlated with the expression of *MFN2* [11]. More precisely, the down-regulation of *MFN2* was found to be correlated with decreased glucose oxidation and reduced mitochondrial membrane potential [12]. In a previous study on fibroblasts from four CMT2A patients with *MFN2* mutations, we noted a decrease in mitochondrial membrane potential together with an energetic coupling defect. However, this uncoupling did not lead to a deficiency in ATP production [13]. In this study, we investigate some of the factors underlying the mitochondrial coupling defect, e.g., oxygen consumption, adenine nucleotide translocase (ANT), and uncoupling proteins, in eight CMT2A patients carrying six different *MFN2* mutations.

## Materials and methods

### Patients and cell cultures

Primary fibroblast cultures were grown from skin biopsies taken after obtaining written consent from eight control subjects and eight patients carrying six different *MFN2* mutations (p.M21V, p.R94Q, p.T105M, p.A166T, p.R364Q, and p.E744A) at Angers University Hospital. Cells were cultured in Dulbecco's minimum essential medium as described elsewhere [14].

### Oxygen consumption

The respiratory rates were measured on cells permeabilized by exposure to digitonin and resuspended in the respiratory buffer R (10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM mannitol, 10 mM KCl, and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4). The respiratory rates were recorded at 37°C in 2-ml glass chambers using a high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria).

### Adenosine triphosphate production and coupling efficiency in permeabilized cells

The rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio were measured with 5 mM malate, 5 mM pyruvate, and 10 mM succinate as substrates as described elsewhere [13].

### Complex I- and complex II-driven respiration

Respiration was started with complex I-dependent substrates (5 mM malate/5 mM pyruvate). Complex I-coupled state 3 respiration was measured by adding 0.5 mM  $\text{NAD}^+$ /1.5 mM ADP. Then, 10 mM succinate and 10  $\mu\text{M}$  rotenone were injected to obtain the complex II-coupled state 3 respiration. Finally, oligomycin was added to determine state 4 respiration.

### Titration of state 3 respiration with cATR

Respiration was started by adding 5 mM malate, 5 mM pyruvate, and 5 mM succinate. Then, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$  and 1.5 mM ADP were injected to induce state 3 respiration. Finally, a titration was performed by sequential addition of carboxyatractyloside (cATR, ranging from 0.01 to 0.2  $\mu\text{M}$ ). The amount of cATR corresponding to the complete inhibition of state 3 respiration was used to estimate ANT content assuming a 1:1 binding stoichiometry; the results were expressed in terms of functional ANT (nanomoles cATR per milligram of mitochondrial protein) as described elsewhere [15].

Cell suspensions were collected from the oxygraphic chamber for total protein determination using the bicinchoninic acid procedure, with bovine serum albumin as standard (BC assay kit<sup>®</sup>, Montluçon, France).

### Enzymatic activity

Mitochondrial Krebs cycle enzymes and complex II activity were measured as described in [Electronic supplementary material](#).

### Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from frozen pellets of fibroblasts using the RNeasy kit (Qiagen, Maryland, USA). Reverse

transcription of 1  $\mu\text{g}$  total RNA was performed using the reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) kit (Clontech, CA, USA). The transcript levels for *ANT2*, *ANT3*, and the uncoupling protein 2 (*UCP2*) were evaluated by quantitative real-time PCR using a Chromo 4 real-time PCR detector and the iQ Sybr green Supermix (BioRad, CA, USA) as described elsewhere [16]. Acidic ribosomal phosphoprotein (ARP) mRNA was amplified as an internal control. The specificity of PCR products (*ANT2*, *ANT3*, and *UCP2*) was controlled by sequencing.

#### Western blotting

Isolated mitochondria were extracted from fibroblasts according to the protocol indicated by Mitosciences (<http://www.mitosciences.com/protocols.html>). Mitochondrial proteins (20  $\mu\text{g}$ ) were boiled in a Laemmli buffer and analyzed by Western blotting as described elsewhere [17] using mouse monoclonal anti-ANT (Calbiochem, CA, USA), anti-voltage-dependent anion channel (VDAC), anti-total OXPHOS complex cocktail (Mitosciences, Eugene, Oregon), anti-MFN2 (Abnova, Taipei City, Taiwan), and anti-Hsp60 (Stressgene, Victoria, Canada).

#### Statistical analysis

Statistical comparisons were made using the Mann–Whitney *U* test, differences being considered significant at  $p < 0.05$ .

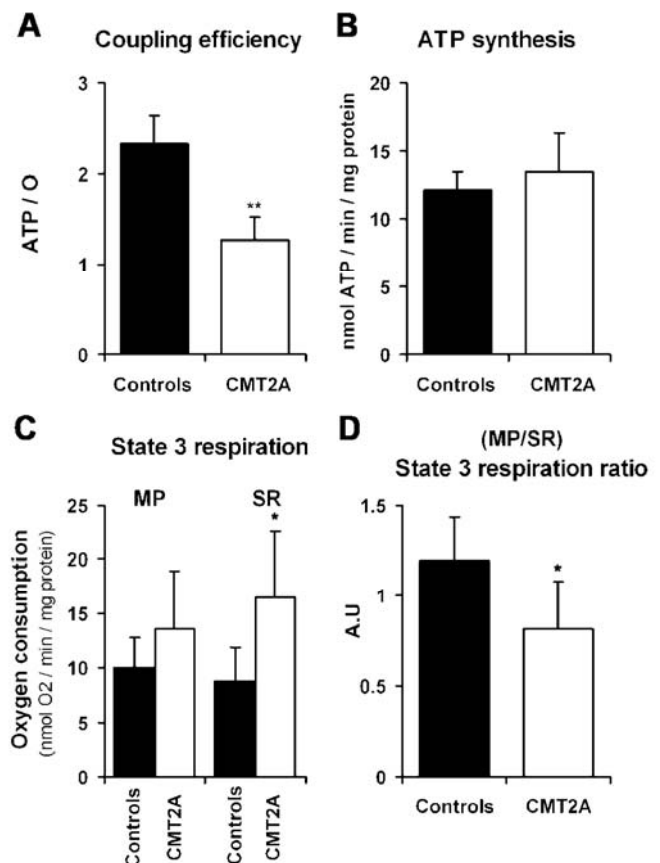
## Results

### Mitochondrial ATP synthesis is maintained despite OXPHOS uncoupling

The ATP/O ratio in fibroblasts from the eight CMT2A patients with *MFN2* mutations was 50% lower than in controls ( $1.31 \pm 0.25$  vs.  $2.58 \pm 0.17$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 1a). However, despite the reduced efficiency of the OXPHOS coupling, mitochondrial ATP production remained unaffected (Fig. 1b), being maintained by a higher respiration rate (Fig. 1c).

### Complex II plays a major role in the increase of oxygen consumption

The maximal mitochondrial coupled respiratory rate and ATP synthesis were determined using a combination of malate (M), pyruvate (P), and succinate (S). This convergent electron transport through complex I and complex II corresponds to the mitochondrial substrate supply in vivo. However, it is well known that the nature of the respiratory substrate can affect the efficiency of oxidative phosphoryla-



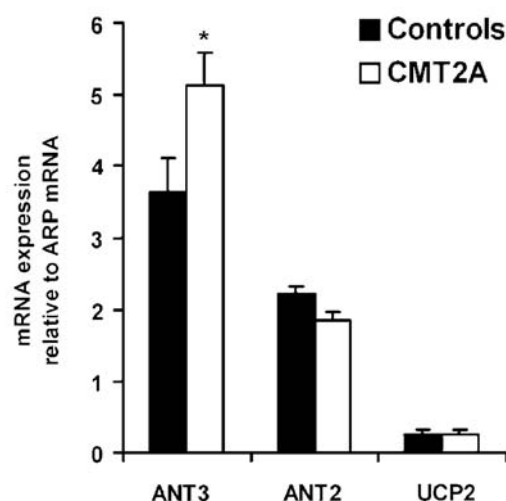
**Fig. 1** Determination of respiratory parameters in permeabilized fibroblasts from controls and CMT2A patients. **a** Coupling efficiency (ATP/O): rate of nanomoles of ATP produced per nanomole of oxygen consumed with malate, pyruvate, and succinate as substrates. **b** Rates of mitochondrial ATP synthesis measured by luminescence. **c** State 3 oxygen consumption induced by ADP with complex I-dependent substrates, i.e., 5 mM malate/5 mM pyruvate, or complex II-dependent substrates, i.e., 10 mM succinate and 10  $\mu\text{M}$  rotenone. **d** MP/SR ratio (ratio of the malate/pyruvate-dependent respiration rate to the succinate/rotenone-dependent respiration rate). Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations of the mean obtained in three independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$

tion, as complex II-linked substrates lead to a lower  $\text{H}^+/\text{O}_2$  stoichiometry than NADH-related respiration since two instead of three coupling sites are involved. To take into account the effect of these respiratory substrates on the efficiency of oxidative phosphorylation, we analyzed the balance between the substrates during maximal state 3 respiration and its relationship with ATP/O. Figure 1c shows that state 3 respiration rates were 90% higher with SR in CMT2A fibroblasts compared to controls. The ratio of malate/pyruvate-driven respiration to succinate/rotenone-driven respiration, i.e., the MP/SR ratio, was significantly lower than in controls (Fig. 1d), highlighting the increased consumption of complex II substrates and possibly explaining the reduced ATP/O ratio. However, no correlation was found between the ATP/O and MP/SR ratios ( $r^2 = 0.0009$ ). Thus, the modification of substrate consumption cannot on

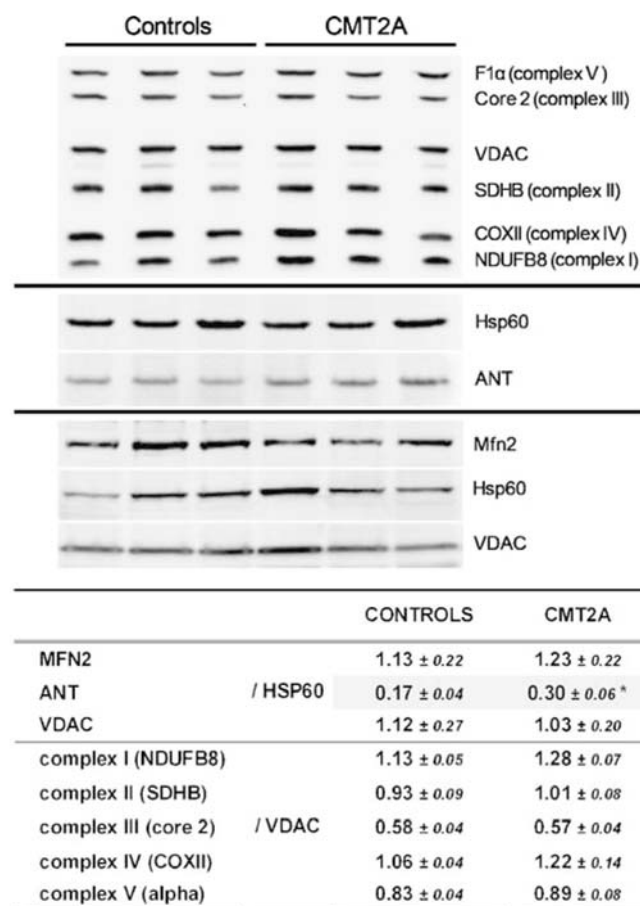
its own explain the lower coupling efficiency. There was no difference between CMT2A fibroblasts and controls in terms of the succinate ubiquinone reductase and succinate dehydrogenase activities, the two complex II activities (Electronic supplementary material, Table 1S).

The adenine nucleotide translocase oxidative isoform is overexpressed in CMT2A fibroblasts

The levels of expression of the mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and ANT were measured. Two ANT isoforms (ANT2 and ANT3) and one UCP isoform (UCP2) were expressed in cultured fibroblasts with ANT3 levels proportional to the level of oxidative metabolism in tissues or cells. In CMT2A fibroblasts, *ANT3* mRNA was significantly overexpressed compared to controls (Fig. 2), whereas *ANT2* and *UCP2* gene expressions were unchanged. Using Western blotting, a significant twofold increase in ANT protein content ( $0.30 \pm 0.06$  vs.  $0.17 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ) was found in mitochondria isolated from CMT2A fibroblasts, showing that ANT overexpression was also present at the protein level (Fig. 3). The quantification of the expression of several OXPHOS complex subunits and the VDAC, the outer membrane porin, did not indicate any increase in mitochondrial mass (Electronic supplementary material, Fig. 1S; Fig. 3S). Furthermore, no difference was detected in the citrate synthase activity, a widely accepted biochemical indicator for mitochondrial mass (Electronic supplementary material, Table 1S), nor in mitochondrial DNA content (Electronic supplementary material, Fig. 2S).



**Fig. 2** Quantification of ANT2, ANT3, and UCP2 transcript levels in fibroblasts from controls and CMT2A patients. Levels of ANT2, ANT3, and UCP2 gene transcripts standardized with mRNA level of the ARP gene. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean obtained in two independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$

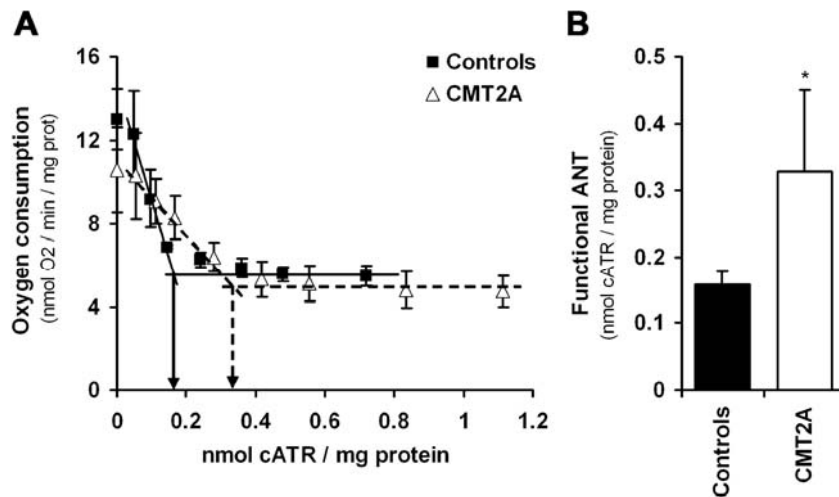


**Fig. 3** Expression of MFN2, ANT, VDAC, and OXPHOS proteins in fibroblasts from controls and CMT2A patients. Fibroblast mitochondrial fractions from eight controls and eight patients were analyzed by Western blotting using antibodies against MFN2, ANT, VDAC, OXPHOS subunits, and HSP60. HSP60 and VDAC were used as mitochondrial markers and as controls for protein loading. Representative blots for three controls and three patients are shown. Results are expressed as mean values obtained for eight controls and eight patients  $\pm$  standard deviations of the mean obtained in two independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$

MFN1 and MFN2 expression levels were similar in CMT2A fibroblasts and controls, indicating that *MFN2* mutations did not affect the quantity of protein (Fig. 3; Electronic supplementary material, Fig. 3S).

ANT activity is twice as great in CMT2A cells than in controls

The functional ANT content in mitochondria was further estimated by titrating state 3 respiration with cATR, an inhibitor of adenine nucleotide translocase [15]. cATR reacts with functional ANT in a 1:1 stoichiometry. Respiratory rates using malate, pyruvate, and succinate as substrates were plotted against cATR concentrations (Fig. 4a). Figure 4b shows that higher concentrations of cATR were required to inhibit respiration in CMT2A fibroblasts,



**Fig. 4** Determination of the amount of functional ANT in permeabilized fibroblasts from controls and CMT2A patients by performing titrations of state 3 respiration with carboxyatractyloside. Representative plots of state 3 mitochondrial respiration with 5 mM malate, 5 mM pyruvate, and 5 mM succinate vs. various concentrations of

carboxyatractyloside (a). Amount of functional ANT in permeabilized cells expressed as nanomoles carboxyatractyloside per milligram mitochondrial protein (b). Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations of the mean obtained in three independent experiments for each patient. Statistical significance: \* $p < 0.05$

confirming the twofold increase of ANT activity in these cells compared to controls.

## Discussion

This study on fibroblasts from eight CMT2A patients with six different *MFN2* mutations confirms our earlier work on four CMT2A patients [13] revealing a significant mitochondrial coupling defect that leads to reduced OXPHOS efficiency, i.e., a reduction of the ATP/O ratio. However, this uncoupling does not lead to a deficiency in ATP production since mitochondria compensate for the lower OXPHOS efficiency by increased oxygen consumption. In other words, CMT2A fibroblasts maintain normal levels of ATP synthesis, albeit at a higher energetic cost. No correlation was found between biochemical values, mutation types, and clinical features.

The analysis of the mechanisms involved in the compensation of the coupling anomaly showed that the increased respiratory rate in CMT2A fibroblasts was essentially supported by succinate-driven respiration. This indicates that complex II plays a major role in the maximal coupled respiration. In addition, it appeared that the increased consumption of succinate was not due to a greater amount of complex II in the mitochondria but was more probably related to a metabolic adaptation.

There are many reasons why complex II may provide a more suitable response than complex I to an increased energetic demand in CMT2A cells. Firstly, the mitochondrial malate/aspartate shuttle activity, the major carrier of NADH (the complex I electron donor) from cytosol to the

mitochondrial matrix, depends on proton-motive force [18]. The mitochondrial uncoupling, resulting in a decrease in membrane potential [13], could therefore limit mitochondrial NADH content and prevent an increase in complex I activity. In contrast, complex II substrates, which are less dependent on the mitochondrial membrane potential, will continue to be available [19]. Secondly, the metabolic consequences of uncoupling depend on the substrate provided to the cells, and it has been shown that in a state of chemically induced uncoupling, substrates supplying FADH<sub>2</sub> (the complex II electron donor) are more likely than substrates providing NADH to maintain ATP synthesis [20]. Moreover, H<sup>+</sup>/O stoichiometry, and thus the OXPHOS yield, depends on the number of sites of electron delivery to the respiratory chain. In fact, there are three coupling sites when NADH is the electron donor but only two in the case of FADH<sub>2</sub>. This difference in the balance of substrates used could contribute to reduced OXPHOS efficiency [19]. However, in CMT2A fibroblasts, the preferential oxidation of succinate, represented by the lower MP/SR ratio, was not correlated with lower ATP/O values. Indeed, the increased respiration rate, which ensures the maintenance of ATP synthesis, is achieved via a sustained oxidation of complex II-related substrates, but has no specific role in the uncoupling. It is likely that the imbalance between the use of complex I and complex II substrates in neuronal cells could be more deleterious than in fibroblasts since ATP synthesis is known to be essentially driven by complex I [21].

In investigating the mechanism involved in the mitochondrial coupling defect in CMT2A cells, we first looked for a change in the expression of the uncoupling protein 2



(UCP2), which usually mediates inducible proton leak [22], but found no modification in the expression of this protein. In addition, the activity of the reactive oxygen species (ROS)-sensitive mitochondrial enzyme aconitase [23] was unchanged in CMT2A fibroblasts compared to controls (Electronic supplementary material, Table 1S), suggesting that there was no increase in ROS, the main UCP2 activators [22]. These results are consistent with the findings of our earlier study on CMT2A fibroblasts harboring different *MFN2* mutations [13] in which we similarly observed no differences in ROS quantities.

Interestingly, we found that ANT activity and adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) expression were greater in CMT2A fibroblasts than in controls. ANT has been implicated in basal [24] and inducible [25] proton leaks. ANT3 is the predominantly expressed isoform in primary skin fibroblasts as well as in neuronal cells, while ANT2 is more specifically expressed in proliferative cells [26]. Nevertheless, in our experiments, the increase in ANT was not related to an increase in OXPHOS complexes and mitochondrial mass. Mitochondrial perturbations are known to amplify signaling to the nucleus [27]; this signaling may be mediated by changes in the flow of metabolites and ions (e.g.,  $\text{Ca}^{2+}$ ) or by structural changes to the organelle itself. Thus, in CMT2A, complex II metabolites or discrete changes in fission–fusion homeostasis may induce specific ANT3 overexpression. Increased ANT content and activity are probably involved in the decreased OXPHOS efficiency observed in CMT2A fibroblasts. In contrast, the increased ATP/ADP exchanges following greater ANT activity are known to stimulate oxygen consumption. This mechanism could explain the increased respiration and the maintenance of ATP synthesis in CMT2A cells. *MFN2* mutations could thus alter the mitochondrial ATP/ADP equilibrium, leading to greater mitochondrial energy expenditure. To our knowledge, this is the first time that *MFN2* has been found to be involved in the regulation of mitochondrial nucleotide exchanges.

Moreover, ANT3 overexpression has been shown to reduce calcium signal transmission between the endoplasmic reticulum and mitochondria in HeLa cells by modification of the mitochondrial structure [28]. A recent study revealed that *MFN2* mutations associated with CMT2A disease selectively affect endoplasmic reticulum tethering to mitochondria, a necessary juxtaposition for efficient mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake [29]. *MFN1* and *MFN2* are highly homologous, yet they are not functionally redundant [29, 30]. In CMT2A, it has been shown that wild-type *MFN2* cannot complement the disease alleles; however, *MFN1*–*MFN2* hetero-oligomeric complexes will be functional [5]. Peripheral nerves may be specifically affected in CMT2A patients because they express low levels of *MFN1* (or absence of *MFN1*). In fibroblasts from CMT2A, mitochondrial fusion occurs efficiently [13] and *MFN2*

and *MFN1* are co-expressed without any modification of the expression rate as compared to controls (Electronic supplementary material, Fig. 3S) [31]. Finally, the pathophysiology of CMT2A disease due to *MFN2* mutations involves both an energetic defect and impaired interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum in the affected cells.

**Acknowledgments** This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University Hospital of Angers (PHRC 04-12), and the University of Angers, France. We are grateful to J. Hodbert, C. Wetterwald, and J. Alban for technical assistance and to K. Malkani for critical reading and comments on the manuscript.

## References

1. Skre H (1974) Genetical and clinical aspects of Charcot–Marie–Tooth’s disease. *Clin Genet* 6:98–118
2. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449–451
3. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116:2763–2774
4. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305:858–862
5. Detmer SA, Chan DC (2007) Complementation between mouse *Mfn1* and *Mfn2* protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176:405–414
6. Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, Grew S, Ryan MM, Sturtz F, Vallat JM, Ouvrier RA (2008) Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous *MFN2* mutations. *Neurology* 70:1678–1681
7. Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870–880
8. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins *Mfn1* and *Mfn2* coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160:189–200
9. Deletere C, Lenaers G, Griffioen JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguier P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26:207–210
10. Chen H, Chan DC (2006) Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 18:453–459
11. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278:17190–17197

12. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot–Marie–Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14:1405–1415
13. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferré M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthièry Y, Bonneau D, Reynier P (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot–Marie–Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61:315–323
14. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Verny C, Ferre M, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P (2008) Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63:794–798
15. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB (2001) Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res* 61:771–777
16. Chevrollier A, Loiseau D, Chabi B, Renier G, Douay O, Malthièry Y, Stepien G (2005) ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 37:307–316
17. Desquiret V, Loiseau D, Jacques C, Douay O, Malthièry Y, Ritz P, Roussel D (2006) Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1757:21–30
18. LaNoue KF, Schoolwerth AC (1979) Metabolite transport in mitochondria. *Annu Rev Biochem* 48:871–922
19. Leverve XM (2007) Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* 35:S454–460
20. Sibille B, Filippi C, Piquet MA, Leclercq P, Fontaine E, Ronot X, Rigoulet M, Leverve X (2001) The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate. *Biochem J* 355:231–235
21. Greene DA, Winegrad AI (1979) In vitro studies of the substrates for energy production and the effects of insulin on glucose utilization in the neural components of peripheral nerve. *Diabetes* 28:878–887
22. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37:755–767
23. Li QY, Pedersen C, Day BJ, Patel M (2001) Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation. *J Neurochem* 78:746–755
24. Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 392:353–362
25. Samartsev VN, Mokhova EN, Skulachev VP (1997) The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. *FEBS Lett* 412:179–182
26. Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 267:14592–14597
27. Ryan MT, Hoogenraad NJ (2007) Mitochondrial–nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76:701–722
28. Wieckowski MR, Szabadkai G, Wasilewski M, Pinton P, Duszyński J, Rizzuto R (2006) Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca<sup>2+</sup> signal transmission between the ER and mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 348:393–399
29. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605–610
30. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927–15932
31. Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Shaw JM (2008) Mitochondrial fusion and function in Charcot–Marie–Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol* 211:115–127

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

### Enzymatic activity

The activities of the mitochondrial citric acid cycle enzymes: aconitase, fumarase, citrate synthase and succinate dehydrogenase (SDH), and of the mitochondrial complex II succinate ubiquinone reductase (SUR) were measured on cell homogenates at 37°C in a cell buffer (250 mM saccharose, 20 mM tris[hydroxymethyl]aminomethane, 2 mM EGTA, 1 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.2) using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA).

*Aconitase activity* was measured by following the formation of cis-aconitate from isocitrate at 240 nm as described elsewhere [1].

*Fumarase activity* was determined by following the conversion of L-malate to fumarate at 250 nm [2].

*Citrate synthase activity* was recorded following the change in optical density of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm [3].

*Succinate dehydrogenase and succinate ubiquinone reductase activities* were measured by following the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), at 600 nm [4,5].

Specific enzymatic activities were expressed in mIU (i.e. nanomoles of cis-aconitate, fumarate, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) or 2,6-dichloroindophenol (DCPIP) /min/mg protein, respectively). The cellular protein content was determined by using the bicinchoninic acid procedure (BC Assay kit®, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard.

### Mitochondrial DNA quantification :

Fibroblast genomic DNA was extracted using a BioRobot EZ1 workstation and the EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) with a 100µl elution volume. DNA quality and concentration were evaluated using NanoDrop technology (Wilmington, DE, USA). Mitochondrial DNA copy numbers were calculated by real time PCR quantification, Chromo 4 (Biorad, Hercules, CA, USA). MtDNA quantification by PCR analysis was run using two primer couples localised in tRNA Leu1 (5'-CGCATAAACTTAAACTTTACAG-3'; 5'-CTTTGCGTAGTTGTATATAGC-3') and in ND4 (5'-CAGCCACATGCCCTCGTAG-3'; 5'-GCGAGGTTAGCGAGGCTTGC-3') of the mitochondrial genome. For controls, two nuclear

sequences were amplified:  $\beta$ -globin gene (5'-TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3' ; 5'-ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3') and AIBI (5'-GGAGTTTCCTGGA C A A A T G A-3'), and Rev (5'-A G G A C T G G C G T T T A T G T C T T-3'). Mitochondrial DNA copy numbers per cell were calculated as the ratio of mtDNA/nuclear gene copy numbers.

## REFERENCES TO SUPPLEMENTARY MATERIALS

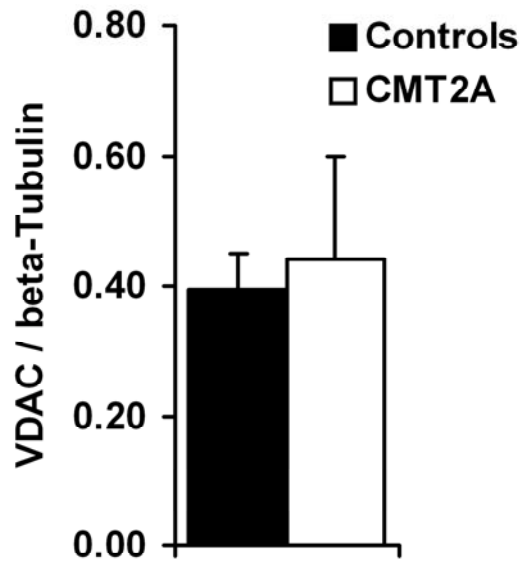
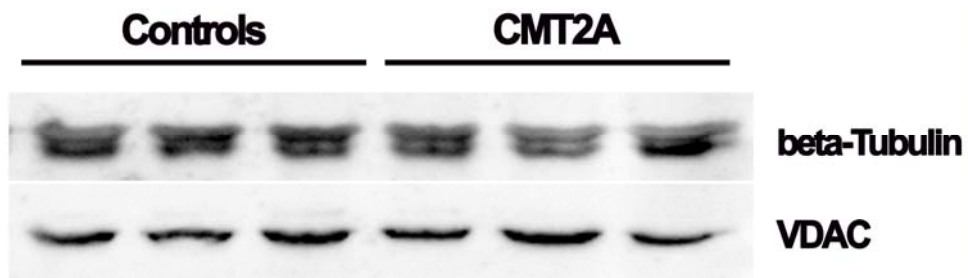
1. Fansler B, Lowenstein JM (1969) Aconitase from pig heart: [EC 4.2.13 Citrate (isocitrate) hydro-lyase]. *Methods Enzymol* 13:26-30.
2. Hill RL, Bradshaw RA (1969) Fumarase: [EC 4.2.1.2 L-Malate hydro-lyase]. *Methods Enzymol* 13:91-99.
3. Srere PA, Brazil H, Gonen L (1963) Citrate synthase assay in tissue homogenates. *Acta Chem Scand* 175:129-134.
4. Hederstedt L, Heden LO (1989) New properties of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase altered at the active site. *Biochem J* 260:491-497.
5. James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP (1996) Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 318:401-407.

## SUPPLEMENTARY DATA

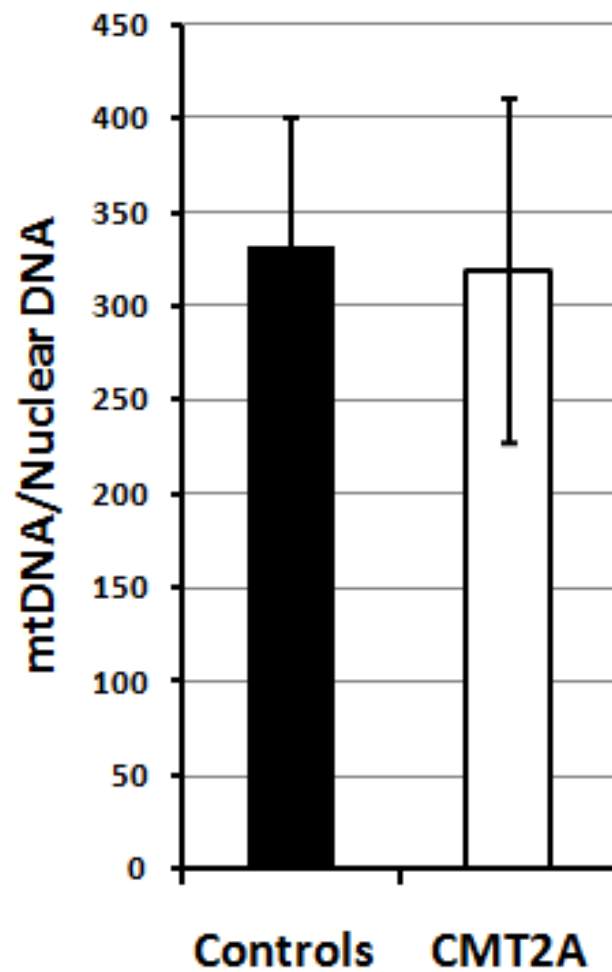
**Supplementary Table I. Mitochondrial complex II and Krebs cycle enzymatic activities (Mean  $\pm$  Standard Deviation)**

	CS	SUR/CS	SDH/CS	Aconitase / CS	Fumarase / CS	Aconitase / Fumarase
<b>Controls</b>	<b>741 <math>\pm</math> 172</b>	<b>0.09 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>0.20 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>0.48 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>0.61 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>0.79 <math>\pm</math> 0.09</b>
<b>CMT2A</b>	<b>719 <math>\pm</math> 138</b>	<b>0.08 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>0.19 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>0.48 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>0.60 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>0.81 <math>\pm</math> 0.18</b>

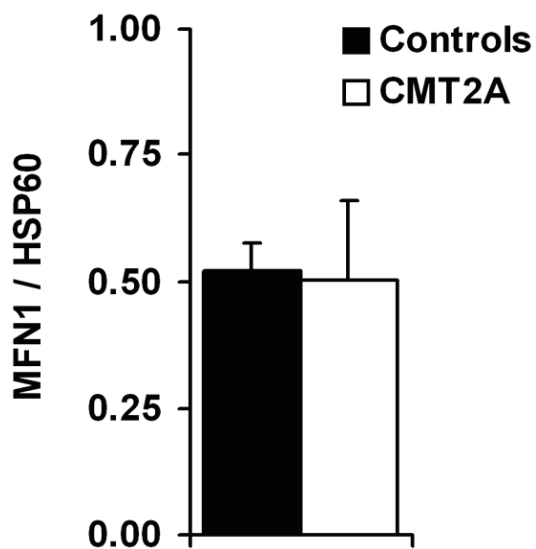
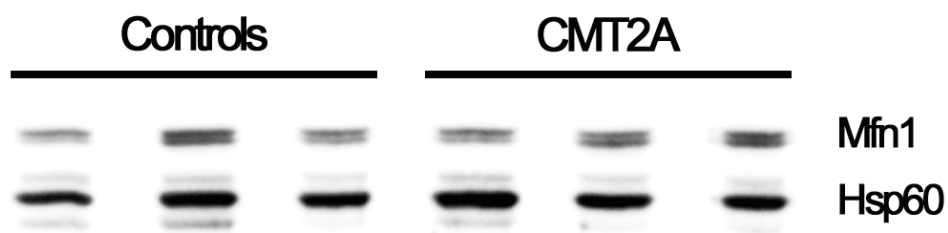
Succinate ubiquinone reductase (SUR), succinate dehydrogenase (SDH), aconitase, fumarase and citrate synthase enzymatic activities were measured in two independent experiments in fibroblasts from CMT2A patients and control subjects. Activities were expressed in terms of citrate synthase (CS). Results are expressed in nmol/min/mg of protein.



**Supplementary Figure 1. Expression of VDAC and cytosolic beta-tubulin in fibroblasts from controls and CMT2A patients show no modification of the mitochondrial mass.** Whole fibroblast lysates from six controls and six patients were analyzed by western blotting using antibodies against VDAC and beta-tubulin. VDAC were used as a mitochondrial marker, and beta-tubulin as cytoplasmic marker. Representative blots for three controls and three patients are shown. Results are expressed as mean values obtained for six controls and six patients  $\pm$  standard deviations of the mean obtained in two independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$ .



**Supplementary Figure 2. Quantification of mitochondrial DNA in fibroblasts from controls and CMT2A patients.** mtDNA quantification did not show any mtDNA copy-number modification in CMT2A. Results from eight controls and eight patients are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean obtained in two independent experiments.



**Supplementary Figure 3. MFN2 mutations did not lead to upregulation of MFN1 protein in fibroblasts from CMT2A patients.**

Fibroblast mitochondrial fractions from eight controls and eight patients were analyzed by western blotting using antibodies against MFN1 (Abnova, Taipei City, Taiwan) and HSP60 (Stressgene, Victoria, Canada). HSP60 was used as a control for protein loading. Representative blots for three controls and three patients are shown. Histograms represent mean values obtained for eight controls and eight patients  $\pm$  standard deviations of the mean obtained in two independent experiments.

C. Article n°4

***Mitochondrial complexes II and V deficiencies associated with  
mK<sub>ATP</sub> channel opening in the brain tissue of MFN2 p.R94Q mice***

*Virginie Guillet\*, Naïg Gueguen\*, Romain Cartoni, Arnaud Chevrollier, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Jean-Claude Martinou, Pascal Reynier.*

*\*Contribution égale de ces auteurs.*

*En préparation.*



**Mitochondrial complexes II and V deficiencies associated  
with mK<sub>ATP</sub> channel opening in the brain tissue  
of MFN2 p.R94Q mice**

Virginie GUILLET<sup>1,3\*</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2\*</sup>, Romain CARTONI<sup>4</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,2</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2,3</sup>, Jean-Claude MARTINOU<sup>4</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U694, Angers, F-49000 France; <sup>2</sup>CHU Angers, Department of Biochemistry and Genetics, Angers, F-49000, France; <sup>3</sup>University of Angers, Faculty of Medicine, Angers, F-49000, France; <sup>4</sup>University of Geneva, Department of Cell Biology, 1211 Geneva 4, Switzerland. \*equally contributors

Corresponding author :

Dr N. Gueguen, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49033 ANGERS Cedex, France.

Tel ++ 33 241 357 704

Fax ++ 33 241 354 017

[nagueguen@chu-angers.fr](mailto:nagueguen@chu-angers.fr)

## ABSTRACT

Mitochondria are highly dynamic organelles that undergo continuous cycles of fission and fusion. Mitofusin 2 (MFN2), a mitochondrial outer-membrane protein, is an essential component of the mitochondrial fusion machinery in mammals. Mutations of the *MFN2* gene are the primary cause of Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A) disease, a dominantly inherited sensory and motor peripheral neuropathy resulting in progressive weakness and atrophy of distal muscles. In addition to its function in mitochondrial fusion, MFN2 is involved in mitochondrial energetic metabolism. In order to investigate the impact of *MFN2* mutations on energetic metabolism in neurological tissue, we studied mitochondria isolated from the brain tissue of a recently developed MFN2 p.R94Q mouse model. We found a succinate oxidation defect and a combination of complex II and V deficiencies despite normal levels of expression of these complexes. This combined defect appears to be due to the activation of the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mK<sub>ATP</sub>) that has been associated with the formation of a complex containing complexes II and V. Indeed, complex II and V deficiencies were mimicked when mitochondria from control mice were exposed to diazoxide, a mK<sub>ATP</sub> channel activator. In contrast, 5-hydroxydecanoate, a mK<sub>ATP</sub> channel inhibitor, restored a normal phenotype in the p.R94Q mouse model. Therefore, the activation of mK<sub>ATP</sub> channels, in combination with complex II and V deficiencies, might be involved in the neurodegeneration related to *MFN2* mutations in neuronal cells and consequently in the pathogenesis of CMT2A disease. Our results also strongly support the existence of a physical link between complexes II and V, on one hand, and mK<sub>ATP</sub> channels, on the other.

**Keywords:** Charcot-Marie-Tooth ; CMT2A ; MFN2 ; mitochondria ; mK<sub>ATP</sub>

**Abbreviations:** CMT2A, Charcot-Marie-Tooth Type 2A disease; MFN2, mitofusin 2; mK<sub>ATP</sub>, mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; OPA1, optic atrophy 1.

## INTRODUCTION

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) consists of a group of inherited peripheral motor and sensory neuropathies [1], generally characterized by progressive muscular atrophy and weakness with sensory loss in the distal extremities of the limbs, as well as foot deformities. CMT has been divided into two main groups: demyelinating forms (CMT1) and axonal forms (CMT2), based on motor nerve conduction velocity. CMT2A (MIM #609260), the commonest axonal form of the disease, is mainly caused by mutations in the *MFN2* gene [2]. This gene encodes the dynamin GTPase mitofusin 2 (MFN2) located in the outer mitochondrial membrane.

MFN2 has been found to be involved in the mitochondrial fusion process in yeasts as well as in mammals [3,4]. Mitochondria are highly dynamic organelles that undergo continuous cycles of fusion and fission. The major components of the mitochondrial fusion machinery are the mitofusin proteins (MFN1 and MFN2), and the optic atrophy 1 protein (OPA1). The rate of mitochondrial fusion decreases in cells deficient in MFN1 and MFN2, leading to fragmentation of the mitochondrial network [5,6]. MFN2 is also involved in the regulation of the mitochondrial energetic metabolism since the repression of *MFN2* decreases glucose oxidation, mitochondrial membrane potential, cell respiration and proton leak [7]. Moreover, the loss of function of MFN2 in L6E9 myoblasts was shown to repress the nuclear-encoded subunits of OXPHOS complexes I, II, III and V, whereas the overexpression of *MFN2* induced the subunits of complexes I, IV and V [8].

Taking into account the various functions of MFN2, two hypotheses have been put forward to explain the physiopathology of CMT2A. According to the first hypothesis, the disease may be attributed to impaired mitochondrial structure and dynamics. The accumulation of mitochondria in distal axons has been observed in CMT2A patients [9]; in sural nerve biopsies from six patients carrying *MFN2* mutations, the axonal mitochondria were smaller than normal, round, and abnormally aggregated [10]. Mouse embryonic fibroblasts and dorsal root ganglion neurons expressing CMT2A mutations, also showed substantial mitochondrial aggregation. However, this effect was not observed with all the mutations tested and was not found in fibroblasts at physiological levels of expression [11,12]. Moreover, mitochondrial morphology was not affected by the presence of mutant *MFN2* in skin fibroblasts [13,14].

The second hypothesis suggests that a mitochondrial energetic defect may be involved in the pathogenesis of CMT2A. We found an oxidative phosphorylation (OXPHOS) coupling defect, leading to a decrease in mitochondrial membrane potential, in fibroblasts from CMT2A patients [13]. Interestingly, mitochondrial axonal transport depends on the membrane potential, and mitochondria with a relatively high potential move toward the growth cone whereas mitochondria with a lower potential move toward the cell body [15]. This axonal mitochondrial trafficking has been shown to be significantly disrupted in dorsal root ganglion neurons expressing *MFN2* mutants [12].

Considering the specificity of neuronal cell metabolism, further investigation of the role of the mitochondrial energetic function in the physiopathology of CMT2A would call for the use of neuronal models. Recently, a transgenic mouse model of CMT2A expressing the pathogenic p.R94Q mutation in neuronal cells has been developed, making Tg-R94Q mice available for experimentation [16]. This particular missense mutation, located immediately upstream of the GTPase domain of *MFN2*, has been reported in seven unrelated patients affected by CMT2A [2,9,17,18]. *MFN2*, carrying the p.R94Q mutation, has been shown to be highly functional for mitochondrial fusion in mouse embryonic fibroblasts, in which it cooperates with *MFN1* to form a complex capable of promoting fusion [11]. Tg-R94Q mice show the main clinical symptoms encountered in CMT2A patients, namely locomotor impairment and the grip-strength defect, whereas no behavioural abnormalities were observed in the *MFN2*Wt strain of mice. These mice presented an axonal atrophy in the distal sciatic nerve preferentially affecting myelinated axons larger than 3.5  $\mu\text{m}$  in diameter, thus increasing the proportion of smaller axons. Interestingly, the number of mitochondria per axon was significantly higher in the distal axons smaller than 3.5  $\mu\text{m}$  in diameter, whereas it was normal in the larger axons [16].

In this study, we have used polarography and enzymatic analysis to investigate the respiratory chain function in mitochondria isolated from the brain tissue of Tg-R94Q mice and to determine the factors involved in the mitochondrial energetic defect found in the transgenic mouse model of CMT2A.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

The human MFN2 mutation p.R94Q was expressed in the nervous tissue of mice to constitute a transgenic mouse model having the CMT2A motor defect. Human and mouse MFN2 are 95% identical, and all the residues that were found mutated in the original CMT2A study, including p.R94Q [2], are conserved in mouse MFN2 [11]. The R94 residue is located immediately upstream of the GTPase domain. The controls used were C57BL6 mice, with the human *MFN2* transgene (transgenic wild type mice: Tg-Wt) or with the mutated human *MFN2* p.R94Q transgene (transgenic mutated mice: Tg-R94Q); all obtained from the Department of Cell Biology, University of Geneva, Switzerland. C57BL6 and Tg-Wt mice were used as controls to specifically study the effect of the p.R94Q mutation on mitochondrial metabolism. Transgenic mice were generated by oocyte injection of human *MFN2* cDNA carrying the p.R94Q mutation. Transgene expression was targeted to differentiated neurons by the neuron-specific enolase (NSE) promoter. Transgenic animals were identified by PCR analysis, and transgene expression was confirmed by real-time quantitative RT-PCR in the principal cerebral tissues. Experiments were made on mice from 7 to 10 months old.

### **Mitochondrial isolation from mouse brain tissue**

Mice were anaesthetised with isoflurane, in accordance with European Community guidelines (directive 86/609/CEE), before decapitation and dissection of the cerebral cortex. Previous experiments made without the anaesthetic showed that isoflurane had no effect on the mitochondrial parameters investigated.

Mitochondria were isolated in a cold room (4°C) and all reagents were kept on ice. The cerebral cortex was diced in an isolation buffer: 1 ml/100 mg brain, composed of 250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, and 0.25 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin at pH 7.4 before homogenization with 11 up-and-down-strokes in a 50 ml potter and 3 up-and-down-strokes in a 10 ml tight-fit potter at 1000 rpm. The homogenate was centrifuged at 3,200 x g for 10 min. at 4°C. The supernatant was collected, filtered through a layer of gauze and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. at 4°C. The mitochondrial pellet was washed with the isolation buffer and centrifuged at 6,500 x g for 10 min. at 4°C before being placed in 0.3 ml of a resuspension buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, and 20 mM Tris-base at pH 7.4) and conserved on ice. The entire operation was completed in less than an hour.

The mitochondrial protein content was determined by the bicinchoninic acid procedure (BC Assay kit®, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard.

### **Mitochondrial respiratory rates**

Brain mitochondria were resuspended in the respiratory buffer R (225 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mg/ml fatty acid-free BSA, pH7.4) Mitochondrial respiratory rates were recorded at 37°C in 2 ml or 3 ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria).

### ***Mitochondrial ATP synthesis***

To determine the rate of mitochondrial ATP synthesis, mitochondria (0.1 mg/ml) were resuspended in the respiratory buffer R. ATP synthesis was started by adding 5 mM malate and 2.5 mM pyruvate, or 5 mM succinate and 10 μM rotenone, followed by the addition of 0.5 mM ADP. Aliquots were sampled at 30-second intervals, quenched with an equal volume of 7% perchloric acid, centrifuged 10 min. at 8,000 x g; the supernatant was removed and preserved at -80°C. The ATP synthesized *in situ* was measured from neutralized supernatants, by an assay based on a tandem enzyme reaction driven by hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), which, in the presence of ATP and glucose, converts NADP to NADPH at an equimolar ratio. The neutralized supernatant was incubated with 1 mM glucose, 0.5 mM NADP<sup>+</sup> and 0.9 U hexokinase in the respiratory buffer. The reaction was started by adding 0.1 U G6PDH. After 1 hour of incubation at 37°C, ATP production was monitored from NADPH content by spectrophotometry at 340nm using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA).

### ***FCCP and ADP titration of succinate-driven respiration***

Brain mitochondria (0.05 mg/ml) were resuspended in the respiratory buffer R. Mitochondrial respiration was started by adding 5 mM succinate and 10 μM rotenone; the respiratory activity was titrated with either FCCP (carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone), in concentrations ranging from 0.025 to 0.15 μM, or ADP, in concentrations ranging from 10 to 500 μM.

### ***Effects of diazoxide and 5HD on succinate-driven respiration***

Brain mitochondria (0.05 mg/ml) were resuspended in the respiratory buffer R. Mitochondria were incubated within the chambers of the oxygraph with 100 μM diazoxide and/or 500 μM 5HD during 10 min. Mitochondrial respiration was started by adding 5 mM succinate and 10

$\mu\text{M}$  rotenone. Then, 0.5 mM ADP was injected to obtain state 3 respiration. Finally, 2  $\mu\text{g/ml}$  oligomycin were added, followed by 1  $\mu\text{M}$  FCCP.

### **Mitochondrial membrane potential**

The relationships between oxygen consumption and membrane potential were established in the non-phosphorylating state (state 4 respiration) in the presence of oligomycin, the ATP synthase inhibitor. Oxygen consumption and membrane potential were measured simultaneously using a Clark-type oxygen electrode (Rank-Brothers, Cambridge, UK) and an electrode sensitive to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP). Mitochondria (0.75 mg protein/ml) were incubated in the respiratory buffer R as described above, supplemented with 80 ng/ml nigericin and 2  $\mu\text{g/ml}$  oligomycin. The TPMP electrode was calibrated by sequential additions of TPMP in 0.5  $\mu\text{M}$  steps up to 2  $\mu\text{M}$ .

Complex I-driven mitochondrial membrane potential measurements were started with 5 mM malate and 2.5 mM pyruvate and the respiration was progressively inhibited by sequential addition of non-saturating concentrations of rotenone (1-90 ng/ml).

Complex II-driven mitochondrial membrane potential was generated using succinate in the respiratory buffer supplemented with 10 $\mu\text{M}$  rotenone. Then, complex II-driven respiration was progressively inhibited by sequential addition of malonate (0.1-5.5 mM).

After each run, 3  $\mu\text{M}$  of FCCP was added to dissipate the membrane potential and release all the TPMP back into the medium for baseline correction.

Membrane potentials were calculated according to Brand *et al.* [19] assuming a TPMP binding correction of 0.42 ( $\mu\text{l/mg}$  of protein) [20].

### **Mitochondrial enzymatic activities**

The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes (I-V) and of the Krebs cycle enzymes in brain mitochondria were measured at 37°C on a Beckman DU-640B spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA) using an adaptation of the method described by Malgat *et al.*, [21].

**Complex I (NADH ubiquinone reductase)** activity was measured in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 3.75 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, 0.1 mM decylubiquinone and 10  $\mu\text{g}$  of mitochondrial proteins with, or without, 10  $\mu\text{M}$  rotenone. After 2 min of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.1 mM NADH. The activity was measured at 340 nm by monitoring the oxidation of NADH.

**Complex II (succinate ubiquinone reductase)** activity was measured in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 2.5 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, 1 mM KCN, 5  $\mu$ M rotenone, 5  $\mu$ g/ml antimycin, 30 mM succinate, 0.1 mM DCPIP and 5  $\mu$ g of mitochondrial proteins. After 2 min of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.05 mM decylubiquinone. The activity was measured at 600 nm by monitoring the reduction of DCPIP.

**Complex III (ubiquinone-cytochrome *c* reductase)** activity was determined by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm. 5  $\mu$ g of mitochondrial proteins were incubated for 30 s in a reaction medium consisting of 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5), 1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM KCN, 100  $\mu$ M oxidized cytochrome *c* and 50  $\mu$ M EDTA, pH 7.5. The reaction was initiated by adding 100  $\mu$ M decylubiquinol, and the optical density was measured for 1 min. The non-enzymatic reduction of cytochrome *c* was measured under the same conditions after the addition of 10  $\mu$ g/ml antimycin A. The specific activity of complex III was calculated by subtracting the activity of the nonenzymatic reaction from that of the total activity.

**Complex IV (cytochrome-*c* oxidase)** activity was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome *c* at 550 nm. An 80  $\mu$ M solution of reduced cytochrome *c* (92-97% reduced using dithionite) in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7), was pre-incubated for 2 min at 37°C. The reaction was initiated by adding isolated mitochondria (2  $\mu$ g protein) and the change in optical density at 550 nm was recorded for 1.5 min.

**Complex V (ATP synthase)** activity was measured by a coupled assay using lactate dehydrogenase and pyruvate kinase as the coupling enzymes [22]. Mitochondria were prepared by sonication (6  $\times$  5 s) with an MSE sonicator. Sonicated mitochondria (10  $\mu$ g of proteins) were incubated in a buffer containing 10 mM Tris, 1mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 0.4 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 0.1 mM ATP, 0.1  $\mu$ g/ml antimycine A, 0.6  $\mu$ M carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), 4 U lactate dehydrogenase, and 4 U pyruvate kinase, pH 8. After 3 min of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.3 mM NADH. The activity was measured at 340 nm by monitoring the reduction of NADH. The nonenzymatic reduction of NADH was measured under the same conditions after the addition of 10  $\mu$ g/ml oligomycin. The specific activity of complex V was calculated by subtracting the oligomycine-insensitive activity. For the study of mK<sub>ATP</sub> modulators, the activity was measured without FCCP to avoid IF1 binding through the loss of mitochondrial membrane potential.



**Succinate dehydrogenase** activity was measured after the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) in the presence of 1 mM phenazine methosulfate (PMS) at 600 nm [23]. Isolated mitochondria (20 µg of proteins) were incubated in a buffer containing 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 mM succinate, 1.5 mM KCN, and 0.15 mM thenoyl trifluoroacetone (TTFA), pH 7.5 for 3 min. The reaction was initiated by the addition of 100 µM DCPIP, and the optical density was recorded for 1.5 min.

**Aconitase** activity was measured by monitoring the formation of cis-aconitate from isocitrate at 240nm [24]. The reaction medium composed of 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.5 mM MnCl<sub>2</sub> and 100 mM isocitrate was incubated for 5 min at 37°C. The reaction was initiated by adding 20 µg of mitochondrial proteins and the change in optical density at 240 nm was recorded for 4 min.

**Fumarase** activity was measured by monitoring the formation of fumarate from malate at 250nm [25]. The reaction medium composed of 85 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.4), 0.1 mM EDTA and 50 mM malate was incubated for 5 min at 37°C. The reaction was initiated by adding 20 µg of mitochondrial proteins and the change in optical density at 250 nm was recorded for 4 min.

**Citrate synthase** activity was measured in a reaction medium consisting 0.15 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (regenerated with Tris buffer, 1 M, pH 8.1), 0.5 mM oxaloacetate, 0.3 mM acetyl-CoA, and 1% Triton X-100 [26]. After 3 min of incubation, the reaction was initiated by adding 10 µg of mitochondrial proteins, and the change in optical density at 412 nm was recorded for 1.5 min.

### **Western Blot**

20 µg of brain mitochondrial proteins were solubilized in a Laemmli buffer and boiled for 10 min. at 95°C. Proteins were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted to PVDF membranes (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). Membranes were saturated with 5% non-fat milk dissolved in TBS-Tween 0.1% (pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris 23 mM, Tween 20 0.1%) overnight at 4°C and incubated for 2 hours at room temperature with mouse monoclonal MFN2 antibody (Abnova, Taipei City, Taiwan), rabbit polyclonal ANT antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) mouse monoclonal VDAC, complex V subunit alpha and beta antibodies, and complex II subunit SDHA and SDHB antibodies (Mitosciences, OR, USA). Membranes were then washed three times in TBS-Tween 0.1% and incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit secondary antibodies (1:10,000) for 1 hour at room temperature. The immunoreactive proteins

were visualized with enhanced chemiluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Les Ulis, France). Band intensities were quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France).

### **mK<sub>ATP</sub> channel activity**

mK<sub>ATP</sub> channel activity was measured by the mitochondrial swelling/light-scatter assay at 520 nm and 37 °C using a Beckman DU-640B spectrophotometer [27]. The mK<sub>ATP</sub> buffer (100 mM KCl, 5 mM Hepes, 10 mM succinate, 10 μM rotenone, 2 μg/ml oligomycin, 100 μM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mg/ml BSA, pH 7.2 at 37 °C) was rapidly added to a cuvette containing 0.5 mg/ml mitochondria. The change in optical density at 520 nm was recorded for 30 s. For control experiments, KCl was replaced with NaCl in the buffer. The swelling was measured immediately after isolating the mitochondria, i.e. in less than an hour after brain dissection.

### **Statistical analysis**

Statistical comparisons between control, Tg-Wt and Tg-R94Q mice were made with the Mann–Whitney *U* test. The Wilcoxon test for paired data was used for the analysis of the effects of drugs on mitochondria. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **State 3 succinate oxidation is inhibited in the brain tissue of Tg-R94Q mice**

Our study showed that state 3 succinate-driven respiration decreased significantly in mitochondria from Tg-R94Q mice compared to Tg-Wt mice and controls (Fig. 1A). In fact, the addition of 0.5 mM ADP failed to stimulate complex II-linked respiration in mitochondria from Tg-R94Q mice as shown by the decrease of the respiratory control ratio (RCR), i.e. the ratio of oxygen consumption in the presence of ADP to that in its absence (Fig. 1B), while state 3 respiration driven by complex I substrates (malate and pyruvate) did not differ in mitochondria from Tg-R94Q mice compared to Tg-Wt mice and controls. This defect seems specific to succinate oxidation as no differences were observed in the presence of coenzyme A and palmytoyl-l-carnitine, a fatty acid oxidation substrate, or with glycerol-3-phosphate (G3P). Palmytoyl CoA supplies the electron transfer chain with FADH<sub>2</sub>, giving electrons

essentially to electron transfer flavoproteins, while G3P transfers its electrons *via* the FADH<sub>2</sub>/FADH couple directly to complex III (data not shown).

Fig. 1C shows the rates of mitochondrial ATP synthesis when linked to the oxidation of malate/pyruvate or succinate. In accordance with the respiratory measurements, the rates of succinate-driven ATP synthesis were very low in mitochondria from Tg-R94Q mice compared to Tg-Wt mice and controls, whereas no differences were found with malate and pyruvate.

Surprisingly, the addition of FCCP actually stimulated succinate-driven respiration rates over state 4 in mitochondria from Tg-R94Q mice (Fig. 2A). Thus, the uncoupling of the respiratory chain restored succinate-driven respiration, at least partially, suggesting that the succinate oxidation defect may be impaired at high membrane potential. We therefore studied the relationship between mitochondrial membrane potential in the non-phosphorylating condition (in the presence of oligomycin, a complex V inhibitor) and oxygen consumption with malate-pyruvate or succinate-rotenone as substrates. In these conditions, the mitochondrial membrane potential is consumed by the proton leak. For a given succinate respiration rate, the mitochondrial membrane potential was significantly higher in mitochondria from Tg-R94Q mice than in control mice whereas no differences were found with complex I substrates (Fig. 1D-E).

### **State 3 succinate oxidation defect is linked to complex V**

To investigate the mechanism involved in the succinate oxidation defect, succinate-driven respiration was titrated by the addition of FCCP (without adenylates) or ADP. The FCCP titration gradually lowered mitochondrial membrane potential by bypassing complex V whereas the effect of ADP titration was due to the proton gradient used by complex V. For all values of the concentration of FCCP, i.e. for all values of the mitochondrial membrane potential, succinate respiration was lower in mitochondria from Tg-R94Q mice than in controls (Fig. 2A). Thus, the blocking of succinate oxidation could not be related to the high mitochondrial membrane potential observed. In contrast, ADP titration showed that above a threshold value of ADP concentration, succinate oxidation was greatly impaired (Fig. 2B). The apparent  $K_m$  values for ADP ( $K_m^{(ADP)}$ ) were calculated from ADP-stimulated respiratory rates ( $V_{ADP} = VO_2$  for each state 3 –  $VO_2$  at state 4) with the Lineweaver-Burk linear transformation [28] (Fig 2C). Whereas the results of the Lineweaver-Burk linearization in

controls closely matched the linear regression plots ( $K_m = 32.3 \pm 8.5$ ) (Fig. 2C<sub>1</sub>), the results corresponding to Tg-R94Q mice tended to deviate from linearity (GraphPad Prism 4, GraphPad Software, CA, USA), and were better matched by non-linear regression plots (Fig. 2C<sub>2</sub>) ( $R^2 = 0.9016$  and  $0.9723$  using linear and non-linear regression plots, respectively;  $p < 0.01$ ). Thus, we obtained two values of  $K_m^{(ADP)}$  ( $K_{m1} = 21,8 \pm 15.6$ , and  $K_{m2} = 154.4 \pm 41.1$ ). Indeed, for values greater than  $0.025$  mM,  $K_m^{(ADP)}$  increased sharply, indicating decreased affinity for ADP and suggesting that the succinate oxidation defect was potentiated by the activation of complex V.

### **Combined SDH and complex V deficiencies in Tg-R94Q mice**

We further analyzed the enzymatic activities of the different complexes of the respiratory chain (Table 1). There were no differences in the activities of complexes I, III and IV. However, succinate dehydrogenase and succinate ubiquinone reductase activities carried out by complex II decreased by 40% ( $p=0.0006$ ) and 20% ( $p=0.0038$ ) respectively in mitochondria from Tg-R94Q mice compared to Tg-Wt mice and controls. Complex V activity decreased by 30% ( $p=0.0018$ ) in Tg-R94Q mice compared to controls; in contrast, complex V activity increased by 45% ( $p=0.035$ ) in Tg-Wt mice compared to controls. The corresponding protein content was investigated but no differences were found in the quantity of catalytic SDHA and SDHB subunits of complex II, or in the quantity of alpha and beta subunits of complex V (Fig. 3A). Similarly, there were no differences in the quantity of adenine nucleotide translocase (ANT), a protein involved in ADP transport into mitochondria, in controls and Tg-R94Q or Tg-WT mice (Fig. 3B).

### **Combined complex II and complex V deficiencies are linked to the opening of mK<sub>ATP</sub> channels**

The opening of mK<sub>ATP</sub> channels with chemical agents, such as the anti-diabetic agent diazoxide (DZX), is known to decrease complex V activity [29-31], complex II activity, and succinate oxidation [32-36]. We therefore tested the hypothesis of the existence of open mK<sub>ATP</sub> channels in mitochondria from Tg-R94Q mice.

First, we investigated the effect of mK<sub>ATP</sub> channel modulators on mitochondrial swelling (Fig. 4). A KCl buffer was used to induce maximal mitochondrial swelling as a control condition. Mitochondrial swelling was then inhibited by ATP, a known mK<sub>ATP</sub> channel inhibitor, in controls, Tg-Wt and Tg-R94Q mice. The swelling was re-induced by DZX, the specific

mK<sub>ATP</sub> channel opener, and by malonate, a complex II inhibitor, in controls and Tg-Wt mice, but not in Tg-R94Q mice. The mK<sub>ATP</sub> channel inhibitor, 5-hydroxydecanoate (5HD), reversed the effect of DZX in mitochondria from control and Tg-Wt mice but, as expected, had no effect in the case of Tg-R94Q mice. The stimulation of mitochondrial swelling by malonate was also reversed by 5HD in control and Tg-Wt mice. However, 5HD on its own did not inhibit mitochondrial swelling. The incubation of mitochondria in a medium in which KCl was replaced by NaCl resulted in a loss of the swelling induced by DZX and malonate.

Secondly, we studied the effect of mK<sub>ATP</sub> channel modulators on the enzymatic activities of SDH and F1-ATPase (Fig. 5A, B). It is important to note that chemicals were first added to intact mitochondria and allowed to act for 10 min before freezing the mitochondria. As described above, complex II SDH activity decreased in mitochondria from Tg-R94Q mice compared to control and Tg-Wt mice (Fig. 5A). DZX decreased SDH activity of mitochondria from control and Tg-Wt mice to the level of activity in Tg-R94Q mice, similarly to malonate, the specific SDH inhibitor. The effect of DZX on the SDH activity of control and Tg-Wt mitochondria was reversed by 5HD. Interestingly, SDH inhibition by malonate in controls was also reversed in the presence of 5HD (data not shown). In Tg-R94Q mitochondria, malonate and DZX had no effect on SDH activity, while 5HD on its own increased SDH activity in Tg-R94Q mitochondria to that of control and Tg-Wt mitochondria. DZX also decreased complex V activity in control and Tg-Wt mitochondria, leading to activity comparable to that in Tg-R94Q mitochondria (Fig. 5B). Moreover, 5HD on its own had no effect on complex V activity in control and Tg-Wt mitochondria, but restored Tg-R94Q mitochondrial activity to the levels observed in control and Tg-Wt mitochondria; in the presence of DZX, 5HD only partially increased complex V activity in control and Tg-Wt mitochondria.

In a second time, mitochondrial membranes integrity were first disturbed by freezing and thawing, and then broken mitochondria were incubated with DZX and 5HD. In these conditions, inhibition of SDH and F1-ATPase activities by DZX in control mitochondria, and stimulation of SDH and F1-ATPase activities by 5HD in Tg-R94Q mitochondria were lost (data not shown).

Finally, to investigate the possible relation between the succinate oxidation defect and mK<sub>ATP</sub> channel activity, state 3 succinate respiration was measured in the presence of DZX and/or 5HD (Fig. 5C). As reported above, state 3 succinate respiration was greatly decreased in Tg-

R94Q mitochondria compared to control and Tg-Wt mitochondria. DZX decreased state 3 succinate-related respiration in control and Tg-Wt mitochondria compared to that in Tg-R94Q mitochondria. Furthermore, 5HD acting alone on Tg-R94Q mitochondria fully restored ADP-stimulated succinate oxidation. However, as in the case of complex V activity, the decrease in succinate oxidation caused by DZX in control and Tg-Wt mitochondria was only partially restored. Respiratory rates were higher with DZX and 5HD than with DZX alone in control, and Tg-Wt mitochondria but did not attain normal respiratory values.

### **The opening of mK<sub>ATP</sub> channels is not linked to an increase in ROS production**

The opening of mK<sub>ATP</sub> channels is known to be activated by ROS-dependent signalling [37-39], and to induce ROS generation [40]. We therefore investigated the activity of the superoxide-sensitive mitochondrial enzyme aconitase [41], but found no difference between control and Tg-R94Q mitochondria (Table 2). Moreover, the expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in mitochondria, a detoxification enzyme known to be overexpressed by superoxide production [42], was not different in Tg-R94Q mitochondria compared to controls (Fig. 3C).

## **DISCUSSION**

In addition to its role in mitochondrial outer-membrane fusion, MFN2 has been shown to play a role in the regulation of mitochondrial energetic metabolism [7,8]. Our study on fibroblasts from patients affected by CMT2A, a disease related to *MFN2* mutations, revealed a mitochondrial coupling defect associated with decreased mitochondrial membrane potential whereas the rate of ATP synthesis was unaffected [13]. We therefore investigated mitochondrial energetic metabolism in a transgenic mouse model to clarify the relationship between *MFN2* mutations and mitochondrial energetic impairment in the pathogenesis of CMT2A.

### **Mitochondrial metabolism is affected in Tg-R94Q mice**

The transgenic mouse model of CMT2A expresses human *MFN2*, which means that it not only expresses a mutated *MFN2* but also overexpresses *MFN2* compared to control mice. In order to discriminate between the effects due to mutation and those due to overexpression, a similar transgenic mouse with a non-mutated human *MFN2* transgene has been developed. The respiratory and enzymatic activities of the OXPHOS complexes showed no differences

between control and Tg-Wt mitochondria, except for F1-ATPase, the activity of which was greater in Tg-Wt mice than in controls. Thus, no MFN2 load effect related to the transgene was observed, except for complex V activity. *MFN2* overexpression has been reported to induce the subunits of complexes I, IV and V [8]. The increase in complex V activity could be linked to the mild increase in *MFN2* expression in transgenic mice, considering that complex V is more sensitive to *MFN2* expression than complexes I and IV.

Our results showed that mitochondrial energetic metabolism was impaired in Tg-R94Q mice. Firstly, we found a specific succinate oxidation defect in Tg-R94Q mitochondria compared to control and Tg-Wt mitochondria, as shown by the sharply decreased state 3 succinate-driven respiration, which greatly reduced succinate-related ATP synthesis. A combined deficiency of complexes II and V was also found in mitochondria from Tg-R94Q mice. The metabolic similarity between control and Tg-Wt mitochondria, and the differences between Tg-R94Q mitochondria, on one hand, and control and Tg-Wt mitochondria, on the other, indicated that the defects observed were specific to the p.R94Q mutation.

When succinate oxidation was blocked in state 3 in Tg-R94Q mitochondria, it was possible to re-stimulate it with a single maximal dose of the uncoupler FCCP. Since FCCP depletes the mitochondrial membrane potential, we hypothesized that the succinate oxidation defect might be linked to a particularly high value of the membrane potential. We therefore investigated the relationship between the mitochondrial membrane potential in the non-phosphorylating condition and oxygen consumption. Our study showed that Tg-R94Q mitochondria had a higher membrane potential than controls, under succinate oxidation. However, the gradual depletion of membrane potential using FCCP failed to reverse the succinate oxidation defect. This suggested that high mitochondrial membrane potential due to the complex II substrate was the consequence rather than the cause of the succinate oxidation defect.

The second hypothesis suggested the involvement of complex V activity. The succinate oxidation defect was essentially observed in state 3, i.e. in the presence of a saturating ADP concentration. After inhibiting complex V activity using oligomycin, it was possible to partially reverse the defect with a single maximal dose of FCCP. Moreover, the titration performed using ADP to progressively stimulate complex V, led to a decrease in the affinity of succinate-supported respiration for ADP above a threshold concentration (0.025 mM). This showed that the decrease in succinate oxidation was potentiated by the activation of complex

V. Interestingly, two complex II activities (SDH and SUR) and complex V activity decreased by 35%, 20% and 35% respectively. The decreased activities were not correlated to the protein content, as shown by western blotting against SDHA, SDHB, V $\alpha$  and V $\beta$  catalytic subunits. These results suggest the existence of a very close functional, non-quantitative link between complexes II and V. To date, there have been very few reports in the literature concerning a possible interaction between complexes II and V. Although it has been suggested that, in humans, SDH and complex V deficiencies may be associated [43], these complexes have never been shown to interact directly to form a super-complex [44].

### **Elements supporting the hypothesis of the involvement of mK<sub>ATP</sub> channels**

The impairment of the mitochondrial metabolism described above, in particular, the succinate oxidation defect and the reduced activities of complexes II and V, has been reported in ischemic and pharmacological preconditioning conditions. The mK<sub>ATP</sub> channel has attracted attention because of its involvement in the cytoprotection of cardiac [45], brain [46] and retinal [47] tissues. It has been shown that short repetitive ischemic episodes or the administration of diazoxide, a specific mK<sub>ATP</sub> channel activator, decreased succinate oxidation without affecting NADH oxidation in C2C12 myotubes and mitochondria isolated from the heart [32-36,48]. Moreover, the inhibition of the SUR and SDH activities of complex II [36,49] has been reported in mitochondria from the heart and cultured cortical neurons of rats, following ischemic and diazoxide-induced preconditioning. On the contrary, the complex II inhibitors malonate, 3-nitropropionic acid and atpenin A5, were shown to mediate protection from ischemia by the activation of mK<sub>ATP</sub> channels [27,50-52]. Finally, complex V has also been described as a target for the mK<sub>ATP</sub> channel opener DZX, and in the ischemic preconditioning mechanism [29,30]. More precisely, DZX has been shown to bind to the  $\beta$ -subunits of complex V at the nucleotide binding domain, inducing nucleotide stabilisation and favouring the binding of the complex V inhibitor IF1 [31]. The general hypothesis emerging from these studies is that complexes II and V, on one hand, and mK<sub>ATP</sub> channels, on the other, are inversely related since the opening of mK<sub>ATP</sub> channels is associated with the inhibition of complexes II and V, whereas the activation of complex II is related to the closing of mK<sub>ATP</sub> channels. These findings suggest a functional link between mK<sub>ATP</sub> channel activity and the modulation of complexes II and V. Moreover, Ardehali *et al.*, [53] have demonstrated that SDH plays a structural and functional role in mK<sub>ATP</sub> channels, and that ATP synthase, together with other mitochondrial proteins such as adenine nucleotide translocase, phosphate



carrier and mitochondrial ATP binding cassette protein 1, associates with SDH to form a complex, displaying a  $K^+$  transport activity that is sensitive to known  $mK_{ATP}$  modulators. Considering the succinate oxidation defect and the inhibition of complexes II and V, induced by the opening of  $mK_{ATP}$  channels following ischemic or pharmacological preconditioning conditions, we tested the hypothesis of an activation of  $mK_{ATP}$  channels in Tg-R94Q mice.

### **Diazoxide mimics the impaired Tg-R94Q biochemical phenotype**

We evaluated the effects of DZX, the  $mK_{ATP}$  channel opener, on mitochondrial swelling by the light-scattering assay, the validity of which has been demonstrated [54]. After prior inhibition by ATP, DZX induced  $K^+$ -dependent mitochondrial swelling in control and Tg-Wt mitochondria but had no effect on Tg-R94Q mitochondria, suggesting that the target of DZX could not be further stimulated. The same results were obtained using malonate: the inhibition of SDH activity induced swelling in control and Tg-Wt mitochondria, but not in Tg-R94Q mitochondria, in which SDH activity was already low. Enzymatic activities and oxygen consumption measurements were therefore used to investigate the effects of DZX on complexes II and V. DZX decreased the enzymatic activities of complexes II and V in control and Tg-Wt mitochondria to the level of those in Tg-R94Q mitochondria; however, DZX did not affect these enzymatic activities in Tg-R94Q mitochondria. The state 3 succinate-driven respiration was therefore inhibited at the same level as Tg-R94Q respiration. These findings demonstrate that DZX, when added to control and Tg-Wt mitochondria, mimicked the biochemical phenotype of Tg-R94Q mitochondria, but had no effect on Tg-R94Q mitochondria.

### **5HD restores the Tg-R94Q biochemical phenotype thus producing a control phenotype**

The effects of the specific  $mK_{ATP}$  channel inhibitor 5HD were also evaluated. 5HD fully reversed the effect of DZX on complex II activities in control and Tg-Wt mitochondria, indicating that the action of DZX on SDH was linked to the opening of  $mK_{ATP}$  channels. Moreover, when mitochondrial membranes integrity were first disturbed by freezing and thawing before incubation, DZX and 5HD had no effect on SDH and complex V activities in control and Tg-R94Q mitochondria respectively. These data suggest that the effect of DZX and 5HD on SDH and complex V was not direct and may be mediated by a signalling pathway. More interestingly, 5HD fully restored succinate oxidation and the activities of complexes II and V in Tg-R94Q mitochondria. These results demonstrate that 5HD restores

the biochemical phenotype of Tg-R94Q mitochondria, leading to a normal phenotype, as observed in control and Tg-Wt mitochondria. In control and Tg-Wt mitochondria, 5HD only partially counteracted the effect of DZX on complex V activity and succinate oxidation in the presence of ADP. This suggested that a part of the effect of DZX on complex V activity is not specific to mK<sub>ATP</sub> channels.

These findings show that, in spite of the validity of our swelling experiments on control and Tg-Wt mitochondria, mK<sub>ATP</sub> channel stimulators had no effect on Tg-R94Q mitochondria. DZX, when added to control and Tg-Wt mitochondria, mimicked the impaired biochemical phenotype observed in Tg-R94Q mitochondria, and 5HD, when added to Tg-R94Q mitochondria restored the impaired biochemical phenotype, leading to a control phenotype. These results argue in favour of mK<sub>ATP</sub> channel opening in Tg-R94Q mitochondria.

The link between MFN2 and mK<sub>ATP</sub> channel opening remains to be elucidated. We have shown that it is probably not mediated by an increase in ROS production, which is known to activate mK<sub>ATP</sub> channels [55]. However, the p.R94Q mutation is located immediately upstream of the GTPase domain of the protein and the mK<sub>ATP</sub> channel is known to be activated by GTP [56,57]. Moreover, MFN2 has recently been shown to be involved in endoplasmic reticulum tethering to mitochondria, an appropriate juxtaposition for efficient mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake [58]. Interestingly, it has been suggested that the opening of mK<sub>ATP</sub> channels may offer protection against calcium overloading in mitochondria [59,60]. Since mK<sub>ATP</sub> channels are also modulated by calcium [61], inefficient Ca<sup>2+</sup> fluxes could be involved in mK<sub>ATP</sub> channel opening in Tg-R94Q mitochondria.

Our study, the first to explore energetic metabolism in a CMT2A mouse model, confirmed the impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation. Moreover, this model offered some clues to the neuronal specificity of CMT2A disease. The fact that there were six or seven times more mK<sub>ATP</sub> channels in the brain than in other tissues [62] could explain this specificity. Finally, the investigation of the CMT2A mouse model has demonstrated the close functional relationship between OXPHOS complexes II and V. The model also revealed the involvement of mK<sub>ATP</sub> channel activity in CMT2A. Since mK<sub>ATP</sub> channels are particularly abundant in the brain, mK<sub>ATP</sub> channel activity could be a major factor in the pathogenesis of CMT2A, eventually suggesting novel therapeutic or preventive strategies for the disease. How

MFN2 could impact on  $mK_{ATP}$  and oxidative phosphorylation complexes located in the inner membrane remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the University Hospital of Angers (PHRC 04-12), and the University of Angers, France. We are grateful to J. Hodbert and C. Wetterwald, to the technicians of the laboratory for technical assistance, and to K. Malkani for critical reading and comments on the manuscript.

## REFERENCES

1. Skre, H. (1974) Genetical and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet.* 6, 98-118.
2. Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schröder, J.M., Vance, J.M. (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449-451.
3. Chan, D.C. (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79-99.
4. Okamoto, K. and Shaw, J.M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 503-536.
5. Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E, Fraser, S.E., Chan, D.C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell. Biol.* 160, 189-200.
6. Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., Fuller, M.T. (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 116, 2763-2774.
7. Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dagaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., Zorzano, A. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
8. Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A. (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1405-1415.

9. Verhoeven, K., Claeys, K.G., Züchner, S., Schröder, J.M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., Seeman, P., Mazanec, R., Saifi, G.M., Szigeti, K., Mancias, P., Butler, I.J., Kochanski, A., Ryniewicz, B., De Bleecker, J., Van den Bergh, P., Verellen, C., Van Coster, R., Goemans, N., Auer-Grumbach, M., Robberecht, W., Milic Rasic, V., Nevo, Y., Tournev, I., Guergueltcheva, V., Roelens, F., Vieregge, P., Vinci, P., Moreno, M.T., Christen, H.J., Shy, M.E., Lupski, J.R., Vance, J.M., De Jonghe, P., Timmerman, V. (2006) MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*. 129, 2093-2102.
10. Vallat, J.M., Ouvrier, R.A., Pollard, J.D., Magdelaine, C., Zhu, D., Nicholson, G.A., Grew, S., Ryan, M.M., Funalot, B. (2008) Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1097-1102.
11. Detmer, S.A., Chan, D.C. (2007) Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176, 405-414.
12. Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A., Milbrandt, J. (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J. Neurosci.* 27, 422-430.
13. Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M.A., Ferré, M., Malinge, M.C., Guichet, A., Nicolas, G., Amati-Bonneau, P., Malthiery, Y., Bonneau, D., Reynier, P. (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann. Neurol.* 61, 315-323.
14. Amiott, E.A., Lott, P., Soto, J., Kang, P.B., McCaffery, J.M., DiMauro, S., Abel, E.D., Flanigan, K.M., Lawson, V.H., Shaw, J.M. (2008) Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp. Neurol.* 211, 115-127.
15. Miller, K.E., Sheetz, M.P. (2004) Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.* 117, 2791-2804.
16. Cartoni *et al.*, 2009
17. Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y., Hayasaka, K. (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum. Genet.* 116, 23-27.
18. Neusch, C., Senderek, J., Eggermann, T., Elloff, E., Bähr, M., Schneider-Gold, C. (2007) Mitofusin 2 gene mutation (R94Q) causing severe early-onset axonal polyneuropathy (CMT2A). *Eur. J Neurol.* 14, 575-577.
19. Brand, M.D. (1995) Measurement of mitochondrial protonmotive force. In: G.C. Brown and C.E. Cooper, Editors, *Bioenergetics, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, pp. 39-62.
20. Rolfe, D.F., Hulbert, A.J., Brand, M.D. (1994) Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1188, 405-416.

21. M. Malgat, G. Durrieu and J.P. Mazat, Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: P. Lestienne, Editor, *Mitochondrial Diseases*, Springer Verlag, Paris (1999), pp. 357–377.
22. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta.* 228, 35-51.
23. Hederstedt, L., Heden L.O. (1989) New properties of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase altered at the active site. *Biochem. J.* 260, 491-497.
24. Fansler, B., Lowenstein, J.M. (1969) Aconitase from pig heart: [EC 4.2.13 Citrate (isocitrate) hydro-lyase]. *Methods Enzymol.* 13, 26-30.
25. Hill, R.L., Bradshaw R.A. (1969) Fumarase: [EC 4.2.1.2 L-Malate hydro-lyase]. *Methods Enzymol.* 13, 91-99.
26. Srere, P.A., Brazil, H., Gonen, L. (1963) Citrate synthase assay in tissue homogenates. *Acta Chem. Scand.* 175, 129-134.
27. Wojtovich, A.P., Brookes, P.S. (2008) The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777, 882-889.
28. Saks, V., Belikova, Y., Vasilyeva, E., Kuznetsov, A., Fontaine, E., Keriell, C., Leverve, X. (1995) Correlation between degree of rupture of outer mitochondrial membrane and changes of kinetics of regulation of respiration by ADP in permeabilized heart and liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 919-926.
29. Ala-Rämi, A., Ylitalo, K.V., Hassinen, I.E. (2003) Ischaemic preconditioning and a mitochondrial KATP channel opener both produce cardioprotection accompanied by F1F0-ATPase inhibition in early ischaemia. *Basic Res. Cardiol.* 98, 250-258.
30. Comelli, M., Metelli, G., Mavelli, I. (2007) Downmodulation of mitochondrial F0F1 ATP synthase by diazoxide in cardiac myoblasts: a dual effect of the drug. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H820-829.
31. Contessi, S., Metelli, G., Mavelli, I., Lippe, G. (2004) Diazoxide affects the IF1 inhibitor protein binding to F1 sector of beef heart F0F1ATPsynthase. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1843-1851.
32. Hanley, P.J., Mickel, M., Löffler, M., Brandt, U., Daut, J. (2002) K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J. Physiol.* 542, 735-741.
33. Lim, K.H., Javadov, S.A., Das, M., Clarke, S.J., Suleiman, M.S., Halestrap, A.P. (2002) The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J. Physiol.* 545, 961-974.
34. Minners, J., Lacerda, L., Yellon, D.M., Opie, L.H., McLeod, C.J., Sack, M.N. Diazoxide-induced respiratory inhibition - a putative mitochondrial K(ATP) channel independent mechanism of pharmacological preconditioning. *Mol. Cell Biochem.* 294, 11-18.
35. Dröse, S., Brandt, U., Hanley, P.J. (2006) K<sup>+</sup>-independent actions of diazoxide question the role of inner membrane KATP channels in mitochondrial cytoprotective signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 23733-23739.

36. Pasdois, P., Beauvoit, B., Tariosse, L., Vinassa, B., Bonoron-Adèle, S., Santos, P.D. (2006) MitoK(ATP)-dependent changes in mitochondrial volume and in complex II activity during ischemic and pharmacological preconditioning of Langendorff-perfused rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 101-112.
37. Carroll, R., Gant, V.A., Yellon, D.M. Mitochondrial K(ATP) channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc. Res.* 51, 691-700.
38. Samavati, L., Monick, M.M., Sanlioglu, S., Buettner, G.R., Oberley, L.W., Hunninghake, G.W. (2002) Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C273-281.
39. Liang, H.W., Xia, Q., Bruce, I.C. (2005) Reactive oxygen species mediate the neuroprotection conferred by a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener during ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 1042, 169-175.
40. Andrukhiv, A., Costa, A.D., West, I.C., Garlid, K.D. (2006) Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H2067-2074
41. Li, Q.Y., Pedersen, C., Day, B.J., Patel, M. (2001) Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation. *J. Neurochem.* 78, 746-755.
42. Hu, Y., Rosen, D.G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., Huang, P. (2005) Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280, 39485-39492.
43. Brière, J.J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Bénit, P., Gimenez, A.P., Rustin, P. (2005) Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2317-2324.
44. Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349-36353.
45. Garlid, K.D., Dos Santos, P., Xie, Z.J., Costa, A.D., Paucek, P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1606, 1-21.
46. Liu, D., Slevin, J.R., Lu, C., Chan, S.L., Hansson, M., Elmer, E., Mattson, M.P. (2003) Involvement of mitochondrial K<sup>+</sup> release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death. *J. Neurochem.* 86, 966-979.
47. Roth, S., Dreixler, J.C., Shaikh, A.R., Lee, K.H., Bindokas, V. (2006) Mitochondrial potassium ATP channels and retinal ischemic preconditioning. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2114-2124.
48. Schäfer, G., Wegener, C., Portenhauser, R., Bojanovski, D. (1969) Diazoxide, an inhibitor of succinate oxidation. *Biochem. Pharmacol.* 18, 2678-2681.
49. Kis, B., Rajapakse, N.C., Snipes, J.A., Nagy, K., Horiguchi, T., Busija, D.W. (2003) Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 87, 969-980.

50. Ockaili, R.A., Bhargava, P., Kukreja, R.C. (2001) Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in hearts: role of mitochondrial K(ATP) channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2406-411.
51. Horiguchi, T., Kis, B., Rajapakse, N., Shimizu, K., Busija, D.W. (2003) Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 34, 1015-1020.
52. Wojtovich, A.P., Brookes, P.S. (2009) The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels. *Basic Res. Cardiol.* 104, 121-129.
53. Ardehali, H., Chen, Z., Ko, Y., Mejía-Alvarez, R., Marbán, E. (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 11880-11885.
54. Costa, A.D., Quinlan, C.L., Andrukhiv, A., West, I.C., Jaburek, M., Garlid, K.D. (2006) The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H406-415.
55. Fornazari, M., de Paula, J.G., Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J. (2008) Redox properties of the adenoside triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel in brain mitochondria. *J. Neurosci. Res.* 86, 1548-1556.
56. Yarov-Yarovoy, V., Paucek, P., Jaburek, M., Garlid, K.D. (1997) The nucleotide regulatory sites on the mitochondrial KATP channel face the cytosol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1321, 128-136.
57. Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., Garlid, K.D. (1996) Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 271, 32084-32088.
58. De Brito, O.M., Scorrano, L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456, 605-610.
59. Wang, Y., Hirai, K., Ashraf, M. (1999) Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ. Res.* 15, 731-741.
60. Ishida, H., Hirota, Y., Genka, C., Nakazawa, H., Nakaya, H., Sato, T. (2001) Opening of mitochondrial K(ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ. Res.* 89, 856-858.
61. Dahlem, Y.A., Horn, T.F., Buntinas, L., Gono, T., Wolf, G., Siemen, D. (2004) The human mitochondrial KATP channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. *Biochim. Biophys. Acta.* 1656, 46-56.
62. Bajgar, R., Seetharaman, S., Kowaltowski, A.J., Garlid, K.D., Paucek, P. (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J. Biol. Chem.* 276, 33369-33374.

## TABLES

**Table I. Mitochondrial OXPHOS complexes enzymatic activities (Mean  $\pm$  Standard Deviation)**

	Controls	Tg-Wt	Tg-R94Q
<b>I / CS</b>	<b>0.15 <math>\pm</math> 0.023</b>	<b>0.18 <math>\pm</math> 0.010</b>	<b>0.13 <math>\pm</math> 0.08</b>
<b>II (SDH) / CS</b>	<b>0.06 <math>\pm</math> 0.004</b>	<b>0.06 <math>\pm</math> 0.006</b>	<b>0.04 <math>\pm</math> 0.003 ***<sup>□□</sup></b>
<b>II (SUR) /CS</b>	<b>0.19 <math>\pm</math> 0.003</b>	<b>0.17 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>0.15 <math>\pm</math> 0.008 **<sup>□</sup></b>
<b>III / CS</b>	<b>0.65 <math>\pm</math> 0.073</b>	<b>0.68 <math>\pm</math> 0.012</b>	<b>0.62 <math>\pm</math> 0.032</b>
<b>IV / CS</b>	<b>2.56 <math>\pm</math> 0.073</b>	<b>2.50 <math>\pm</math> 0.0045</b>	<b>2.31 <math>\pm</math> 0.090</b>
<b>V / CS</b>	<b>0.09 <math>\pm</math> 0.005</b>	<b>0.14 <math>\pm</math> 0.016*</b>	<b>0.06 <math>\pm</math> 0.004 **<sup>□□</sup></b>

Enzymatic activities of OXPHOS complexes measured on mitochondria isolated from the brain tissue of controls, Tg-Wt and Tg-R94Q mice. Activities were normalized to citrate synthase (CS) one. Results are expressed in nmol/min/mg of protein as mean values  $\pm$  SEM. Compared with controls (\*) or Tg-Wt (<sup>□</sup>).  $p < 0.05$  (\*, <sup>□</sup>);  $p < 0.01$  (\*\*, <sup>□□</sup>);  $p < 0.001$  (\*\*\*).

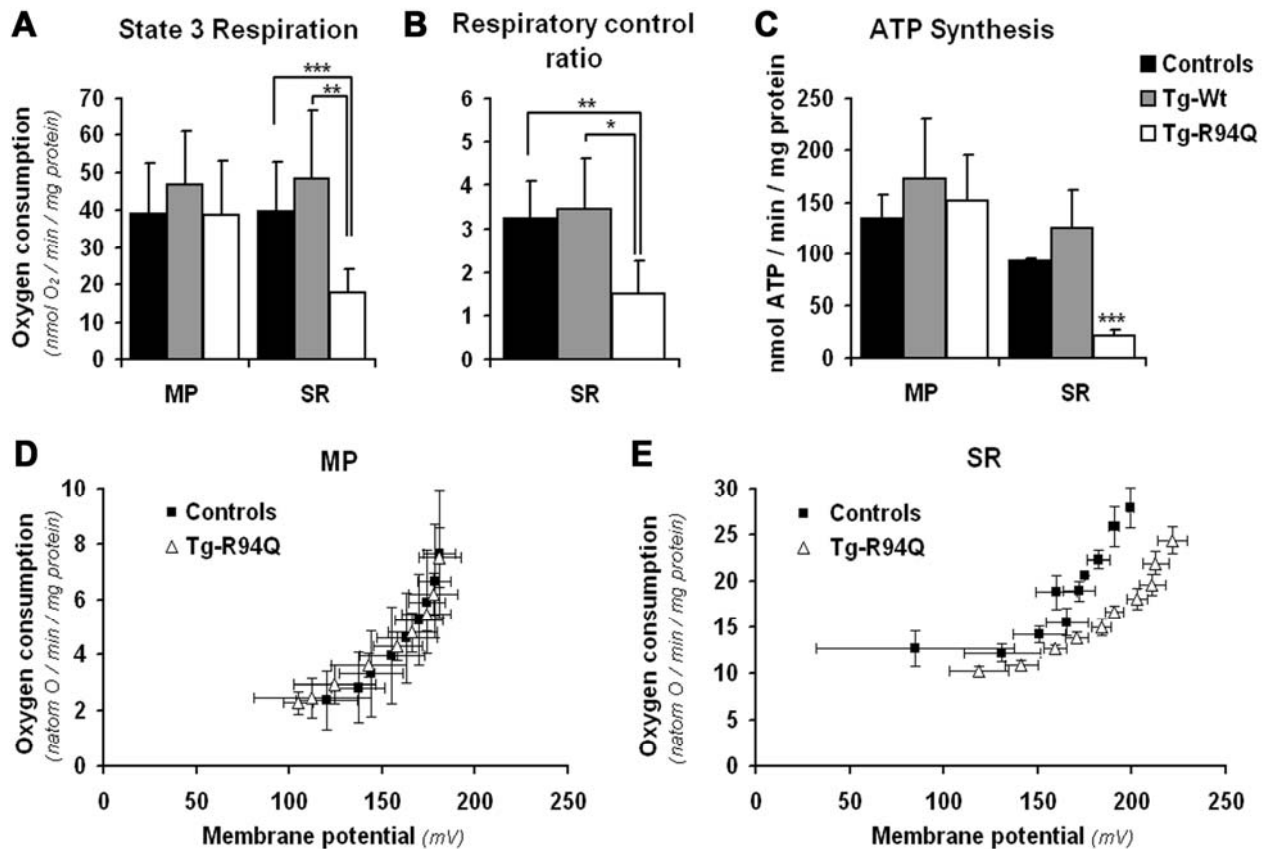
**Table II. Mitochondrial Krebs cycle enzymatic activities (Mean  $\pm$  Standard Deviation)**

	Controls	Tg-R94Q
<b>Aconitase / CS</b>	<b>0.27 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>0.32 <math>\pm</math> 0.02</b>
<b>Fumarase / CS</b>	<b>0.25 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>0.23 <math>\pm</math> 0.01</b>
<b>Aconitase / Fumarase</b>	<b>1.12 <math>\pm</math> 0.14</b>	<b>1.40 <math>\pm</math> 0.06</b>

Krebs cycle enzymatic activities measured on mitochondria isolated from brain of controls and Tg-R94Q mice. Activities were normalized to citrate synthase (CS) one. Results are expressed in nmol/min/mg of protein as mean values  $\pm$  SEM.

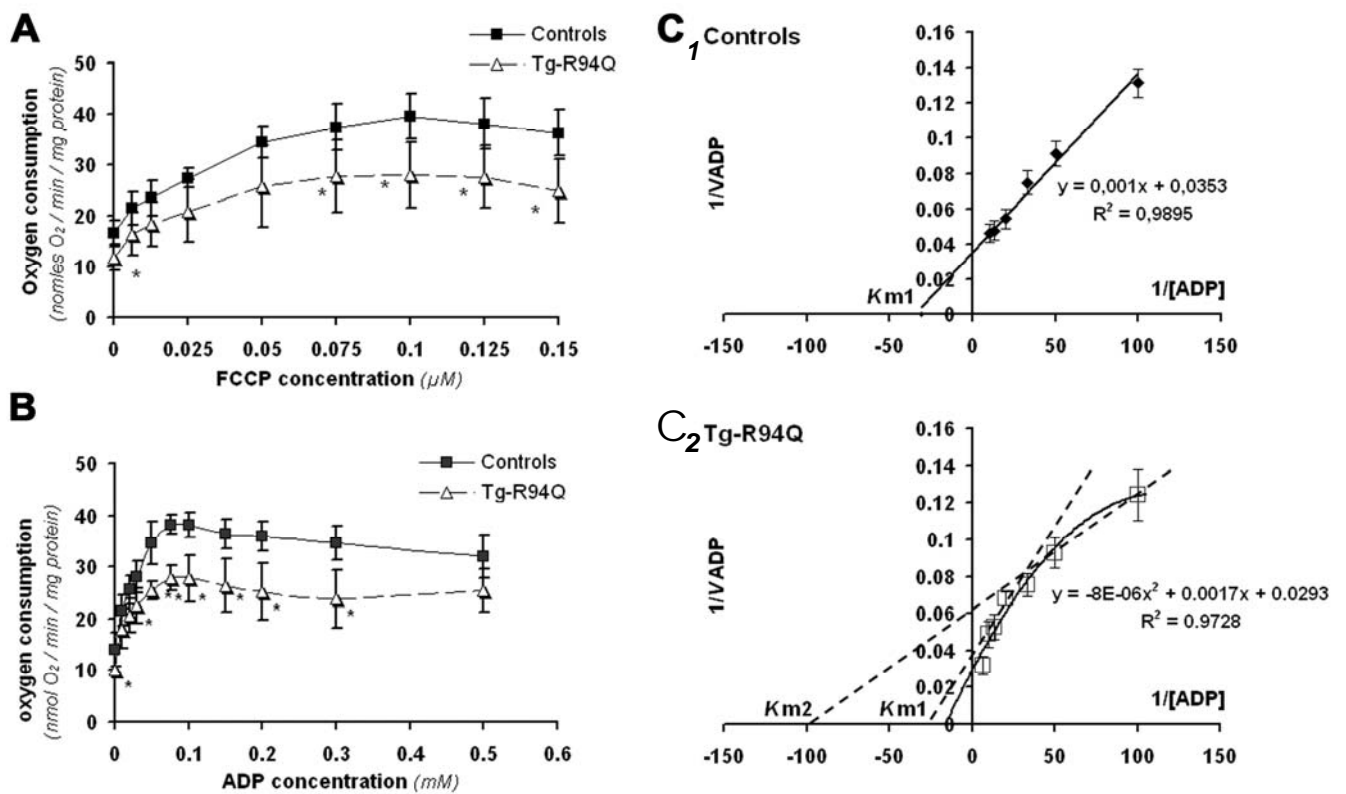


## FIGURES



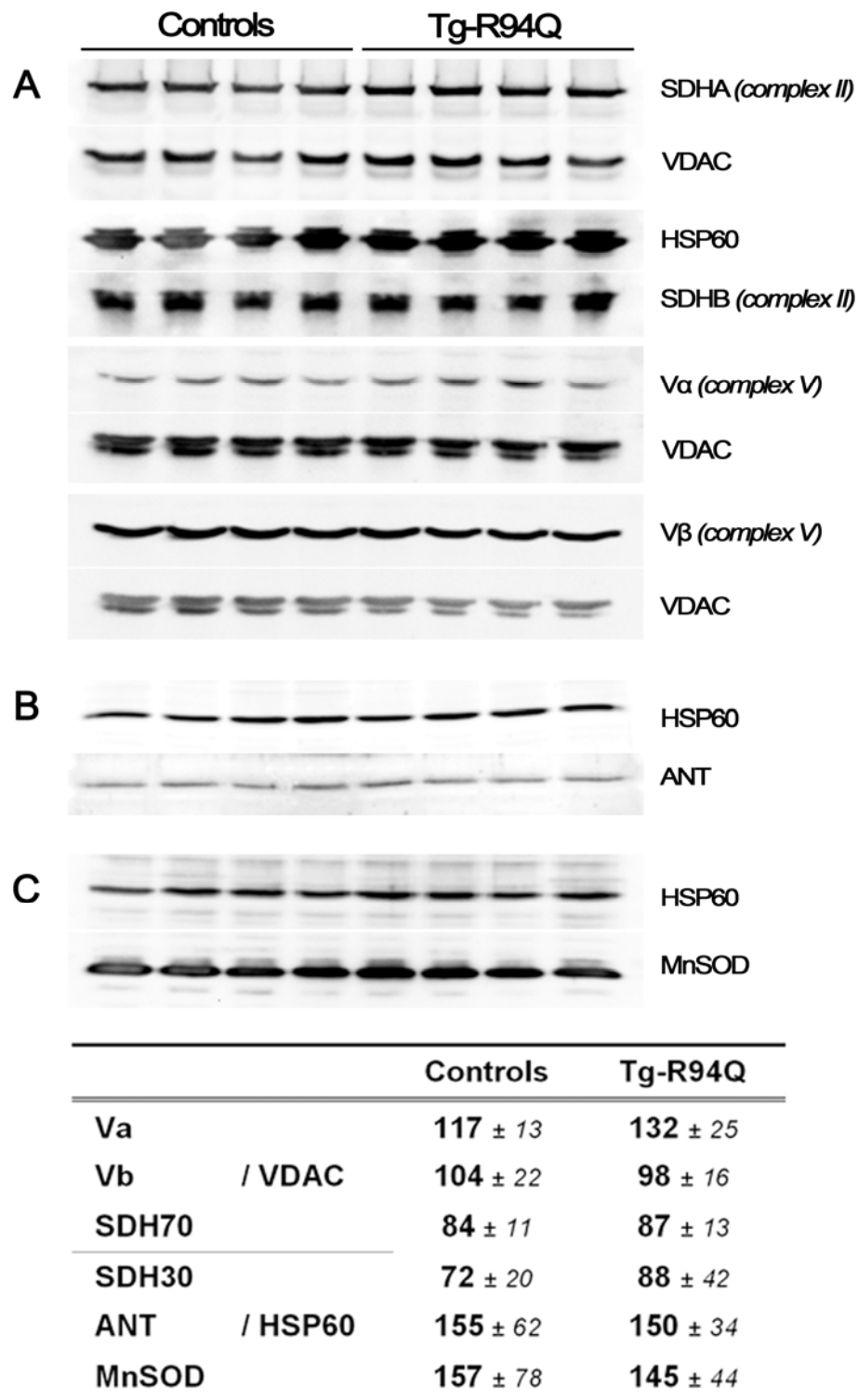
**Figure 1. Respiratory parameters in brain mitochondria from controls, Tg-Wt and Tg-R94Q mice.**

(A) State 3 oxygen consumption induced by ADP with complex I-dependent substrates (MP), i.e. 5 mM malate/2.5 mM pyruvate, or complex II-dependent substrates (SR), i.e. 5 mM succinate and 10  $\mu$ M rotenone. (B) Respiratory control ratio (RCR), i.e. the ratio of oxygen consumption in the presence of 0.5 mM ADP to that in its absence, with complex II-dependent substrates (SR). (C) Rates of mitochondrial ATP synthesis measured by spectrophotometry. (D, E) Relationship between membrane potential and oxygen consumption in state 4 respiration (2  $\mu$ g/ml oligomycin) in mitochondria from brain tissue in controls (■) and tg-R94Q ( $\Delta$ ) mice. (D) Complex I-dependent oxygen consumption was progressively inhibited through successive steady states induced by additions of rotenone (up to 90 ng/ml) while (E) complex II-dependent oxygen consumption was progressively inhibited through successive steady states induced by additions of malonate (up to 5.5 mM). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD. Statistical significance: \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.

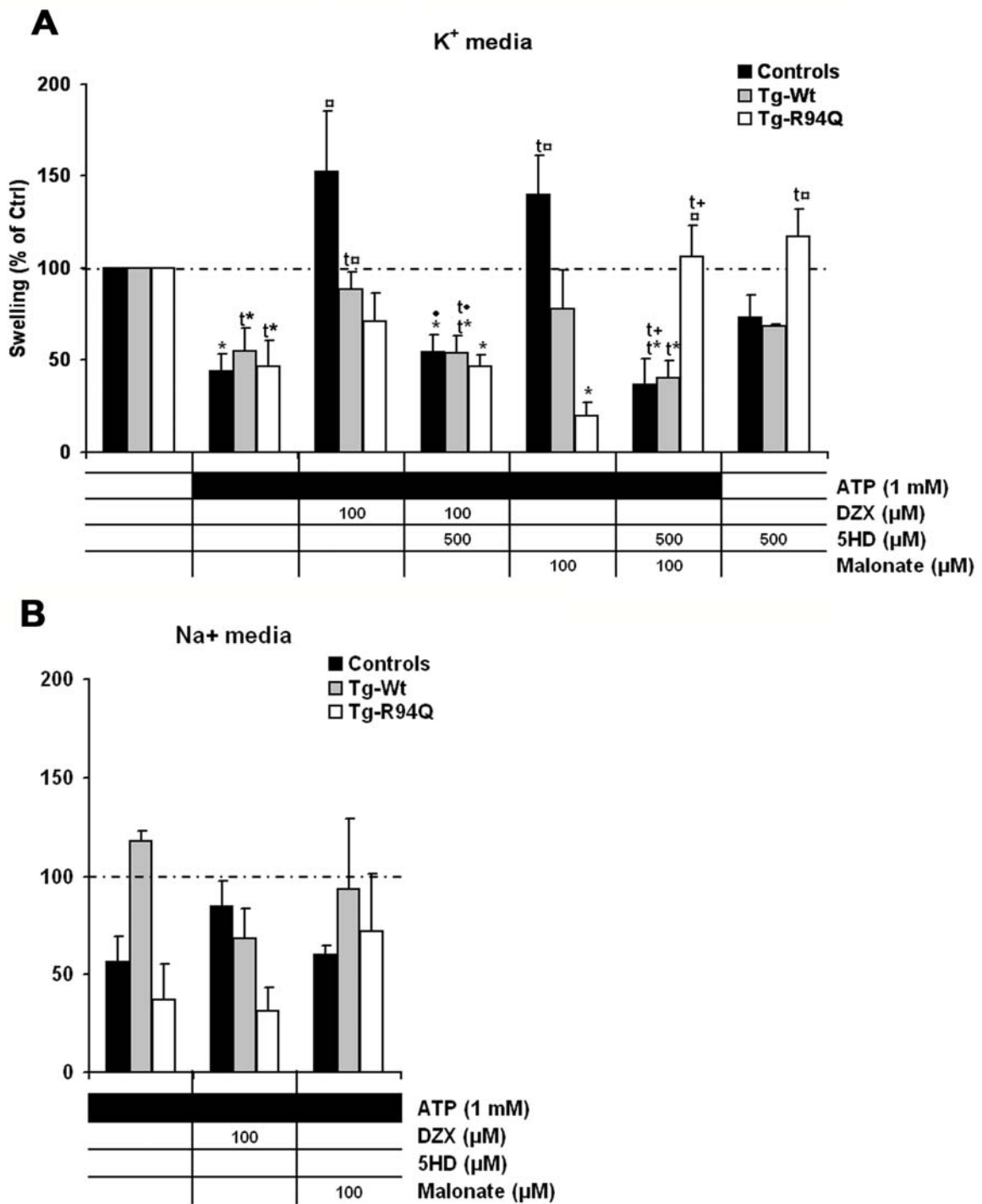


**Figure 2. ADP and FCCP titration of complex II-dependent oxygen consumption rate in brain mitochondria of controls (■) and tg-R94Q (△) mice.**

After the measurement of complex-II driven oxygen consumption rate, i.e. 5 mM succinate and 10  $\mu M$  rotenone, small amounts of FCCP (A) and ADP (B) were sequentially added in the polarographic chamber. (C) Apparent  $K_m^{(ADP)}$  for respiration in brain mitochondria determined using the Lineweaver-Burk transformation. Data from the Lineweaver-Burk linearization were well fitted by linear regression plots in controls (C<sub>1</sub>) but were better fitted by non-linear regression plots in Tg-R94Q (C<sub>2</sub>). Results are expressed as mean values  $\pm$  SD. Statistical significance: \* $p < 0.05$ .

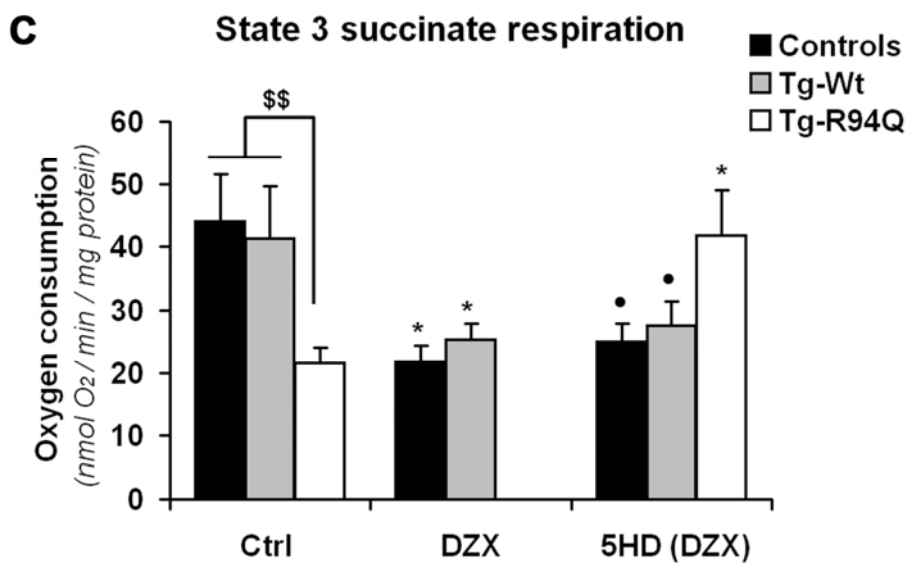
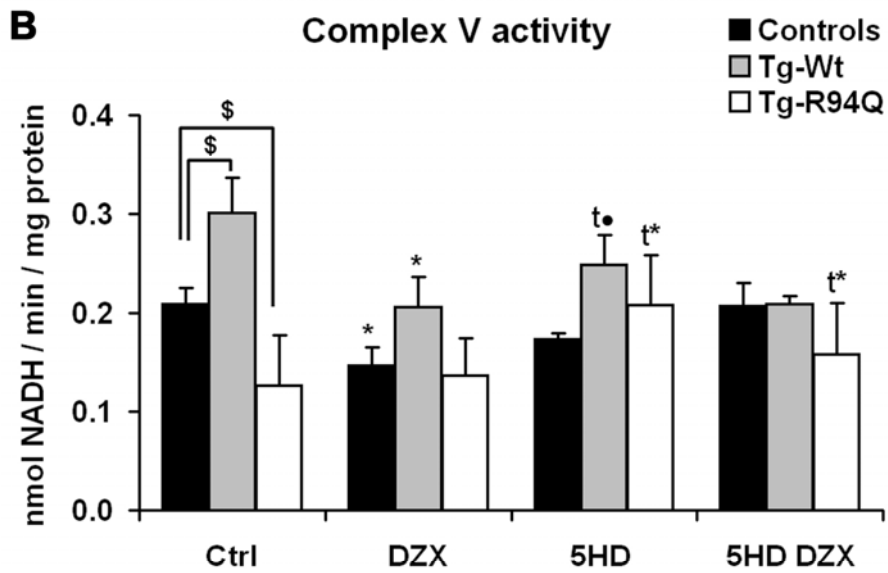
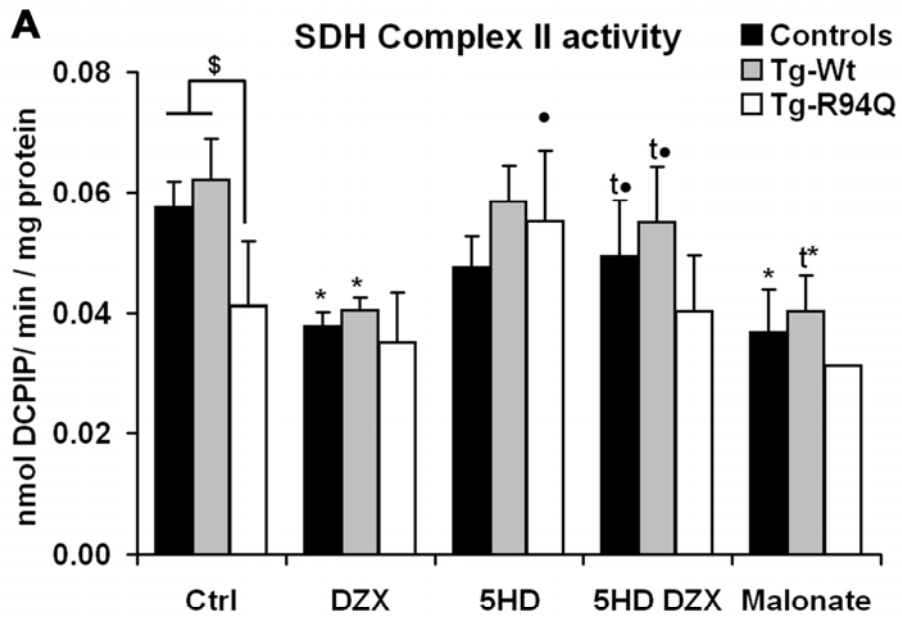


**Figure 3. Expression of mitochondrial complex II and complex V subunits (A), ANT (B) and MnSOD (C) in mitochondria from brain tissue in controls and Tg-R94Q mice.** Brain mitochondrial fractions were analyzed by western blotting using antibodies against SDHA, SDHB, V $\alpha$ , V $\beta$ , ANT, MnSOD, VDAC and HSP60. VDAC and HSP60 were used as mitochondrial markers and controls for protein loading. Results are expressed as mean values  $\pm$  SD.



**Figure 4. mK<sub>ATP</sub> channel swelling/light-scatter assay in mitochondria from brain tissue of controls, TgWt and Tg-R94Q mice.**

Magnitude of mK<sub>ATP</sub> channel swelling, relative to controls, as determined by a decrease in absorbance after 0.3 min incubation in K<sup>+</sup> media (A), and in Na<sup>+</sup> media (B). When indicated, 1 mM ATP, and/or 100 μM diazoxide, 500 μM 5HD or 100 μM malonate were present in the media. Results are expressed as mean values ± SEM. Compared with control conditions (\*), ATP (⊠), diazoxide (●) or malonate (+). Statistical tendency: *p* < 0.1 (t\*, t⊠, t●, t+), statistical significance: *p* < 0.05 (\*, ⊠, ●, +).



**Figure 5. Effect of  $mK_{ATP}$  modulators on SDH complex II activity (A), complex V activity (B) and State 3 succinate-driven respiration rate (C).**

(A) Succinate dehydrogenase enzymatic activity of mitochondrial complex II and (B) complex V measured in brain mitochondria from controls, Tg-Wt and Tg-R94Q mice incubated with 100  $\mu$ M diazoxide, 500  $\mu$ M 5HD and 100  $\mu$ M Malonate as indicated. Activities were normalized to citrate synthase (CS) one. (C) State 3 oxygen consumption induced by ADP with complex II-dependent substrates (SR) measured in mitochondria isolated from brain of controls, Tg-Wt and Tg-R94Q mice in the presence of 100  $\mu$ M diazoxide and/or 500  $\mu$ M 5HD. In the last condition, Controls and Tg-Wt were incubated with DZX and 5HD and Tg-R94Q with 5HD alone. Results are expressed in nmol/min/mg of protein as mean  $\pm$  SEM. Compared with controls or Tg-Wt mitochondria (\$), compared with control conditions (\*) or diazoxide (●). Statistical tendency:  $p < 0.1$  (t\*, t●), statistical significance:  $p < 0.05$  (\$, \*, ●),  $p < 0.01$  (\$\$).

## D. Résultats

Depuis quelques années, l'analyse moléculaire du gène MFN2 associée au diagnostic clinique nous a permis d'obtenir un échantillon de plus en plus important de fibroblastes porteurs de mutations du gène MFN2. L'analyse polarographique de ces cellules met en évidence de façon systématique la présence d'un découplage des phosphorylations oxydatives, décrit lors d'une étude précédemment menée au laboratoire (Loiseau *et al.*, 2007). La baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives se traduit par une diminution du rapport ATP/O pour l'ensemble des cultures fibroblastiques étudiées, sans que cette diminution du rendement énergétique n'entraîne de déficit de synthèse d'ATP mitochondrial. Nous avons cherché à explorer les mécanismes à l'origine de la diminution du rendement énergétique et du maintien de la synthèse d'ATP (article 3). Nous avons montré que la respiration à l'état 3 des fibroblastes de patients atteints de CMT2A augmente et que cette augmentation implique essentiellement la respiration liée aux substrats du complexe II. Aucune modification de l'activité enzymatique de ce complexe n'a cependant été mesurée. Cette augmentation de la respiration liée au complexe II n'est pas non plus corrélée à la baisse du rapport ATP/O. Dès lors, la diminution d'efficacité pouvait être liée à l'augmentation de l'expression/activité de protéines découplantes, telles que les UCP ou l'ANT (Samartsev *et al.*, 1997a ; Brand *et al.*, 2005). Nos résultats indiquent que l'expression de la protéine découplante UCP2 n'est pas modifiée dans les fibroblastes CMT2A alors que l'activité de l'ANT et plus particulièrement l'expression de l'ANT3 sont augmentées.

Notre quatrième étude, réalisée sur les mitochondries de cerveau d'un modèle murin de CMT2A lié à la mutation p.R94Q, montre une perturbation du métabolisme énergétique mitochondrial différente de celle retrouvée dans les fibroblastes de patients. La consommation d'oxygène à l'état 3 en présence des substrats du complexe II est considérablement diminuée alors qu'elle est inchangée en présence des substrats du complexe I. De plus, l'ajout du découplant FCCP lève partiellement l'inhibition de la respiration liée au complexe II. En présence des substrats du complexe II, la cinétique du potentiel de membrane en fonction de la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante (état 4 en présence d'oligomycine) montre que pour une même consommation d'oxygène, le potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) est plus élevé chez les souris Tg-R94Q que chez les souris contrôles. Ce n'est pas le cas en présence des substrats du complexe I. Nous avons également

montré une diminution des activités enzymatiques succinate déshydrogénase (SDH) et succinate ubiquinone réductase (SUR) du complexe II, et du complexe V (F1-ATPase). Par ailleurs, en étudiant les mécanismes à l'origine de ce défaut énergétique, nous avons constaté que le diazoxide (DZX), un activateur spécifique du canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP ( $mK_{ATP}$ ), inhibe la respiration à l'état 3 en présence des substrats du complexe II des mitochondries contrôles et Tg-Wt. Il inhibe également l'activité des complexes II et V, la ramenant au niveau des Tg-R94Q. Chez les souris Tg-R94Q, le diazoxide n'a pas d'effet sur l'activité des complexes et n'induit pas de gonflement mitochondrial en présence de  $K^+$ . Il est donc inefficace sur les mitochondries de ces souris mutées. Au contraire, le 5 hydroxydecanoate (5HD), un inhibiteur du  $mK_{ATP}$ , lève l'inhibition de la respiration à l'état 3 en présence de succinate et l'inhibition des complexes II et V, présentes dans les mitochondries Tg-R94Q.

## ***E. Discussion***

L'exploration biochimique de deux modèles d'étude de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A montre que les mutations du gène *MFN2* perturbent le métabolisme énergétique mitochondrial. Les modifications retrouvées dans les fibroblastes de peau de patients et dans les mitochondries de cerveau de souris porteuses de l'allèle pathogène *MFN2*<sup>R94Q</sup> ne sont cependant pas les mêmes.

### ➤ **Article 3** (cf. figure 23)

#### *Compensation du défaut de couplage des OXPHOS dans les fibroblastes CMT2A*

Les fibroblastes de patients atteints de CMT2A et porteurs d'une mutation du gène *MFN2* présentent une baisse d'efficacité des OXPHOS sans diminution de la synthèse d'ATP (Loiseau *et al.*, 2007). Nous avons montré dans notre troisième étude que la respiration maximale induite par l'ADP (état 3) est augmentée dans les cellules de patients avec une hausse significative en présence de succinate (substrat du complexe II). Cette augmentation de la consommation d'oxygène liée au complexe II n'est corrélée ni à une augmentation des activités enzymatiques succinate déshydrogénase et succinate ubiquinone réductase portées par le complexe II, ni à la quantité de la sous unité SDH-B, ce qui suggère la mise en place d'une adaptation métabolique. Cette augmentation de la respiration liée au complexe II



permet d'assurer le maintien de la synthèse d'ATP malgré la baisse du rapport ATP/O. Le complexe I n'interviendrait pas dans ce maintien de la production d'ATP. En effet, la diminution du potentiel de membrane mitochondrial mesurée dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A limiterait l'activité de la navette malate / aspartate, principal fournisseur de NADH à la chaîne respiratoire, dont l'activité dépend de la force proton-motrice (Lanoue et Schoolwerth, 1979 ; Meijer et Van Dam, 1974) et donc du  $\Delta\Psi_m$ . Ainsi, l'apport limité de NADH au complexe I, empêcherait la possibilité d'une augmentation de la respiration induite par les substrats du complexe I. En revanche, l'apport en FADH<sub>2</sub> ne dépend pas du potentiel de membrane. Le complexe II est ainsi plus à même de préserver la synthèse d'ATP dans le cas d'un défaut de couplage des OXPHOS (Sibille *et al.*, 2001).

La baisse du rapport ATP/O ne semble pas délétère dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A. En effet, les cellules de patients ont une croissance identique à celle des témoins et ne présentent pas de sensibilité accrue à l'apoptose induite par la staurosporine (Loiseau *et al.*, 2007). Dans les cellules neuronales, la synthèse d'ATP serait essentiellement conduite par le complexe I, avec comme substrat énergétique principal des neurones, le glucose (Hertz *et al.*, 1988 ; Greene et Winegrad, 1979). Or, le maintien de la synthèse d'ATP implique essentiellement le complexe II. Il est donc possible que ce mécanisme compensatoire ne puisse pas se mettre en place et aboutisse à une restriction énergétique dans les neurones. De plus, la propagation de l'influx nerveux est un phénomène très consommateur d'énergie puisque les pompes qui permettent de rétablir l'équilibre ionique utilisent l'ATP.

#### Mécanisme à l'origine de la baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives dans les fibroblastes CMT2A

Plusieurs paramètres interviennent dans la régulation du rendement énergétique mitochondrial.

La nature des substrats fournis à la chaîne respiratoire joue un rôle important. En effet, la stœchiométrie H<sup>+</sup>/O<sub>2</sub> est plus faible en présence des substrats du complexe II (succinate, FADH<sub>2</sub>) que du complexe I (malate et pyruvate, NADH) (Leverve, 2007). Ceci est lié au fait que les électrons fournis à partir du NADH sont transférés à travers 3 sites de couplages (complexes I, III et IV), où les réactions d'oxydo-réductions sont couplés à un transport de protons au travers de la membrane mitochondriale interne. En revanche, 2 sites de couplage (complexes III et IV) sont impliqués lorsque les électrons sont fournis à partir du FADH<sub>2</sub>, le

complexe II n'intervenant pas dans le transport de protons. Or, nous avons montré une augmentation de la respiration en présence de succinate dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A. Cette augmentation provoque un déséquilibre de l'utilisation des substrats en faveur du complexe II chez les patients par rapport aux témoins. La diminution du rapport ATP/O aurait donc pu être expliquée par l'utilisation préférentielle du succinate indiquée par la baisse du rapport de la respiration en malate-pyruvate par la respiration en succinate-roténone (rapport MP/SR). Cependant, notre étude montre qu'il n'existe pas de corrélation entre la baisse du rapport ATP/O et la baisse du rapport MP/SR. Ceci indique que l'augmentation de la respiration en succinate ne peut expliquer à elle seule la baisse d'efficacité des OXPHOS retrouvée dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A.

Les protéines découplantes UCP peuvent également intervenir dans le découplage. En effet, comme pour la protéine UCP1 exprimée dans le tissu adipeux brun, il a été montré que l'expression dans un modèle de levure de UCP2 (Fleury *et al.*, 1997) et UCP3 (Zhang *et al.*, 1999) conduit à un découplage partiel de la respiration qui se traduit par une baisse du potentiel de membrane mitochondrial. Les UCP sont régulées au niveau transcriptionnel mais les acides gras ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS) modulent également leur activité (Brand *et al.*, 2004). Dans notre étude, nous avons montré qu'il n'y a pas de modification de l'expression d'UCP2. De plus, nos expériences ont été réalisées en présence de BSA (chélateur des acides gras), ce qui nous a permis d'exclure l'implication des acides gras dans le découplage. Nous avons également testé l'hypothèse d'une augmentation de la quantité de ROS pouvant conduire à une activation des UCP. Dans les fibroblastes CMT2A, l'activité de l'aconitase qui est une enzyme mitochondriale dont l'activité est sensible aux ROS, est inchangée. Ces données confirment les résultats précédemment obtenus (Loiseau *et al.*, 2007) montrant que la quantité de ROS est la même dans les fibroblastes témoins et de patients atteints de CMT2A. Les UCP n'interviendraient donc pas dans le découplage présent dans les fibroblastes de patient CMT2A.

L'ATP/ADP translocase est également impliquée dans la fuite de protons. En effet, Brand *et al.*, (2005) ont montré que l'intensité de la fuite de protons était directement corrélée à la quantité d'ANT présent dans la membrane mitochondriale, et cela même en présence de carboxyatractylate, un inhibiteur de l'ANT. Ces données indiquent un rôle de l'ANT dans la fuite de protons basale. Il a aussi été montré que l'activité de l'ANT pouvait intervenir dans la fuite de protons inductible (Samartsev *et al.*, 1997a). La mesure du taux d'expression des isoformes de l'ANT majoritairement présentes dans les fibroblastes CMT2A (ANT2 et

ANT3) montre une augmentation de l'expression de l'ANT3 dans les cellules de patients par rapport aux témoins. L'augmentation de l'ANT est confirmée au niveau protéique et semble spécifique puisqu'elle n'est liée ni à la quantité de sous unités des complexes de la chaîne respiratoire, ni à la quantité de la porine mitochondriale. Elle ne semble pas non plus associée à une biogenèse mitochondriale puisque la quantité d'ADNmt ainsi que l'activité de la citrate synthase qui est couramment utilisée comme indicateur de la masse mitochondriale sont inchangées. L'activité de l'ANT, mesurée en présence d'un inhibiteur spécifique, le carboxyatractyloside, est également augmentée de deux fois. Ces données indiqueraient un rôle fonctionnel de l'ANT dans la baisse d'efficacité des OXPHOS retrouvée dans les fibroblastes CMT2A.

#### ANT3 et pathogenèse de la CMT2A

Les conséquences de la surexpression de l'ANT3 ont été étudiées dans différents modèles. Ainsi, il a été montré qu'elle induit l'apoptose dans les cellules HeLa (Zamora *et al.*, 2004) alors qu'elle a un rôle protecteur dans les lymphocytes Th (Jang et Lee, 2006) ce qui suggère un effet dépendant du type cellulaire. Dans notre cas, la précédente étude menée au laboratoire a permis de montrer que les fibroblastes de patients CMT2A ne sont pas plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine que les contrôles (Loiseau *et al.*, 2007). La surexpression de l'ANT3 a également été montrée comme étant responsable de la diminution de la transmission du signal calcique entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique dans les cellules HeLa (Wieckowski *et al.*, 2006). De plus, une récente étude a permis de mettre en évidence le rôle de MFN2 dans l'accrochage de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, configuration nécessaire à la transmission du signal calcique entre les deux organites (De Brito et Scorrano, 2008). Cette même étude démontre que des mutations du gène *MFN2* affectent l'accrochage des deux organites. L'ANT3, de part son implication dans le métabolisme mitochondrial et dans la transmission du signal calcique, semble avoir un rôle clé dans le mécanisme physiopathologique de la CMT2A, qu'il reste à préciser.

#### ➤ Article 4

Dans la quatrième étude, nous nous sommes intéressés au métabolisme énergétique de mitochondries isolées de cerveaux issues d'un modèle murin de CMT2A. Ces souris expriment l'ADNc *MFN2* humain porteur de la mutation p.R94Q au niveau de leur tissu

nerveux. Les mitofusines 2 murines et humaines sont à 95% identiques et le résidu arginine en position 94 est conservé d'une espèce à l'autre (Detmer et Chan, 2007).

#### Altération du fonctionnement des OXPHOS dans les mitochondries Tg-R94Q

Nous avons mis en évidence un défaut d'oxydation du succinate par les mitochondries des souris Tg-R94Q qui se traduit par une baisse de la respiration à l'état 3 en présence de succinate par rapport aux souris contrôles et Tg-Wt. Il est intéressant de noter que ce défaut d'oxydation semble spécifique du succinate car les respirations mesurées en présence de malate-pyruvate, palmitoylcarnitine-CoASH et G3P ne sont pas différentes entre les souris Tg-R94Q et les souris contrôles. Nous avons également mis en évidence une diminution de 35% de l'activité SDH et de 20% de l'activité SUR du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. De tels déficits ont été retrouvés en association avec différents cas de neurodégénérescence, que ce soit en lien avec la maladie de Huntington (Brouillet *et al.*, 2005 ; Benchoua *et al.*, 2006) ou dans le cas d'aciduries méthylmaloniques (Okun *et al.*, 2002). Cependant, un défaut d'oxydation spécifique du succinate ainsi qu'une baisse d'activité du complexe II ont également été impliqués dans le préconditionnement ischémique et ainsi dans la cytoprotection cardiaque et cérébrale induite par le diazoxide, un ouvreur du canal potassique mitochondrial ATP-dépendant ( $mK_{ATP}$ ) (Schäfer *et al.*, 1969 ; Hanley *et al.*, 2002 ; Lim *et al.*, 2002; Pasdois *et al.*, 2006; Minners *et al.*, 2007; Dröse *et al.*, 2006 ; Kis *et al.*, 2003).

Nous avons remarqué que l'inhibition de la respiration à l'état 3 en présence de succinate était partiellement levée par l'ajout de l'agent découplant FCCP. Ceci suggérait que la diminution du potentiel de membrane mitochondrial pouvait restaurer l'oxydation du succinate. D'autre part, la mesure en cinétique du potentiel de membrane en fonction de la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante montrait une augmentation du potentiel de membrane à l'état IV pour un même niveau de respiration chez les souris Tg-R94Q et ce uniquement en présence de succinate. Ces résultats suggéraient qu'une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial en présence de succinate pouvait être à l'origine de son défaut d'oxydation. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des titrations de la respiration en présence de succinate par le FCCP et par l'ADP. Ces expériences nous ont permis de mesurer la stimulation de la consommation d'oxygène, et donc la consommation de succinate, suite à une baisse progressive du potentiel de membrane en shuntant le complexe V pour la titration au FCCP ou en passant par le complexe V pour la

titration à l'ADP. Quelque soit la concentration en FCCP (et donc même au potentiel le plus bas), la respiration des mitochondries Tg-R94Q est toujours inférieure à celle des contrôles. Le défaut d'oxydation du succinate est donc indépendant de la valeur du potentiel de membrane. Par contre, à partir d'une certaine concentration en ADP se situant autour de 0.025 mM, la stimulation de la consommation d'oxygène est bloquée. En effet, à partir de cette concentration, l'affinité apparente de la respiration pour l'ADP chute considérablement ( $K_m$  contrôles :  $32 \pm 8$  ;  $K_m$  Tg-R94Q : ADP < 0,025 mM :  $22 \pm 15$  et ADP > 0,025 mM :  $154 \pm 41$ ), bloquant l'oxydation du succinate. Ces résultats suggèrent que le défaut d'oxydation du succinate est potentialisé par l'activation du complexe V. Or, nous avons montré que l'activité enzymatique de ce complexe est abaissée de 35% dans les mitochondries Tg-R94Q par rapport aux mitochondries contrôles. Par contre, l'expression des sous unités catalytiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de ce complexe est inchangée. Il est intéressant de souligner que le complexe V est également une cible du DZX et que l'activité de ce complexe est abaissée dans les cas de préconditionnement ischémique (Ala-Rämi *et al.*, 2003 ; Comelli *et al.*, 2007 ; Contessi *et al.*, 2004). Ainsi, le déficit énergétique retrouvé dans les mitochondries Tg-R94Q est semblable aux effets décrits dans la littérature en présence de DZX ou dans le cas d'un préconditionnement ischémique. De plus, le DZX est un activateur du  $mK_{ATP}$  et l'ouverture du canal  $mK_{ATP}$  est impliquée dans le préconditionnement ischémique. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une ouverture constitutive de ce canal dans les mitochondries Tg-R94Q pourrait être à l'origine du défaut d'oxydation du succinate et de la diminution d'activité des complexes II et V.

#### *Effets des molécules activatrices et inhibitrices du canal $mK_{ATP}$ sur le métabolisme énergétique des mitochondries contrôles et Tg-R94Q*

Nous avons étudié l'effet du DZX, du 5HD et du malonate (*cf.* figure 24) sur l'activité des complexes II et V, sur l'oxydation du succinate et sur l'activité du canal dans des mitochondries énergisées par la présence de succinate, afin de déterminer l'activité de ce canal chez les souris Tg-R94Q et de clarifier le lien entre le complexe II et le  $mK_{ATP}$ . L'ouverture du  $mK_{ATP}$  provoque une entrée d'ions potassium qui s'accompagne d'une entrée d'eau et provoque ainsi un gonflement de la matrice mitochondriale. Ce gonflement peut être mesuré par la décroissance de la densité optique à 520 nm.

De cette manière, nous avons montré que le DZX et le malonate ouvrent le  $mK_{ATP}$  des mitochondries contrôles et Tg-Wt mais sont inefficaces sur les Tg-R94Q. De même, le DZX

n'a aucun effet sur l'activité des complexes II et V dans les mitochondries Tg-R94Q. En revanche, les mitochondries contrôles et Tg-Wt incubées en présence de DZX présentent un défaut d'oxydation du succinate et une baisse d'activité des complexes II et V mimant ainsi le déficit retrouvé chez les Tg-R94Q.

Le 5HD, inhibiteur spécifique du  $mK_{ATP}$ , inhibe le gonflement mitochondrial et donc l'ouverture du  $mK_{ATP}$  induite par le DZX dans les mitochondries contrôles et Tg-Wt. De même, il reverse totalement l'inhibition du complexe II et partiellement l'inhibition du complexe V induites par le diazoxide chez ces mitochondries suggérant que l'effet du DZX sur le complexe V est en partie indépendant du  $mK_{ATP}$ . En revanche, le 5HD restaure les activités des complexes II et V chez les Tg-R94Q au même niveau que les activités des contrôles et Tg-Wt. Ainsi, le DZX mime le phénotype des mitochondries Tg-R94Q chez les contrôles et Tg-Wt alors que le 5HD restaure les perturbations métaboliques des mitochondries Tg-R94Q ce qui suggère que l'ouverture du  $mK_{ATP}$  est responsable de ces perturbations chez les mitochondries Tg-R94Q.

#### Eléments concernant la structure du canal $mK_{ATP}$

L'identité moléculaire du canal  $mK_{ATP}$  reste incertaine (Ardehali et O'Rourke, 2005). Cependant, il a été proposé que le  $mK_{ATP}$  soit constitué des mêmes sous-unités que les canaux  $K_{ATP}$  de surface. Ceux-ci sont composés d'un tétramère de sous-unités Kir6.x ( $K^+$  inward rectifier) entouré de 4 sous-unités de récepteurs aux sulfonyles (SUR). Bien que certaines études montrent la présence de ces sous-unités dans les mitochondries de cœur et de cerveau (Lacza *et al.*, 2003a ; Lacza *et al.*, 2003b), leur implication dans le fonctionnement du canal reste incertaine. En effet, il a été montré que la présence d'un mutant Kir6.1 dominant négatif dans des myocytes ou que le knock-out du gène Kir1.6 chez la souris ne perturbent pas le fonctionnement du canal (Seharaseyon *et al.*, 2000 ; Miki *et al.*, 2002). Par ailleurs, il est intéressant de noter que différents inhibiteurs de la SDH, le malonate, l'acide 3-nitropropionique et l'atpénin A5 ouvrent le  $mK_{ATP}$  et interviennent dans le préconditionnement ischémique (Ockaili *et al.*, 2001 ; Horiguchi *et al.*, 2003 ; Wojtovich et Brookes, 2008; Wojtovich et Brookes, 2009). A l'inverse, le DZX inhibe le complexe II tant au niveau de son activité que de la respiration phosphorylante liée à ce complexe (Schäfer *et al.*, 1969). Les interactions pharmacologiques entre le complexe II et le  $mK_{ATP}$  ont conduit à l'hypothèse d'une interaction physique et fonctionnelle entre ces deux composés. Ardehali *et al.*, (2004) ont identifié par co-immunoprécipitation 4 protéines mitochondriales interagissant avec les sous

unités SDHA et B du complexe II : la sous unité  $\alpha$  du complex V, le transporteur de nucléotides adényliques (ANT), le transporteur de phosphate inorganique (PIC) et l'ATP-binding cassette mitochondriale 1 (mABC1). La fonction de mABC1 est inconnue mais cette protéine appartient à la même famille que les sous-unités SUR présentes dans les canaux  $K_{ATP}$  de surface. Dans cette même étude, il a été montré qu'une fois incorporée dans des liposomes, la fraction mitochondriale enrichie de ces 5 protéines présente une activité de transport de  $K^+$  sensible aux modulateurs du mKATP. Cette interaction pourrait expliquer l'association de déficits des complexes II et V rapportée chez certains patients atteints du syndrome NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire) (Brière *et al.*, 2005). Cependant, leur association en supercomplexe n'a jamais été décrite.

Certains de nos résultats supportent l'hypothèse d'une relation fonctionnelle et physique entre le complexe II et le canal mK<sub>ATP</sub>. Nous avons montré que le malonate, un inhibiteur du complexe II, ouvre le mK<sub>ATP</sub>. Le 5HD qui est un inhibiteur spécifique du mK<sub>ATP</sub> est capable de refermer le canal mK<sub>ATP</sub> ouvert en présence de malonate et de réverser l'inhibition du complexe II par le malonate, suggérant un lien fonctionnel étroit entre le complexe II et le mK<sub>ATP</sub>. Les mêmes résultats avaient été montrés sur des mitochondries de cœur en présence de succinate et en présence de glutamate-malate, ce qui montre que l'effet du malonate sur le mKATP est un effet direct qui ne passe pas par l'oxydation du succinate (Wojtovich et Brookes, 2008).

#### *mKATP et pathogenèse de la CMT2A*

L'ouverture du mKATP a été mise en évidence dans les mécanismes de protection ischémique au niveau du cœur (Garlid *et al.*, 2003), du cerveau (Liu *et al.*, 2003) et de la rétine (Roth *et al.*, 2006). De manière intéressante, bien qu'ils soient relativement rares, les déficits en SDH affectent principalement ces mêmes tissus et conduisent au développement de myopathies, cardiomyopathies, encéphalopathies et atrophies optiques (Rustin et Rötig, 2002). Ces données suggèrent que l'activité du complexe II est critique pour le fonctionnement de ces organes, conduisant à une protection dans le cas d'un déficit léger alors qu'un déficit plus important serait délétère. Il est alors important de préciser que le déficit mis en évidence dans les mitochondries Tg-R94Q est probablement sous estimé. En effet, nos investigations métaboliques ont été réalisées à partir de mitochondries isolées du cerveau. Cependant, le cerveau est constitué de neurones et majoritairement de cellules gliales. Or, le

cDNA *MFN2* muté étant sous le contrôle du promoteur NSE, seuls les neurones expriment la mutation ce qui diminue la proportion de mitochondries présentant la protéine MFN2 mutée.

L'utilisation des mitochondries isolées de cerveau soulève une autre question. Il a été montré que la fonction énergétique mitochondriale et la structure du réseau sont interdépendantes (Benard *et al.*, 2007). De plus, il a été suggéré qu'une agrégation du réseau mitochondrial pouvait intervenir dans la physiopathologie de la CMT2A (Baloh *et al.*, 2007 ; Detmer *et al.*, 2008). Or, notre étude a été réalisée à partir de mitochondries isolées ce qui fait que la structure du réseau n'était pas préservée. Cependant, les mitochondries ont été isolées dans les mêmes conditions que ce soit pour les souris contrôles, Tg-Wt et Tg-R94Q ce qui semble indiquer que l'organisation du réseau mitochondrial n'intervient pas, ou intervient précocement, dans le déficit énergétique mis en évidence dans les mitochondries Tg-R94Q. Ces données sont en accord avec ceux de Pich *et al.*, (2005) qui ont montré que le rôle de MFN2 dans le métabolisme énergétique est indépendant de son rôle de protéine de fusion mitochondriale.

### **SYNTHESE**

Ces deux études nous ont permis de montrer que les mutations du gène *MFN2* ont des répercussions sur l'oxydation du succinate. Cependant, alors que la respiration est augmentée dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A, elle est fortement abaissée dans le cas des mitochondries de cerveau des souris Tg-R94Q. Il a été montré que les mitochondries de cerveau contiennent six à sept fois plus de  $mK_{ATP}$  que celles de foie ou de cœur (Bajgar *et al.*, 2001). La quantité de canaux dans le cerveau pourrait être à l'origine des différences que nous observons entre nos deux tissus. De plus, le gonflement de la matrice mitochondriale peut conduire à une augmentation de l'oxydation des acides gras (Halestrap, 1989). Ainsi, dans l'hypothèse d'une activation de l'ouverture du  $mK_{ATP}$  dans les fibroblastes de patients CMT2A, l'augmentation de la respiration en présence de succinate pourrait être liée au gonflement matriciel.

De la même manière, nos données sur le potentiel de membrane mitochondrial divergent entre les fibroblastes de patients et les mitochondries de cerveau. Bien que le potentiel soit abaissé dans les fibroblastes de patients (Loiseau *et al.*, 2007), les mitochondries de cerveau de souris sont hyperpolarisées pour un même niveau de respiration en présence de succinate. Aucun consensus n'a été établi suite à l'ensemble des études portant sur les



conséquences de l'ouverture du  $mK_{ATP}$  sur le potentiel de membrane mitochondrial. Certaines études suggèrent que les molécules qui ouvrent les canaux  $mK_{ATP}$  induisent une forte dépolarisation mitochondriale (Szewczyk *et al.*, 1995). Cette dépolarisation serait liée à l'activation de l'échangeur  $H^+/K^+$  qui dissipe le gradient de protons de manière à faire ressortir le potassium entré dans la mitochondrie par le  $mK_{ATP}$  (Ardehali et O'Rourke, 2005). Dans ce cadre, l'oxydation du succinate par les mitochondries Tg-R94Q étant bloquée, il est possible que la chaîne respiratoire ne puisse fournir le gradient de protons nécessaire au fonctionnement de l'échangeur  $H^+/K^+$  ce qui expliquerait que le potentiel de membrane ne soit pas abaissé. D'autres études suggèrent une absence de modification du potentiel, voir une hyperpolarisation transitoire (Garlid, 2000 ; Kowaltowski *et al.*, 2001). Il est important de préciser que les mesures de potentiel de membrane que nous avons faites sur les mitochondries isolées de cerveau n'ont pas été faites dans les mêmes conditions que les mesures sur les fibroblastes. En effet, nos expériences ont été faites en condition non phosphorylante et en présence de nigéricine qui dissipe le  $\Delta pH$  en activant l'échangeur  $H^+/K^+$ . Ainsi, nos conditions expérimentales associées aux données de la littérature rendent difficile l'exploitation de nos résultats de  $\Delta\Psi_m$ .

Un des résultats important du troisième article est l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'ANT dans les fibroblastes de patients CMT2A. Cependant, nous ne retrouvons pas d'augmentation de la quantité d'ANT dans les mitochondries Tg-R94Q par rapport aux mitochondries contrôles. Dans l'hypothèse où l'ANT serait bien un constituant du  $mK_{ATP}$  (Ardehali *et al.*, 2004), le fait que le  $mK_{ATP}$  soit beaucoup plus représenté dans le cerveau pourrait expliquer cette différence. D'autres études suggèrent un lien entre le  $mK_{ATP}$  et l'ANT. Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'ANT supprime l'effet des modulateurs du  $mK_{ATP}$  sur la respiration mitochondriale. Ceci suggère que l'ANT intervient dans la régulation du flux de potassium induit par l'ouverture du  $mK_{ATP}$  (Kopustinskiene *et al.*, 2003). De Plus, l'ADP et l'ATP, qui sont les substrats de l'ANT, inhibent le  $mK_{ATP}$  (Bajgar *et al.*, 2001). Ainsi, l'ADP et l'ATP entrent en compétition avec les molécules qui ouvrent le  $mK_{ATP}$ , expliquant l'augmentation du  $K_m$  apparent pour l'ADP suite au traitement de mitochondries par le diazoxide (Dos Santos *et al.*, 2002). De manière intéressante, une titration à l'ADP nous a permis de montrer une augmentation du  $K_m$  pour l'ADP chez les souris Tg-R94Q par rapport aux contrôles, ce qui renforce l'hypothèse d'une ouverture constitutive de ce canal. Kopustinskiene *et al.*, (2003) avaient par ailleurs montré que les inhibiteurs de l'ANT suppriment l'effet découplant du DZX et du pinacidil, une autre

molécule ouvrant le  $mK_{ATP}$ , ce qui indique que le découplage associé à l'ouverture du  $mK_{ATP}$  serait lié à l'ANT. L'ANT étant impliquée dans le découplage des OXPHOS mis en évidence dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A, cette protéine pourrait jouer un rôle majeur dans cette pathologie

Une modification du couplage calcique entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie a été associée à l'ANT3, au  $mK_{ATP}$  et à MFN2. La surexpression de l'ANT3 diminue la transmission du signal calcique entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique dans les cellules HeLa (Wieckowski *et al.*, 2006). De même, l'ouverture du  $mK_{ATP}$  diminuerait l'accumulation de calcium dans la mitochondrie (Wang *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 2001). La protéine MFN2 étant impliquée dans l'accrochage de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (De Brito et Scorrano, 2008), il est donc possible, en plus d'une altération structurale et métabolique mitochondriale, qu'une dérégulation des flux calciques puisse être un élément majeur de la physiopathologie de la CMT2A.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre projet consistait en l'étude de la fonction mitochondriale dans des modèles de neuropathies liées aux mutations des gènes *OPA1* et *MFN2*, impliqués dans la fusion mitochondriale. Ce travail avait pour but de déterminer l'implication éventuelle d'un défaut énergétique dans la physiopathologie de ces maladies, l'objectif à terme étant d'utiliser la mitochondrie comme une cible thérapeutique.

▪ **ADOA et métabolisme énergétique mitochondrial**

La première partie de ce travail nous a permis d'étudier l'impact des mutations du gène *OPA1* sur la fonction énergétique mitochondriale dans les fibroblastes de patients atteints d'atrophie optique autosomique dominante. Nos résultats montrent une altération du métabolisme énergétique mitochondrial permettant de rapprocher l'ADOA des maladies mitochondriales « classiques » liées à des mutations de l'ADN mitochondrial, comme c'est le cas de la neuropathie optique héréditaire de Leber. Bien que la diminution d'efficacité des phosphorylations oxydatives et du potentiel de membrane mitochondrial soit commune aux deux pathologies, leur origine est différente. L'anomalie primaire de la LHON est une baisse d'activité du complexe I, liée à la mutation d'une de ses sous-unités. En revanche, de nombreux points restent à éclaircir concernant les mécanismes conduisant au défaut de couplage dans le cas de l'ADOA. Les travaux de Amutha *et al.*, (2004) sur la fonction de *mgm1p*, l'orthologue de *OPA1* chez la levure, montrent que certaines mutations de cette protéine affectent l'état d'oligomérisation du complexe V. Or, l'état d'oligomérisation de ce complexe a des répercussions sur le potentiel de membrane mitochondrial, la structure des crêtes, le stockage du cytochrome *c* et l'activité du complexe IV (Saddar *et al.*, 2008 ; Bornhövd *et al.*, 2006). L'étude de l'assemblage du complexe V et plus particulièrement de son état d'oligomérisation par Blue-Native PAGE dans des modèles cellulaires porteurs de mutations du gène *OPA1* serait intéressante.

Nos données suggèrent également un lien étroit entre la fonction de *OPA1* et *OPA3* sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Du fait de leur localisation à la membrane interne, l'hypothèse d'une interaction physique entre ces deux protéines devra être testée. De même, il serait intéressant d'étudier l'effet des variations d'expression de *OPA1* sur l'expression de *OPA3* et vice-versa. Ces études nous permettraient probablement d'obtenir des indications sur la fonction de la protéine *OPA3* qui est encore inconnue.

Dans le deuxième article de la thèse, nous avons rapporté le premier cas d'ADOA liée à la mutation p.I382M du gène *OPA1* dont les signes cliniques sont survenus suite à un

traitement par éthambutol. Nous avons montré que l'éthambutol affecte le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale de fibroblastes contrôlés en diminuant l'efficacité des phosphorylations oxydatives et l'activité du complexe IV. De manière intéressante, ces défauts sont déjà présents dans les fibroblastes de patients atteints d'ADOA. Nos résultats mettent donc en évidence une toxicité mitochondriale de l'éthambutol qui se surajoute aux défauts mitochondriaux induits par les mutations du gène *OPA1* dans le cas de l'ADOA ou des sous unités du complexe I dans le cas de la LHON. Les mécanismes conduisant à cette toxicité mitochondriale ne sont cependant pas établis. L'éthambutol, est un dérivé de l'éthylène-diamine connu pour son effet chélateur vis-à-vis des cations métalliques comme le fer, le cuivre et le zinc. Cet effet interviendrait dans son action antibactérienne mais serait également responsable de sa toxicité oculaire. La cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) comporte deux atomes de cuivre. La chélation du cuivre par l'éthambutol pourrait conduire à une diminution de l'activité de ce complexe. De plus, il a été montré que la présence de cuivre n'affecte pas l'action antibactérienne de l'éthambutol (Kosak *et al.*, 1998). Une étude visant à déterminer si une complémentation en cuivre permettrait de limiter les effets toxiques de l'éthambutol sans affecter le traitement antituberculeux devra être menée. Cependant, d'autres études modèrent l'effet chélateur de cette molécule puisqu'il a été décrit que l'effet toxique de l'éthambutol pourrait être médié par le zinc (Yoon *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 2009). Or, le zinc est un inhibiteur de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) (Kuznetsova *et al.*, 2005). Ainsi, il serait intéressant de clarifier l'effet de l'éthambutol vis-à-vis de la disponibilité en cuivre ou en zinc. Pour cela, l'effet de l'éthambutol sur l'activité du complexe IV en présence d'une complémentation en cuivre, en zinc, d'un chélateur spécifique du cuivre ou d'un chélateur spécifique du zinc pourrait être déterminé. Ces données associées à l'étude de l'effet bactéricide de l'éthambutol en présence des mêmes composés pourraient offrir de nouvelles perspectives dans le traitement de la tuberculose par éthambutol.

- **CMT2A et métabolisme énergétique mitochondrial**

La seconde partie de ce travail nous a permis d'étudier l'impact des mutations du gène *MFN2* sur la fonction énergétique mitochondriale dans les fibroblastes de patients et dans un modèle murin de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A. De précédents travaux menés au laboratoire sur les fibroblastes de 4 patients atteints de CMT2A avaient montré un défaut de couplage entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP provoquant une diminution importante du rendement des phosphorylations oxydatives. Cependant, aucun

déficit de synthèse d'ATP n'avait été retrouvé ce qui suggère une adaptation métabolique permettant la mise en place d'un mécanisme compensatoire. De plus, la baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives ne semblait liée ni à un défaut intrinsèque de la chaîne respiratoire, ni à une anomalie de la morphologie mitochondriale (Loiseau *et al.*, 2007).

Notre troisième étude avait donc pour objectif de déterminer les mécanismes à l'origine du défaut de couplage et de sa compensation. Nos résultats indiquent une augmentation de la respiration mitochondriale impliquant essentiellement le complexe II de la chaîne respiratoire. Nous avons montré que cette consommation d'oxygène accrue permet le maintien de la synthèse d'ATP mais n'intervient pas dans la baisse du rendement des phosphorylations oxydatives. En revanche, notre étude met en évidence une augmentation de la quantité d'ANT et plus particulièrement de l'expression de l'ANT3 dans les fibroblastes de patients. Or, plusieurs études montrant un rôle de l'ANT dans la fuite de protons basale et inductible (Brand *et al.*, 2005 ; Shabalina *et al.*, 2006). Un signal mitochondrial vers le noyau semble permettre l'augmentation spécifique de l'expression et de l'activité de l'ANT3. Cette communication ne conduit cependant pas à une biogénèse mitochondriale puisque ni l'activité de la citrate synthase, ni la quantité d'ADNmt ne sont pas modifiées. Finalement, nos données suggèrent un rôle de MFN2 dans le contrôle des échanges ATP/ADP. Il serait donc intéressant de clarifier la relation MFN2-ANT. Pour cela, l'expression de l'ANT3 pourrait être étudiée en relation avec celle du gène *MFN2* dans des modèles où *MFN2* est diminuée comme chez le rat Zucker obèse (Pich *et al.*, 2005 ; Bach *et al.*, 2005) ou après surexpression de *MFN2*.

Dans les cellules HeLa, il a été montré que la surexpression de l'ANT3 est responsable de la diminution de la transmission du signal calcique entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Wieckowski *et al.*, 2006), conduisant à une induction de la transition de perméabilité et à l'apoptose des cellules (Zamora *et al.*, 2004). Récemment, un nouveau rôle de MFN2 dans l'accrochage de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique a été mis en évidence (De Brito et Scorrano, 2008). Il a été montré que des mutations du gène *MFN2* affectent l'accrochage des deux organites et ainsi l'efficacité de la transmission du signal calcique. L'interaction mitochondrie –réticulum endoplasmique ainsi que les flux de calcium entre ces organites devront être étudiés dans nos modèles fibroblastiques. Ceci permettrait de déterminer si une perturbation de la signalisation calcique intervient dans le défaut énergétique retrouvé chez les patients et prend part à la physiopathologie de la CMT2A.

Les particularités du métabolisme énergétique neuronal nous ont conduits à poursuivre notre étude sur des mitochondries de cerveau de souris transgéniques dont seuls les neurones sont porteurs de l'allèle pathogène MFN2<sup>R94Q</sup>. Nous avons mis en évidence un important défaut énergétique qui se traduit par un blocage de l'oxydation du succinate associé à une baisse d'activité des complexes II et V de la chaîne respiratoire mitochondriale. En utilisant le diazoxide, un activateur spécifique et le 5 hydroxydecanoate, un inhibiteur spécifique du canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP (mKATP), nous avons montré que ces modifications métaboliques sont liées à l'ouverture de ce canal. Nos résultats suggèrent également une étroite relation entre la SDH (complexe II de la chaîne respiratoire) et ce canal.

La première question soulevée par ces résultats est de savoir quelle est la réelle identité moléculaire de ce canal. En effet, bien que ce canal soit caractérisé sur le plan fonctionnel et pharmacologique, sa structure reste inconnue et sa composition est sujette à controverse. Par homologie avec les canaux KATP de surface, de nombreuses études ont cherché la présence des sous-unités SUR et Kir au niveau mitochondrial et potentiellement impliquées dans la structure du canal mKATP (Suzuki *et al.*, 1997 ; Zhou *et al.*, 1999 ; Singh *et al.*, 2003 ; Lacza *et al.*, 2003a ; Lacza *et al.*, 2003b). Cependant, aucune sous-unité SUR connue n'a pu être identifiée. La sous-unité Kir6.1 a été localisé à la mitochondrie dans plusieurs tissus (muscle, foie, cerveau et cœur), mais l'utilisation d'un dominant négatif de Kir6.1 montre que cette sous-unité n'a pas d'effet sur l'activité du canal (Seharaseyon *et al.*, 2000). Une étude réalisée à partir de mitochondries de foie de rat a montré qu'un complexe multiprotéique contenant entre autre les sous-unités SDHA et SDHB du complexe II, la sous-unité  $\alpha$  du complexe V et l'ANT conférait une activité de transport de potassium sensible aux modulateurs pharmacologiques du mKATP (Ardehali *et al.*, 2004). Cependant, aucune association physique entre les sous-unités des complexes II et V n'a été mise en évidence par Blue-Native PAGE (Schägger *et al.*, 2004), ce qui suggère que cette interaction protéique est très labile. L'utilisation de conditions favorisant le fonctionnement et l'ouverture de ce canal, comme la présence de diazoxide au cours de l'isolement des mitochondries et dans le gel de migration pourraient peut-être nous permettre de mettre en évidence un tel complexe.

La seconde interrogation porte sur les éléments reliant la protéine MFN2 au canal mKATP.

L'interaction directe entre la protéine MFN2 et les composants de ce canal pourrait être testée par Blue-Native PAGE. La partie de la protéine MFN2 et de son orthologue chez la levure

Fzo1 localisée dans l'espace intermembranaire est une boucle très courte qui permet la formation de sites de contacts étroits entre la membrane externe et interne. Cette boucle aurait un rôle régulateur important pour la fusion mitochondriale (Fritz *et al.*, 2001 ; Neuspiel *et al.*, 2005). La relation MFN2 - mKATP pourrait être indirecte via des éléments de signalisation conduisant à l'ouverture du canal. Il a été montré que le canal pouvait être ouvert suite à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Fornazari *et al.*, 2008). Cependant nos premiers résultats semblent indiquer qu'il n'y a pas d'augmentation des ROS dans les mitochondries Tg-R94Q chez qui l'activité de l'aconitase n'est pas abaissée et la quantité de protéine MnSOD (manganese superoxyde dismutase) n'est pas augmentée. Nous pourrions poursuivre cette étude en dosant l'activité des SOD mitochondriales et cytosoliques, de la catalase ainsi que l'oxydation des thiols membranaires, puisque leur oxydation peut entraîner l'ouverture du mK<sub>ATP</sub> (Fornazari *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la voie de signalisation impliquée dans le préconditionnement ischémique conduisant à l'ouverture du mKATP implique la phosphatidylinositol 3-kinase, la NO synthase endothéliale, la guanilate cyclase et la protéine kinase G (Oldenburg *et al.*, 2004). Cette voie de signalisation devra être explorée, avec une attention plus particulière pour la guanilate cyclase qui produit du GMPc à partir de GTP, de part l'activité GTPasique de MFN2. La transmission du signal entre la protéine kinase G et le mKATP fait l'objet de nombreuses publications : l'utilisation d'inhibiteurs des protéines kinase C (PKC) a mis en évidence l'importance de ces protéines dans cette signalisation (Wang *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2005). Parmi toutes les isoformes de PKC, la PKC $\alpha$ , la PKC $\delta$  et plus particulièrement la PKC $\epsilon$  ont été impliquées dans l'ouverture du mKATP (Harada *et al.*, 2004 ; Hassouna *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 1999a ; Kim *et al.*, 2006 ; Jaburek *et al.*, 2006 ; Raval *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'étudier la quantité et l'état de phosphorylation de ces isoformes par Western blot de manière à déterminer si l'une d'entre elles est impliquée dans l'ouverture du canal chez les souris MFN2R94Q. De plus, il a été montré que l'activité du mKATP est modulée par le calcium (Dahlem *et al.*, 2004) et que son ouverture est impliquée dans la protection vis-à-vis d'une surcharge calcique dans la mitochondrie (Wang *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 2001). L'étude de la PKC $\alpha$  qui est calcium dépendante contrairement aux isoformes  $\delta$  et  $\epsilon$  pourrait nous donner des indications sur le rôle du calcium vis-à-vis de l'activation du mK<sub>ATP</sub> dans les souris Tg-R94Q.

Il serait également intéressant de développer un modèle cellulaire neuronal exprimant la mutation p.R94Q afin de reproduire le phénotype observé dans le cerveau de souris et



d'explorer les voies précédemment décrites. Compte tenu du rôle de MFN2 dans l'accrochage de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (De Brito et Scorrano, 2008) et la transmission calcique entre les organites, les flux calciques et potassiques pourraient également être étudiés dans ce modèle.

La question de la tissu-spécificité dans les pathologies sur lesquelles nous nous sommes penchés reste centrale. Les maladies mitochondriales sont souvent multi-systémiques alors que les pathologies liées à la dynamique mitochondriale sont essentiellement neurodégénératives. L'étude de modèles neuronaux reste donc essentielle. Dans ce cadre, le transport axonal des mitochondries est un élément de la dynamique mitochondriale majeur à étudier. Les perturbations métaboliques mises en évidence dans nos études induisent des anomalies du transport axonal (Miller et Sheetz, 2004). Il en est de même pour le zinc (Malaiyanda *et al.*, 2005) dont la concentration est élevée suite au traitement par éthambutol (Yoon *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude de Baloh *et al.*, (2007) montre une altération du transport axonal mitochondrial dans des neurones exprimant des formes mutées de MFN2. De plus, il a été retrouvé dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Charcot-Marie Tooth de type 4J ainsi que dans les fibroblastes et neurones d'un modèle murin de CMT4J liée aux mutations du gène FIG4, la présence de vacuoles conduisant à une obstruction axonale et à une anomalie du transport des organites (Chow *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008). De même, la présence de vacuoles dans les axones suite à un traitement par éthambutol pourrait conduire à une anomalie du transport axonal.

En conclusion, nos travaux montrent un déficit énergétique lié aux mutations des gènes *OPA1* et *MFN2*. Comme l'a suggéré Chan (2007), ces données confortent l'hypothèse que la sensibilité des neurones aux défauts de la dynamique mitochondriale dépende plus probablement des exigences particulières des neurones vis-à-vis de la fonction énergétique mitochondriale et renforcent la relation entre les phénomènes de fission-fusion mitochondriales et le fonctionnement des phosphorylations oxydatives.

# BIBLIOGRAPHIE

# A

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. and Walker, J.E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria". *Nature* 370(6491): 621-628.
- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. and Enríquez, J.A. (2004). "Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria". *Mol Cell* 13(6): 805-815.
- Ala-Rämi, A., Ylitalo, K.V. and Hassinen, I.E. (2003). "Ischaemic preconditioning and a mitochondrial KATP channel opener both produce cardioprotection accompanied by F1F0-ATPase inhibition in early ischaemia". *Basic Res Cardiol* 98(4): 250-258.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. and Wissinger, B. (2000). "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28". *Nat Genet* 26(2): 211-215.
- Altmann, R. (1890). "Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen". Veit, Leipzig.
- Amati-Bonneau, P., Odent, S., Derrien, C., Pasquier, L., Malthiery, Y., Reynier, P. and Bonneau, D. (2003). "The association of autosomal dominant optic atrophy and moderate deafness may be due to the R445H mutation in the OPA1 gene". *Am J Ophthalmol* 136(6): 1170-1171.
- Amati-Bonneau, P., Guichet, A., Olichon, A., Chevrollier, A., Viala, F., Miot, S., Ayuso, C., Odent, S., Arrouet, C., Verny, C., Calmels, M.N., Simard, G., Belenguer, P., Wang, J., Puel, J.L., Hamel, C., Malthiery, Y., Bonneau, D., Lenaers, G. and Reynier, P. (2005). "OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness". *Ann Neurol* 58(6): 958-963.
- Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissière, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., Iommarini, L., Labauge, P., Figarella-Branger, D., Marcorelles, P., Furby, A., Beauvais, K., Letournel, F., Liguori, R., La Morgia, C., Montagna, P., Liguori, M., Zanna, C., Rugolo, M., Cossarizza, A., Wissinger, B., Verny, C., Schwarzenbacher, R., Martín, M.A., Arenas, J., Ayuso, C., Garesse, R., Lenaers, G., Bonneau, D. and Carelli, V. (2008). "OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes". *Brain* 131(Pt 2): 338-351.
- Amati-Bonneau, P., Milea, D., Bonneau, D., Chevrollier, A., Ferré, M., Guillet, V., Gueguen, N., Loiseau, D., Crescenzo, M.A., Verny, C., Procaccio, V., Lenaers, G. and Reynier, P. (2009). "OPA1-associated disorders: Phenotypes and pathophysiology". *Int J Biochem Cell Biol* [Epub ahead of print].
- Amutha, B., Gordon, D.M., Gu, Y. and Pain, D. (2004). "A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance". *Biochem J* 381(Pt 1): 19-23.

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature* 290(5806): 457-465.
- Anesti, V. and Scorrano, L. (2006). "The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton". *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6): 692-699.
- Ardehali, H., Chen, Z., Ko, Y., Mejía-Alvarez, R. and Marbán, E. (2004). "Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32): 11880-11885.
- Ardehali, H. and O'Rourke, B. (2005). "Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death". *J Mol Cell Cardiol* 39(1): 7-16.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. and Schagger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits". *Embo J* 17(24): 7170-7178.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J. and Blackstone, C. (2005). "Release of OPA1 during apoptosis participate in the rapid and complete release of cytochrome *c* and subsequent mitochondrial fragmentation". *J Biol Chem* 280(42): 35742-35750.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. and Ricquier, D. (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production". *Nat Genet* 26(4): 435-439.
- Ashford, M.L., Sturgess, N.C., Trout, N.J., Gardner, N.J. and Hales, C.N. (1988). "Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones". *Pflugers Arch* 412(3): 297-304.
- Azzedine, H., Ruberg, M., Ente, D., Gilardeau, C., Perie, S., Wechsler, B., Brice, A., LeGuern, E. and Dubourg, O. (2003). "Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene." *Neuromuscul Disord* 13(4): 341-6.

## *B*

- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dagaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M. and Zorzano, A. (2003). "Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity". *J Biol Chem* 278(19): 17190-17197.

- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., Manco, M., Calvani, M., Castagneto, M., Palacín, M., Mingrone, G., Zierath, J.R., Vidal, H. and Zorzano, A. (2005). "Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6". *Diabetes* 54(9): 2685-2693.
- Bajgar, R., Seetharaman, S., Kowaltowski, A.J., Garlid, K.D. and Paucek, P. (2001). "Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain". *J Biol Chem* 276(36): 33369-33374.
- Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A. and Milbrandt, J. (2007). "Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations". *J Neurosci* 27(2): 422-430.
- Baracca, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Lenaz, G., Baruzzi, A., Schapira, A.H., Martinuzzi, A. and Carelli, V. (2005). "Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids". *Arch Neurol* 62(5): 730-736.
- Baricault, L., Ségui, B., Guégand, L., Olichon, A., Valette, A., Larminat, F. and Lenaers, G. (2007). "OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals". *Exp Cell Res* 313(17): 3800-3808.
- Barron, G.J., Tepper, L. and Iovine, G. (1974). "Ocular toxicity from ethambutol". *Am J Ophthalmol* 77(2): 256-260.
- Battisti, C., Formichi, P., Cardaioli, E., Bianchi, S., Mangiavacchi, P., Tripodi, S.A., Tosi, P. and Federico, A. (2004). "Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(12): 1731-1736.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., Gilbert, J.R., Pericak-Vance, M.A. and Vance, J.M. (2002). "Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21". *Nat Genet* 30(1): 21-22.
- Ben Othmane, K., Hentati, F., Lennon, F., Ben Hamida, C., Blél, S., Roses, A.D., Pericak-Vance, M.A., Ben Hamida, M. and Vance, J.M. (1993). "Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q." *Hum Mol Genet* 2(10): 1625-8.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. and Rossignol, R. (2007). "Mitochondrial bioenergetics and structural network organization". *J Cell Sci* 120(Pt 5): 838-848.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.M., Hirsch, E., Hantraye, P., Déglon, N. and Brouillet, E. (2006). "Involvement of mitochondrial

- complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin". *Mol Biol Cell* 17(4): 1652-1663.
- Birch-Machin, M.A., Taylor, R.W., Cochran, B., Ackrell, B.A. and Turnbull, DM. (2000). "Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene". *Ann Neurol* 48(3): 330-335.
- Birouk, N., Azzedine, H., Dubourg, O., Muriel, M.P., Benomar, A., Hamadouche, T., Maisonobe, T., Ouazzani, R., Brice, A., Yahyaoui, M., Chkili, T. and Le Guern, E. (2003). "Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene." *Arch Neurol* 60(4): 598-604.
- Bobyleva, V., Bellei, M., Pazienza, T. L. and Muscatello, U. (1997). "Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria". *Biochem Mol Biol Int* 41(3): 469-480.
- Boekema, E.J. and Braun, H.P. (2007). "Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system". *J Biol Chem* 282(1): 1-4.
- Bonneau, D., Souied, E., Gerber, S., Rozet, J.M., D'Haens, E., Journal, H., Plessis, G., Weissenbach, J., Munnich, A. and Kaplan, J. (1995). "No evidence of genetic heterogeneity in dominant optic atrophy". *J Med Genet* 32(12): 951-953.
- Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2006). "Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes". *J Biol Chem* 281(20): 13990-13998.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J.P. (1997). "Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression". *FEBS Lett* 408(1): 39-42.
- Bouhouche, A., Birouk, N., Benomar, A., Ouazzani, R., Chkili, T. and Yahyaoui, M. (2007). "A novel GDAP1 mutation P78L responsible for CMT4A disease in three Moroccan families." *Can J Neurol Sci* 34(4): 421-6.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A. and Rötig, A. (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency". *Nat Genet* 11(2): 144-149.
- Brand, M.D., Couture, P., Else, P.L., Withers, K.W. and Hulbert, A.J. (1991). "Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in mammal than in reptile". *Biochem J* 275(1): 81-86.
- Brand, M. D., Steverding, D., Kadenbach, B., Stevenson, P. M. and Hafner, R. P. (1992). "The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones". *Eur J Biochem* 206(3): 775-781.

- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. and Parker, N. (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins". *Free Radic Biol Med* 37(6): 755-767.
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J. (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content". *Biochem J* 392(Pt 2): 353-362
- Breen, E.P., Gouin, S.G., Murphy, A.F., Haines, L.R., Jackson, A.M., Pearson, T.W., Murphy, P.V. and Porter, R.K. (2006). "On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function". *J Biol Chem* 281(4): 2114-2119.
- Brière, J.J., Favier, J., El-Ghouzzi, V., Djouadi, F., Bénit, P., Gimenez, A.P. and Rustin, P. (2005). "Succinate dehydrogenase deficiency in human". *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2317-2324.
- Brookes, P.S., Buckingham, J.A., Tenreiro, A.M., Hulbert, A.J. and Brand, M.D. (1998). "The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 119(2): 325-334.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N. and Blum, D. (2005). "3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease". *J Neurochem* 95(6): 1521-1540.
- Brown, W.M., George, M. Jr and Wilson, A.C. (1979). "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA". *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1967-1971.
- Brown, J. Jr, Fingert, J.H., Taylor, C.M., Lake, M., Sheffield, V.C. and Stone, E.M. (1997). "Clinical and genetic analysis of a family affected with dominant optic atrophy (OPA1)". *Arch Ophthalmol* 115(1): 95-99.
- Brown, M.D., Trounce, I.A., Jun, A.S., Allen, J.C. and Wallace, D.C. (2000). "Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation". *J Biol Chem* 275(51): 39831-39836.
- Brustovetsky, N.N., Amerkanov, Z.G., Yegorova, M.E., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (1990). "Carboxyatractylate-sensitive uncoupling in liver mitochondria from ground squirrels during hibernation and arousal". *FEBS Lett* 272(1-2): 190-192.
- Butterworth, J., Yates, C.M. and Reynolds, G.P. (1985). "Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases". *J Neurol Sci* 67(2): 161-171.
- Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Wang, D., Yang, H., Estivill, X., Shohat, M. and Fischel-Ghodsian, N. (2004). "Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G

mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes MTO1 and GTPBP3". *Mol Genet Metab* 83(3): 199-206.

## C

- Cadenas, S., Echtay, K.S., Harper, J.A., Jekabsons, M.B., Buckingham, J.A., Grau, E., Abuin, A., Chapman, H., Clapham, J.C. and Brand MD. (2002). "The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3". *J Biol Chem* 277(4): 2773-2778.
- Cai, Q., Gerwin, C. and Sheng, Z.H. (2005). "Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes". *J Cell Biol* 170(6): 959-969.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villani, G. and Papa, S. (1991). "H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome *c* oxidase vesicles". *FEBS Lett* 288(1-2): 179-182.
- Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N. and Sadun, A.A. (2004a). "Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies". *Prog Retin Eye Res* 23(1): 53-89.
- Carelli, V., Rugolo, M., Sgarbi, G., Ghelli, A., Zanna, C., Baracca, A., Lenaz, G., Napoli, E., Martinuzzi, A. and Solaini, G. (2004b). "Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration". *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2): 172-179.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J. and Walker, J.E. (2006). "Bovine complex I is a complex of 45 different subunits". *J Biol Chem* 281(43): 32724-32777.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M.B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J.L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., Gobelet, C., Kralli, A. and Russell, A.P. (2005). "Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise". *J Physiol* 567(Pt 1): 349-358.
- Chada, S.R. and Hollenbeck, P.J. (2004). "Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria". *Curr Biol* 14(14): 1272-1276.
- Chan, D.C. (2007). "Mitochondrial dynamics in disease". *N Engl J Med* 356(17): 1736-1741.
- Chance, B. and Williams, G.R. (1956). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria". *J Biol Chem* 221(1): 477-489.
- Chang, D.T., Rintoul, G.L., Pandipati, S. and Reynolds, I.J. (2006). "Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons". *Neurobiol Dis* 22(2): 388-400.



- Chang, C.R. and Blackstone, C. (2007a). "Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology". *J Biol Chem* 282(30): 21583-21587.
- Chang, C.R. and Blackstone, C. (2007b). "Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation". *EMBO Rep* 8(12): 1088-1089.
- Charcot, J.M. and Marie, P. (1886). "Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, debutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains." *Rev Med* 6: 97-138.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. and Chan, D.C. (2003). "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development". *J Cell Biol* 160(2): 189-200.
- Chen, K.H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R.P. and Tang, J. (2004). "Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders". *Nat Cell Biol* 6(9): 872-883.
- Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D.C. (2005). "Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction". *J Biol Chem* 280(28): 26185-26192.
- Chinnery, P.F., Brown, D.T., Andrews, R.M., Singh-Kler, R., Riordan-Eva, P., Lindley, J., Applegarth, D.A., Turnbull, D.M. and Howell, N. (2001). "The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy". *Brain* 124(Pt 1): 209-218.
- Cho, H.J., Sung, D.H., Kim, B.J. and Ki, C.S. (2007). "Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutations in Korean patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2". *Clin Genet* 71(3): 267-272.
- Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J. and Frohman, M.A. (2006). "A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis". *Nat Cell Biol* 8(11): 1255-1262.
- Chow, C.Y., Zhang, Y., Dowling, J.J., Jin, N., Adamska, M., Shiga, K., Szigeti, K., Shy, M.E., Li, J., Zhang, X., Lupski, J.R., Weisman, L.S. and Meisler, M.H. (2007). "Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J". *Nature* 448(7149): 68-72.
- Chung, K.W., Kim, S.B., Park, K.D., Choi, K.G., Lee, J.H., Eun, H.W., Suh, J.S., Hwang, J.H., Kim, W.K., Seo, B.C., Kim, S.H., Son, I.H., Kim, S.M., Sunwoo, I.N. and Choi, B.O. (2006). "Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations". *Brain* 129(Pt 8):2103-2118.
- Chung, H., Yoon, Y.H., Hwang, J.J., Cho, K.S., Koh, J.Y. and Kim, J.G. (2009). "Ethambutol-induced toxicity is mediated by zinc and lysosomal membrane permeabilization in cultured retinal cells". *Toxicol Appl Pharmacol* 235(2): 163-170.

- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. and Scorrano, L. (2004). "OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(45): 15927-15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. and De Strooper, B. (2006). "Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome *c* release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling". *Cell* 126(1): 163-175.
- Claude A. (1940). "Particulate components of normal and tumor cells". *Science* 91(2351): 77-78.
- Claude, A. (1943). "The constitution of protoplasm". *Science* 97(2525): 451-456.
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., Lopez de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sanchez-Navarro, B., Millan, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R., Vilchez, J.J., Espinos, C. and Palau, F. (2005). "Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect." *J Med Genet* 42(4): 358-65.
- Clayton, D.A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA". *Cell* 28(4): 693-705.
- Cock, H.R., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (1999). "Functional consequences of the 3460-bp mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy". *J Neurol Sci* 165(1): 10-17.
- Cohn, A.C., Toomes, C., Potter, C., Towns, K.V., Hewitt, A.W., Inglehearn, C.F., Craig, J.E. and Mackey, D.A. (2007). "Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations". *Am J Ophthalmol* 143(4): 656-662.
- Cole, A., May, P.M. and Williams, D.R. (1981). "Metal binding by pharmaceuticals. Part 1. Copper(II) and zinc(II) interactions following ethambutol administration". *Agents Actions* 11(3): 296-305.
- Comelli, M., Metelli, G., Mavelli, I. (2007) "Downmodulation of mitochondrial F0F1 ATP synthase by diazoxide in cardiac myoblasts: a dual effect of the drug". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H820-829.
- Contessi, S., Metelli, G., Mavelli, I., Lippe, G. (2004) "Diazoxide affects the IF1 inhibitor protein binding to F1 sector of beef heart F0F1ATPsynthase". *Biochem Pharmacol* 67(10):1843-1851.
- Corvest, V., Sigalat, C., Venard, R., Falson, P., Mueller, D.M. and Haraux, F. (2005). "The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide: role of catalytic intermediates and enzyme turnover". *J Biol Chem* 280(11): 9927-9936.
- Costa, A.D., Garlid, K.D., West, I.C., Lincoln, T.M., Downey, J.M., Cohen, M.V. and Critz, S.D. (2005). "Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria". *Circ Res* 97(4): 329-336.
- Costa, A.D., Pierre, S.V., Cohen, M.V., Downey, J.M. and Garlid, K.D. (2008). "cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria". *Cardiovasc Res* 77(2): 344-352.

- Cribbs, J.T. and Strack, S. (2007). "Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death". *EMBO Rep* 8(10): 939-944.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2000). "The cytochrome *bcl* and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria". *J Biol Chem* 275(24): 18093-18098
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vílchez, J.J. and Palau, F. (2002). "The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease". *Nat Genet* 30(1): 22-25.

## D

- Dahlem, Y.A., Horn, T.F., Buntinas, L., Gonoï, T., Wolf, G. and Siemen, D. (2004). "The human mitochondrial KATP channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach". *Biochim Biophys Acta* 1656(1): 46-56.
- Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trézéguet, V., Lauquin, G.J., Pebay-Peyroula, E. and Brandolin, G. (2006). "Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier". *Physiology (Bethesda)* 21: 242-249.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E. and Votruba, M. (2007). "Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function". *Hum Mol Genet* 16(11): 1307-1318.
- De Brito, O.M. and Scorrano, L. (2008). "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria". *Nature* 456(7222): 605-610.
- De Brito, O.M. and Scorrano, L. (2009). "Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras". *Mitochondrion* 9(3): 222-226.
- De Marinis, M. (2001). "Optic neuropathy after treatment with anti-tuberculous drugs in a subject with Leber's hereditary optic neuropathy mutation". *J Neurol* 248(9):818-819.
- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J. and Sheetz, M.P. (2005). "Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission". *Curr Biol* 15(7): 678-683.
- De Vries, D.D., Went, L.N., Bruyn, G.W., Scholte, H.R., Hofstra, R.M., Bolhuis, P.A. and Van Oost, B.A. (1996). "Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia". *Am J Hum Genet* 58(4): 703-711.

- Degli-Esposti, M. (1998). "Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview". *Biochim Biophys Acta* 1364(2): 222-235.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. and Hamel, C.P. (2000). "Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy". *Nat Genet* 26(2): 207-210.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. and Hamel, C.P. (2001). "Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene". *Hum Genet* 109(6): 584-591.
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J. and Martin, S.J. (2006). "Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics". *Mol Cell* 21(6): 761-773.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H. and Guo, M. (2008). "The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38): 14503-14508.
- Detmer, S.A. and Chan, D.C. (2007). "Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations". *J Cell Biol* 176(4): 405-414.
- Detmer, S.A., Vande Velde, C., Cleveland, D.W. and Chan, D.C. (2008). "Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A". *Hum Mol Genet* 17(3): 367-375.
- Di Bacco, A. and Gill, G. (2006). "SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation". *Cell Cycle* 5(20): 2310-2313.
- Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.Y., Catic, A., Ploegh, H. and Gill, G. (2006). "The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division". *Mol Cell Biol* 26(12): 4489-4498.
- Dos Santos, P., Kowaltowski, A.J., Laclau, M.N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J.B., Tariosse, L. and Garlid, K.D. (2002). "Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1): H284-295.
- Dotti, M.T., Plewnia, K., Cardaioli, E., Manneschi, L., Rufa, A., Alemà, G. and Federico, A. (1998). "A case of ethambutol-induced optic neuropathy harbouring the primary mitochondrial LHON mutation at nt 11778". *J Neurol* 245(5): 302-303.
- Dröse, S., Brandt, U., Hanley, P.J. (2006) "K+-independent actions of diazoxide question the role of inner membrane KATP channels in mitochondrial cytoprotective signaling". *J Biol Chem* 281(33): 23733-23739.

- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J. and Braun, H.P. (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III". *Proc Natl Acad Sci USA* 102(9): 3225-3229
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.G., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2006). "Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology". *J Biol Chem* 281(49): 37972-37979.
- Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E.I., Imhof, A., Neupert, W., Langer, T. and Reichert, A.S. (2007). "OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria". *Mol Biol Cell* 18(9): 3582-3590.

## E

- Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K. and Klingenberg, M. (2001). "Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1416-1421.
- Echtay, K.S. and Brand, M.D. (2007) "4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production". *Redox Rep* 12(1): 26-29.
- Erecińska, M. and Wilson, D.F. (1982). "Regulation of cellular energy metabolism". *J Membr Biol* 70(1): 1-14.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. and Mihara, K. (2006). "Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function". *J Cell Sci* 119(Pt 23): 4913-4925.

## F

- Favier, J., Brière, J.J., Strompf, L., Amar, L., Filali, M., Jeunemaitre, X., Rustin, P. and Gimenez-Roqueplo, A.P. (2005). "Hereditary paraganglioma/pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency". *Horm Res* 63(4): 171-179.
- Feng, J., Li, H. and Rosenkranz, E.R. (2002). "Diazoxide protects the rabbit heart following cardioplegic ischemia". *Mol Cell Biochem* 233(1-2): 133-138.
- Ferré, M., Amati-Bonneau, P., Tourmen, Y., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2005). "eOPA1: an online database for OPA1 mutations". *Hum Mutat* 25(5): 423-428.
- Ferré, M., Bonneau, D., Milea, D., Chevrollier, A., Verny, C., Dollfus, H., Ayuso, C., Defoort, S., Vignal, C., Zanlonghi, X., Charlin, J.F., Kaplan, J., Odent, S., Hamel, C.P., Procaccio, V.,

- Reynier, P., Amati-Bonneau, P. (2009). "Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 Novel OPA1 mutations". *Hum Mutat* [Epub ahead of print].
- Fillingame, R.H. (1999). "Molecular rotary motors". *Science* 286(5445): 1687-1688.
- Fischel-Ghodsian, N., Kopke, R.D., and Ge, X. (2004). "Mitochondrial dysfunction in hearing loss". *Mitochondrion* 4(5-6): 675-694.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. and Warden, C.H. (1997). "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia". *Nat Genet* 15(3): 269-272.
- Forbes, R.A., Steenbergen, C. and Murphy, E. (2001). "Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism". *Circ Res* 88(8): 802-809.
- Fornazari, M., de Paula, J.G., Castilho, R.F. and Kowaltowski, A.J. (2008). "Redox properties of the adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel in brain mitochondria". *J Neurosci Res* 86(7): 1548-1556.
- Foster, D.B., Rucker, J.J. and Marbán, E. (2008). "Is Kir6.1 a subunit of mitoK(ATP)?" *Biochem Biophys Res Commun* 366(3): 649-656.
- Frank, V. and Kadenbach, B. (1996). "Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome *c* oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios". *FEBS Lett* 382(1-2): 121-124.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano, L. (2006). "OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion". *Cell* 126(1): 177-189.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. and Westermann, B. (2001). "Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion". *J Cell Biol* 152(4): 683-692.

## G

- Gallagher, M., Weinberg, R. and Simpson, M.V. (1986). "Effect of the bacterial DNA gyrase inhibitors, novobiocin, nalidixic acid, and oxolinic acid, on oxidative phosphorylation". *J Biol Chem* 261(19): 8604-8607.
- Garlid, K.D. (2000). "Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen". *Basic Res Cardiol* 95(4): 275-279.
- Garlid, K.D., Dos Santos, P., Xie, Z.J., Costa, A.D., Paucek, P. (2003) "Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection". *Biochim Biophys Acta* 1606(1-3): 1-21.

- Ghelli, A., Degli-Esposti, M., Carelli, V. and Lenaz, G. (1997). "Changes in mitochondrial complex I activity and coenzyme Q binding site in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)". *Mol Aspects Med* 18 Suppl: S263-267.
- Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A. and Selker, J.M. (2000). "Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells". *FEBS Lett* 474(1): 1-4.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrolla, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L. Jr, White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J. and Rothberg, J.M. (2003). "A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*". *Science* 302(5651): 1727-1736.
- Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002). "Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?" *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3): 174-180.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S. and Schwarz, T.L. (2006). "Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent". *J Cell Biol* 173(4): 545-57.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999). "Mitochondrial evolution". *Science* 283(5407): 1476-1481.
- Greene, D.A. and Winegrad, A.I. (1979). "In vitro studies of the substrates for energy production and the effects of insulin on glucose utilization in the neural components of peripheral nerve". *Diabetes* 28(10): 878-887.
- Griffin, E.E., Graumann, J. and Chan, D.C. (2005). "The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria". *J Cell Biol* 170(2): 237-248.
- Griparic, L. and Van der Bliek, A.M. (2001). "The many shapes of mitochondrial membranes". *Traffic* 2(4): 235-244.
- Griparic, L., Van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J. and Van der Bliek, A.M. (2004). "Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria". *J Biol Chem* 279(18): 18792-18798.
- Griparic, L., Kanazawa, T. and Van der Bliek, A.M. (2007). "Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage". *J Cell Biol* 178(5): 757-764.

- Groen, A.K., Wanders, R.J., Westerhoff, H.V., van der Meer, R. and Tager, J.M. (1982). "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration". *J Biol Chem* 257(6): 2754-2757.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D. and Rojo, M. (2008). "Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential". *Biol Cell* 100(5): 315-325.

## H

- Hackenbrock, C.R. (1981). "Energy-linked condensed-orthodox ultrastructural transformations in mitochondria". *Chemotherapy* 27 Supp12: 21-26.
- Hájek, P., Chomyn, A. and Attardi, G. (2007). "Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2". *J Biol Chem* 282(8): 5670-5681.
- Halestrap, A.P. (1989). "The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism". *Biochim Biophys Acta* 973(3): 355-382.
- Hamasaki, K. and Rando, R.R. (1997). "Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness". *Biochemistry* 36(40): 12323-12328.
- Han, J., Thompson-Lowrey, A.J., Reiss, A., Mayorov, V., Jia, H., Biouse, V., Newman, N.J. and Brown, M.D. (2006). "OPA1 mutations and mitochondrial DNA haplotypes in autosomal dominant optic atrophy". *Genet Med* 8(4): 217-225.
- Hanley, P.J., Mickel, M., Löffler, M., Brandt, U. and Daut, J. (2002). "K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart". *J Physiol* 542(Pt 3): 735-741.
- Harada, N., Miura, T., Dairaku, Y., Kametani, R., Shibuya, M., Wang, R., Kawamura, S. and Matsuzaki, M. (2004). "NO donor-activated PKC-delta plays a pivotal role in ischemic myocardial protection through accelerated opening of mitochondrial K-ATP channels". *J Cardiovasc Pharmacol* 44(1): 35-41.
- Harder, Z., Zunino, R. and McBride, H. (2004). "Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission". *Curr Biol* 14(4): 340-345.
- Harding, A.E., Sweeney, M.G., Miller, D.H., Mumford, C.J., Kellar-Wood, H., Menard, D., McDonald, W.I. and Compston, D.A. (1992). "Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation". *Brain* 115 ( Pt 4): 979-989.



- Harding, A.E., Sweeney, M.G., Govan, G.G. and Riordan-Eva, P. (1995). "Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation". *Am J Hum Genet* 57(1): 77-86.
- Hassouna, A., Matata, B.M. and Galiñanes, M. (2004). "PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium". *Am J Physiol Cell Physiol* 287(5): C1418-1425.
- Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system". *Annu Rev Biochem* 54: 1015-1069.
- Henderson, P.J., McGivan, J.D. and Chappell, J.B. (1969). "The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. The role of induced proton permeability". *Biochem J* 111(4): 521-535.
- Heng, J.E., Vorwerk, C.K., Lessell, E., Zurakowski, D., Levin, L.A. and Dreyer, E.B. (1999). "Ethambutol is toxic to retinal ganglion cells via an excitotoxic pathway". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(1): 190-196.
- Hertz, L., Drejer, J. and Schousboe, A. (1988). "Energy metabolism in glutamatergic neurons, GABAergic neurons and astrocytes in primary cultures". *Neurochem Res* 13(7): 605-610.
- Hesselink, M.K., Greenhaff, P.L., Constantin-Teodosiu, D., Hultman, E., Saris, W.H., Nieuwlaet, R., Schaart, G., Kornips, E. and Schrauwen, P. (2003). "Increased uncoupling protein 3 content does not affect mitochondrial function in human skeletal muscle in vivo". *J Clin Invest* 111(4): 479-486.
- Hill, R.L. and Bradshaw, R.A. (1969). "Fumarase: [EC 4.2.1.2 L-Malate hydro-lyase]". *Methods Enzymol* 13:91-99.
- Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Palade, G.E. (1948). "Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material". *J Biol Chem* 172, 619.
- Hollenbeck, P.J. and Saxton, W.M. (2005). "The axonal transport of mitochondria". *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411-5419.
- Holmuhamedov, E.L., Wang, L. and Terzic, A. (1999). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria". *J Physiol* 519 Pt 2: 347-360.
- Horiguchi, T., Kis, B., Rajapakse, N., Shimizu, K. and Busija, D.W. (2003). "Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats". *Stroke* 34(4): 1015-1020.
- Hoyt, C.S. (1980). "Autosomal dominant optic atrophy. A spectrum of disability". *Ophthalmology* 87(3): 245-251.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., McFarland, R., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. and

- Taylor, R.W. (2008). "Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance". *Brain* 131(Pt 2): 329-337.
- Hunter, M. and Giebisch, G. (1988). "Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule: inhibition by ATP". *Pflugers Arch* 412(3): 331-333.
- Hutchin, T., Haworth, I., Higashi, K., Fischel-Ghodsian, N., Stoneking, M., Saha, N., Arnos, C. and Cortopassi, G. (1993). "A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics". *Nucleic Acids Res* 21(18): 4174-4179.
- Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., Muhlenbein, N., Linder, D., Lottspeich, F. and Kadenbach, B. (2000). "Turkey cytochrome *c* oxidase contains subunit VIa of the liver type associated with low efficiency of energy transduction". *Eur J Biochem* 267(7): 2098-2104.
- Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stockl, P., Jansen-Durr, P. and Gnaiger, E. (2004). "Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts". *Biochem J* 380(Pt 3): 919-928.
- Hwang, J.M., Kim, J. and Park, S.S. (2003). "Leber's hereditary optic neuropathy mutations in ethambutol-induced optic neuropathy". *J Neurol* 250(1): 87-89.

/

- Ikeda, A., Ikeda, T., Ikeda, N., Kawakami, Y. and Mimura, O. (2006). "Leber's hereditary optic neuropathy precipitated by ethambutol". *Jpn J Ophthalmol* 50(3): 280-283.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E. and Nunnari, J. (2005). "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria". *J Cell Biol* 170(7): 1021-1027.
- Inoue, I., Nagase, H., Kishi, K. and Higuti, T. (1991). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane". *Nature* 352(6332): 244-247.
- Ishida, H., Hirota, Y., Genka, C., Nakazawa, H., Nakaya, H. and Sato, T. (2001). "Opening of mitochondrial K(ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria". *Circ Res* 89(10): 856-858.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. and Mihara, K. (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(4): 891-898.
- Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K. (2004). "Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity". *J Cell Sci* 117(Pt 26): 6535-6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K. (2006). "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1". *EMBO J* 25(13): 2966-2977.

## J

- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. and Garlid, K.D. (1999). "Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3". *J Biol Chem* 274(37): 26003-26007.
- Jaburek, M. and Garlid, K.D. (2003). "Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10". *J Biol Chem* 278(28): 25825-25831.
- Jaburek, M., Costa, A.D., Burton, J.R., Costa, C.L. and Garlid, K.D. (2006). "Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes". *Circ Res* 99(8): 878-883.
- Jackman, M.R. and Willis, W.T. (1996). "Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle". *Am J Physiol* 270(2Pt1): C673-678.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B. and Hell, S.W. (2003). "Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p". *J Cell Sci* 116(Pt 10): 2005-2014.
- James, A.M., Wei, Y.H., Pang, C.Y. and Murphy, M.P. (1996). "Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations". *Biochem J* 318 (Pt 2): 401-407.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y. and Martinou, J.C. (2003). "hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery". *J Biol Chem* 278(38): 36373-36379.
- Jang, J.Y. and Lee, C.E. (2006). "IL-4-induced upregulation of adenine nucleotide translocase 3 and its role in Th cell survival from apoptosis". *Cell Immunol* 241(1): 14-25.
- Jezek, P., Orosz, D.E., Modriansky, M. and Garlid, K.D. (1994). "Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses". *J Biol Chem* 269(42): 26184-26190.

## K

- Kadenbach, B. (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation". *Biochim Biophys Acta* 1604(2): 77-94.
- Karbowska, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2002). "Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis". *J Cell Biol* 159(6): 931-938.
- Karbowska, M. and Youle, R.J. (2003). "Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis". *Cell Death Differ* 10(8): 870-880.

- Karbowski, M., Jeong, S.Y. and Youle, R.J. (2004). "Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology". *J Cell Biol* 166(7): 1027-1039.
- Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.Y. and Youle, R.J. (2006). "Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis". *Nature* 443(7112): 658-662.
- Karbowski, M., Neutzner, A. and Youle, R.J. (2007). "The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division". *J Cell Biol* 178(1): 71-84.
- Kennedy, E.P. and Lehninger, A.L. (1948). "Intracellular structures and the fatty acid oxidase system of rat liver". *J Biol Chem* 172(2): 847.
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y. and Hayasaka, K. (2005). "Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A". *Hum Genet* 116(1-2): 23-27.
- Kim, J.Y., Hwang, J.M., Ko, H.S., Seong, M.W., Park, B.J., Park, S.S. (2005). "Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy". *Neurology* 64(6): 966-972.
- Kim, M.Y., Kim, M.J., Yoon, I.S., Ahn, J.H., Lee, S.H., Baik, E.J., Moon, C.H. and Jung, Y.S. (2006). "Diazoxide acts more as a PKC-epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial K(ATP) channel conferring cardioprotection against hypoxic injury". *Br J Pharmacol* 149(8): 1059-1070.
- Kirby, D.M., Crawford, M., Cleary, M.A., Dahl, H.H., Dennett, X. and Thorburn, D.R. (1999). "Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder". *Neurology* 52(6): 1255-1264.
- Kis, B., Rajapakse, N.C., Snipes, J.A., Nagy, K., Horiguchi, T., Busija, D.W. (2003) "Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons". *J Neurochem* 87(4): 969-980.
- Kjer, P. (1959). "Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families". *Acta Ophthalmol Scand* 37(Suppl. 54): 1-146.
- Kline, L.B. and Glaser, J.S. (1979). "Dominant optic atrophy. The clinical profile". *Arch Ophthalmol* 97(9): 1680-1686.
- Klingenberg, M. (1999). "Uncoupling protein--a useful energy dissipator". *J Bioenerg Biomembr* 31(5): 419-430.
- Kölliker, A. (1857). "Einige Bemerkungen über die Endigungen der Hautnerven und deu Bau der Muskelzellen". *Z Wiss Zool* 8: 311-325.
- Konigsmark, B.W., Knox, D.L., Hussels, I.E. and Moses, H. (1974). "Dominant congenital deafness and progressive optic nerve atrophy. Occurrence in four generations of a family". *Arch Ophthalmol* 91(2): 99-103.
- Koopman, W.J., Visch, H.J., Verkaart, S., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A. and Willems P.H. (2005). "Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are

- tightly correlated in isolated human complex I deficiency". *Am J Physiol Cell Physiol* 289(4): C881–890.
- Kopustinskiene, D.M., Toleikis, A. and Saris, N.E. (2003). "Adenine nucleotide translocase mediates the K(ATP)-channel-openers-induced proton and potassium flux to the mitochondrial matrix". *J Bioenerg Biomembr* 35(2): 141-148.
- Korvald, C., Elvenes, O.P. and Myrnes, T. (2000). "Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(4): H1345-1351.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M. and Chan, D.C. (2004). "Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes". *Science* 305(5685): 858-862.
- Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P. and Garlid, K.D. (2001). "Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(2): H649-657.
- Kozak, S.F., Inderlied, C.B., Hsu, H.Y., Heller, K.B. and Sadun, A.A. (1998). "The role of copper on ethambutol's antimicrobial action and implications for ethambutol-induced optic neuropathy". *Diagn Microbiol Infect Dis* 30(2): 83-87.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S. and Dencher, N.A. (2005). "Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun* 329(2): 583-590.
- Krebs, H. and Johnson, W.A. (1937). "The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues." *Enzymologia* 4:148–156.
- Krebs, H.A., and Holzach, O. (1952). "The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase". *Biochem J* 52(3): 527-528
- Kroon, A.M. and Van den Bogert, C. (1983). "Antibacterial drugs and their interference with the biogenesis of mitochondria in animal and human cells". *Pharm Weekbl Sci* 5(3): 81-87.
- Kuznetsova, S.S., Azarkina, N.V., Vygodina, T.V., Siletsky, S.A. and Konstantinov, A.A. (2005). "Zinc ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action". *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 128-136.

## *L*

- Lacza, Z., Snipes, J.A., Kis, B., Szabó, C., Grover, G. and Busija, D.W. (2003a). "Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain". *Brain Res* 994(1): 27-36.
- Lacza, Z., Snipes, J.A., Miller, A.W., Szabó, C., Grover, G. and Busija, D.W. (2003b). "Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels". *J Mol Cell Cardiol* 35(11): 1339-1347.

- LaNoue, K.F. and Schoolwerth, A.C. (1979). "Metabolite transport in mitochondria". *Annu Rev Biochem* 48:871-922.
- Lardy, H.A., Johnson, D. and McMurray. (1958). "Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems". *Arch Biochem Biophys* 78(2): 587-597.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2004). "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis". *Mol Biol Cell* 15(11): 5001-5011.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. and Kirchhausen, T. (2003). "Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission". *Mol Biol Cell* 14(5): 1953-1963.
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P. and Rojo, M. (2002). "Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins". *Mol Biol Cell* 13(12): 4343-4354.
- Lessell, S. (1976). "Histopathology of experimental ethambutol intoxication". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15(9): 765-769.
- Leverve, X.M. (2007). "Mitochondrial function and substrate availability". *Crit Care Med* 35(9 Suppl): S454-460.
- Leverve, X., Batandier, C. and Fontaine, E. (2007). "Choosing the right substrate". *Novartis Found Symp* 280:108-127.
- Liesa, M., Borda-d'Agua, B., Medina-Gómez, G., Lelliott, C.J., Paz, J.C., Rojo, M., Palacín, M., Vidal-Puig, A. and Zorzano, A. (2008). "Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta". *PLoS ONE* 3(10): e3613.
- Ligon, L.A., Tokito, M., Finklestein, J.M., Grossman, F.E. and Holzbaur, E.L. (2004). "A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity". *J Biol Chem* 279(18): 19201-19208.
- Lim, L., Manser, E., Leung, T. and Hall, C. (1996). "Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways". *Eur J Biochem* 242(2): 171-185.
- Lim, K.H., Javadov, S.A., Das, M., Clarke, S.J., Suleiman, M.S. and Halestrap, A.P. (2002) "The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration". *J Physiol* 545(Pt 3): 961-974.
- Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. and Marban, E. (1998). "Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?". *Circulation* 97(24): 2463-2469.
- Liu, G.S., Cohen, M.V., Mochly-Rosen, D. and Downey, J.M. (1999a). "Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol* 31(10): 1937-1948

- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T. and Tsuji, S. (1999b). "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene". *J Neurochem* 72(5): 1781-1790.
- Liu, D., Slevin, J.R., Lu, C., Chan, S.L., Hansson, M., Elmér, E., Mattson, M.P. (2003) "Involvement of mitochondrial K<sup>+</sup> release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death". *J Neurochem* 86(4): 966-979
- Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Iotti, S., Clementi, V., Malucelli, E., Barboni, P., Longanesi, L., Schimpf, S., Wissinger, B., Baruzzi, A., Barbiroli, B. and Carelli, V. (2004). "Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy". *Ann Neurol* 56(5): 719-723.
- Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M.A., Ferré, M., Malinge, M.C., Guichet, A., Nicolas, G., Amati-Bonneau, P., Malthiery, Y., Bonneau, D. and Reynier, P. (2007). "Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease". *Ann Neurol* 61(4): 315-323.
- Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Zommer, A.E., Hilger, S., Kelsey, N.A., Bouchard, R.J., Blackstone, C., Brewster, J.L. and Linseman, D.A. (2009). "Caspases indirectly regulate cleavage of the mitochondrial fusion GTPase OPA1 in neurons undergoing apoptosis". *Brain Res* 1250: 63-74.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L. and Afzelius, B. (1962). "A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study". *J Clin Invest* 41: 1776-1804.
- Lyle, W.M. (1990). "Genetic Risks". Waterloo, Ontario: Univ. Of Waterloo Press.

## *M*

- Malaiyandi, L.M., Honick, A.S., Rintoul, G.L., Wang, Q.J., Reynolds, I.J. (2005). "Zn<sup>2+</sup> inhibits mitochondrial movement in neurons by phosphatidylinositol 3-kinase activation". *J Neurosci* 25(41): 9507-9514.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A. and Rojo, M. (2005). "Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes". *EMBO Rep* 6(9): 853-859.
- Man, P.Y., Turnbull, D.M. and Chinnery, P.F. (2002). "Leber hereditary optic neuropathy". *J Med Genet* 39(3): 162-169.

- Man, P.Y., Griffiths, P.G., Brown, D.T., Howell, N., Turnbull, D.M. and Chinnery, P.F. (2003). "The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England". *Am J Hum Genet* 72(2): 333-339.
- Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, I.I., Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K. and Marko, M. (2001). "Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications". *IUBMB Life* 52(3-5): 93-100.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 542-548.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H. and Pan, G. (1999). "UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells". *FEBS Lett* 443(3): 326-330.
- Marchbank, N.J., Craig, J.E., Leek, J.P., Toohey, M., Churchill, A.J., Markham, A.F., Mackey, D.A., Toomes, C. and Inglehearn, C.F. (2002). "Deletion of the OPA1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease". *J Med Genet* 39(8): e47.
- Margulis, L. (1981). "Symbiosis in cell evolution". New York: W.H. Freeman, 1993. 452 p.
- Mayorov, V.I., Lowrey, A.J., Biousse, V., Newman, N.J., Cline, S.D. and Brown, M.D. (2008). "Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy". *BMC Biochem* 9: 22.
- McCormack, J.G. and Denton, R.M. (1993). "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism". *Dev Neurosci* 15(3-5): 165-173.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. and Nunnari, J. (2004). "Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro". *Science* 305(5691): 1747-1752.
- Meijer, A.J. and Van Dam, K. (1974). "The metabolic significance of anion transport in mitochondria". *Biochim Biophys Acta* 346(3-4): 213-244.
- Meire, F., De Laey, J.J., de Bie, S., van Staey, M. and Matton, M.T. (1985). "Dominant optic nerve atrophy with progressive hearing loss and chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)". *Ophthalmic Paediatr Genet* 5(1-2): 91-97.
- Mets, M.B. and Mhoon, E. (1985). "Probable autosomal dominant optic atrophy with hearing loss". *Ophthalmic Paediatr Genet* 5(1-2): 85-89.
- Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H. and Seino, S. (2002). "Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1". *Nat Med* 8(5): 466-472.
- Miller, K.E. and Sheetz, M.P. (2004). "Axonal mitochondrial transport and potential are correlated". *J Cell Sci* 117(Pt13): 2791-2804.



- Minners, J., Lacerda, L., Yellon, D.M., Opie, L.H., McLeod, C.J., Sack, M.N. (2007) "Diazoxide-induced respiratory inhibition - a putative mitochondrial K(ATP) channel independent mechanism of pharmacological preconditioning". *Mol. Cell Biochem.* 294(1-2): 11-18.
- Misaka, T., Murate, M., Fujimoto, K. and Kubo, Y. (2006). "The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells". *Neurosci Res* 55(2): 123-133.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." *Nature* 191: 144-148.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M. and Shaw, J.M. (2000). "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p". *J Cell Biol* 151(2): 367-380.
- Munch-Ellingsen, J., Løkebø, J.E., Bugge, E., Jonassen, A.K., Ravingerová, T. and Ytrehus, K. (2000). "5-HD abolishes ischemic preconditioning independently of monophasic action potential duration in the heart". *Basic Res Cardiol* 95(3): 228-34.
- Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B. and Marbán, E. (2001). "Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection". *Circ Res* 89(10): 891-898.
- Murphy, M.P. and Brand, M.D. (1987). "Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain". *Nature* 329(6135): 170-172.

## N

- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S. and Hirose, S. (2006). "MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology". *EMBO Rep* 7(10): 1019-1022.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. and Hirokawa, N. (1994). "KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria". *Cell* 79(7): 1209-1220.
- Naviaux, R.K. (2004). "Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease". *Mitochondrion* 4(5-6): 351-361.
- Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L. and Casteilla, L. (1997). "A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation". *FASEB J* 11(10): 809-815.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M. and Finkel, T. (2005). "SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}". *J Biol Chem* 280(16): 16456 -16460.

- Neusch, C., Senderek, J., Eggermann, T., Elloff, E., Bähr, M. and Schneider-Gold, C. (2007). "Mitofusin 2 gene mutation (R94Q) causing severe early-onset axonal polyneuropathy (CMT2A)". *Eur J Neurol* 14(5): 575-577.
- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. and McBride, H. (2005). "Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization". *J Biol Chem* 280(26): 25060-25070.
- Newman, N.J. (2002). "From genotype to phenotype in Leber hereditary optic neuropathy: still more questions than answers". *J Neuroophthalmol* 22(4): 257-261.
- Newton, B.A. (1965). "Mechanisms of antibiotic action". *Annu Rev Microbiol* 19: 209-240.
- Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat". *Physiol Rev* 64(1): 1-64.
- Nicholson, G.A., Magdelaine, C., Zhu, D., Grew, S., Ryan, M.M., Sturtz, F., Vallat, M. and Ouvrier, R.A. (2008). "Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations". *Neurology* 70(19): 1678-1681.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U. (2005). "Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease". *J Cell Biol* 170(7): 1067-1078.
- Nikoskelainen, E.K., Marttila, R.J., Huoponen, K., Juvonen, V., Lamminen, T., Sonninen, P. and Savontaus, M.L. (1995). "Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy". *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59(2): 160-164.
- Nochez, Y., Arsene, S., Gueguen, N., Chevrollier, A., Ferré, M., Guillet, V., Desquirit, V., Toutain, A., Bonneau, D., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Pisella, P.J. and Reynier, P. (2009). "Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect". *Mol Vis* 15: 598-608.
- Nogueira, V., Rigoulet, M., Piquet, M.A., Devin, A., Fontaine, E. and Leverve, X.M. (2001). "Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand". *J Biol Chem* 276(49): 46104-46110.
- Noma, A. (1983). "ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle". *Nature* 305(5930): 147-148.



- Ockaili, R.A., Bhargava, P. and Kukreja, R.C. (2001). "Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in hearts: role of mitochondrial K(ATP) channel". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5): H2406-2411.
- Okun, J.G., Hörster, F., Farkas, L.M., Feyh, P., Hinz, A., Sauer, S., Hoffmann, G.F., Unsicker, K., Mayatepek, E. and Kölker, S. (2002). "Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves

- inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity". *J Biol Chem* 277(17): 14674-14680.
- Oldenburg, O., Yang, X.M., Krieg, T., Garlid, K.D., Cohen, M.V., Grover, G.J. and Downey, J.M. (2003). "P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts". *J Mol Cell Cardiol* 35(9): 1035-1042.
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X.M., Philipp, S., Critz, S.D., Cohen, M.V. and Downey, J.M. (2004). "Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1): H468-476.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G. and Belenguer, P. (2002). "The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space". *FEBS Lett* 523(1-3): 171-176.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2003). "Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome *c* release and apoptosis". *J Biol Chem* 278(10): 7743-7746.
- Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2007a). "OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis". *Cell Death Differ* 14(4): 682-692.
- Olichon, A., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G. and Belenguer, P. (2007b). "Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis". *J Cell Physiol* 211(2): 423-430.
- Oostra, R.J., Van Galen, M.J., Bolhuis, P.A., Bleeker-Wagemakers, E.M. and Van den Bogert, C. (1995). "The mitochondrial DNA mutation ND6\*14,484C associated with leber hereditary optic neuropathy, leads to deficiency of complex I of the respiratory chain". *Biochem Biophys Res Commun* 215(3): 1001-1005.

## *P*

- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R.C. and Kummer, W. (2003). "Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(5): L710-719.

- Pain, T., Yang, X.M., Critz, S.D., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G.S., Heusch, G., Cohen, M.V. and Downey, J.M. (2000). "Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals". *Circ Res* 87(6): 460-466.
- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. and Minuto, M. (1991). "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry". *FEBS Lett* 288(1-2): 183-186.
- Pasdois, P., Beauvoit, B., Tariosse, L., Vinassa, B., Bonoron-Adèle, S., Santos, P.D. (2006) "MitoK(ATP)-dependent changes in mitochondrial volume and in complex II activity during ischemic and pharmacological preconditioning of Langendorff-perfused rat heart". *J Bioenerg Biomembr* 38(2): 101-112.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology". *Embo J* 21(3): 221-230.
- Pecqueur, C., Couplan, E., Bouillaud F. and Ricquier, D. (2001). "Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis". *J Mol Med* 79(1): 48-56.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E. Pa and lau, F. (2005). "GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria". *Hum Mol Genet* 14(8): 1087-1094.
- Pesch, U.E., Leo-Kottler, B., Mayer, S., Jurklies, B., Kellner, U., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Alexander, C. and Wissinger, B. (2001). "OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance". *Hum Mol Genet* 10(13): 1359-1368.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M. and Zorzano, A. (2005). "The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system". *Hum Mol Genet* 14(11): 1405-1415.
- Pommer, R., Schoeler, S., Mawrin, C., Szibor, R. and Kirches, E. (2008). "The G11778A LHON mutation does not enhance ethambutol cytotoxicity in a cybrid model". *Clin Neuropathol* 27(6): 414-423.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J. and Pallanck, L.J. (2008). "The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5): 1638-1643.
- Porter, R.K. and Brand, M.D. (1995). "Causes of differences in respiration rate of hepatocytes from mammals of different body mass". *Am J Physiol* 269(5Pt2): R1213-1224.
- Porter, R.K., Hulbert, A.J. and Brand, M.D. (1996). "Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition". *Am J Physiol* 271(6Pt2): R1550-1560.
- Pressman, B.C. (1968). "Ionophorous antibiotics as models for biological transport". *Fed Proc* 27(6): 1283-1288.

Puomila, A., Huoponen, K., Mäntyjärvi, M., Hämäläinen, P., Paananen, R., Sankila, E.M., Savontaus, M.L., Somer, M. and Nikoskelainen, E. (2005). "Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies". *Acta Ophthalmol Scand* 83(3): 337-346.

## Q

Qi, X., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W. and Guy, J. (2003). "Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(3): 1088-1096.

## R

Ragan, C.I. and Heron, C. (1978). "The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association". *Biochem J* 174(3): 783-790.

Raval, A.P., Dave, K.R., DeFazio, R.A. and Perez-Pinzon, M.A. (2007). "epsilonPKC phosphorylates the mitochondrial K(+) (ATP) channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus". *Brain Res* 1184: 345-53

Reed, P.W. and Lardy, H.A. (1975). "Uncoupling and specific inhibition of phosphoryl transfer reactions in mitochondria by antibiotic A20668". *J Biol Chem* 250(10): 3704-3708.

Reynier, P., Amati-Bonneau, P., Verny, C., Olichon, A., Simard, G., Guichet, A., Bonnemains, C., Malecaze, F., Malinge, M.C., Pelletier, J.B., Calvas, P., Dollfus, H., Belenguer, P., Malthiery, Y., Lenaers, G. and Bonneau, D. (2004). "OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract". *J Med Genet* 41(9): e110.

Rial, E., Aguirregoitia, E., Jiménez-Jiménez, J. and Ledesma, A. (2004). "Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism". *Biochim Biophys Acta* 1608(2-3): 122-130.

Rice, S.E. and Gelfand, V.I. (2006). "Paradigm lost: milton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria". *J Cell Biol* 173(4): 459-461.

Rigoulet, M., Fraisse, L., Ouhabi, R., Guérin, B., Fontaine, E. and Leverve, X. (1990). "Flux-dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase/ATP synthase induced by almitrine". *Biochim Biophys Acta* 1018(1): 91-97.

Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R. and Guérin, B. (1998). "Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces". *Mol Cell Biochem* 184(1-2): 35-52.

- Rojo, M., Legros, F., Château, D. and Lombès, A. (2002). "Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo". *J Cell Sci* 115(Pt 8): 1663-1674.
- Rorsman, P. and Trube, G. (1985). "Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP". *Pflugers Arch* 405(4): 305-309.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J. and Capaldi, R.A. (2004). "Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells". *Cancer Res* 64(3): 985-993.
- Roth, S., Dreixler, J.C., Shaikh, A.R., Lee, K.H., Bindokas, V. (2006). "Mitochondrial potassium ATP channels and retinal ischemic preconditioning". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(5): 2114-2124.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P. (1997). "Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia". *Nat Genet* 17(2): 215-217.
- Roussel, D., Harding, M., Runswick, M.J., Walker, J.E. and Brand, M.D. (2002). "Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function?". *J Bioenerg Biomembr* 34(3): 165-176.
- Rustin, P. and Rötig, A. (2002). "Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases". *Biochim Biophys Acta* 1553(1-2): 117-122.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., LeBidois, J., Sidi, D., Rötig, A. and Munnich, A. (1993). "Investigation of respiratory chain activity in human heart". *Biochem Med Metab Biol* 50(1): 120-126.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M. and Munnich, A. (1994). "Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies". *Clin Chim Acta* 228(1): 35-51.
- Rustin, P., Munnich, A. and Rötig A. (2002). "Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme". *Eur J Hum Genet* 10(5): 289-291.

## S

- Saddar, S., Dienhart, M.K. and Stuart, R.A. (2008). "The F1F0-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome *bcl*-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery". *J Biol Chem* 283(11): 6677-6686.
- Sadun, A.A. and Wang, M.Y. (2008). "Ethambutol optic neuropathy: how we can prevent 100,000 new cases of blindness each year". *J Neuroophthalmol* 28(4): 265-268.

- Samartsev, V.N., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (1997a). "The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling". FEBS Lett 412(1): 179-182.
- Samartsev, V.N., Smirnov, A.V., Zeldi, I.P., Markova, O.V., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (1997b). "Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria". Biochim Biophys Acta 1319(2-3): 251-257.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. and Futai, M. (1999). "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (FOF1): direct observation". Science 286(5445): 1722-1724.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubert, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (1998). "BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast". J Biol Chem 273(51): 34611-34615.
- Santel, A. and Fuller, M.T. (2001). "Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin". J Cell Sci 114(Pt 5): 867-874.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J. and Fuller, M.T. (2003). "Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells". J Cell Sci 116(Pt 13): 2763-2774.
- Schäfer, G., Wegener, C., Portenhauser, R. and Bojanovski, D. (1969). "Diazoxide, an inhibitor of succinate oxidation". Biochem Pharmacol 18(10): 2678-2681.
- Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. and Vonck, J. (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes". J Biol Chem 281(22): 15370-15375.
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria". EMBO J 19(8): 1777-1783.
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. and Brandt, U. (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I". J. Biol. Chem. 279(35): 36349-36353.
- Schimpf, S., Fuhrmann, N., Schaich, S. and Wissinger, B. (2008). "Comprehensive cDNA study and quantitative transcript analysis of mutant OPA1 transcripts containing premature termination codons". Hum Mutat 29(1): 106-112.
- Schon, E.A. and Manfredi, G. (2003). "Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction". J Clin Invest 111(3): 303-312.

- Seharaseyon, J., Sasaki, N., Ohler, A., Sato, T., Fraser, H., Johns, D.C., O'Rourke, B. and Marbán, E. (2000). "Evidence against functional heteromultimerization of the KATP channel subunits Kir6.1 and Kir6.2". *J Biol Chem* 275(23): 17561-17565.
- Shabalina, I.G., Kramarova, T.V., Nedergaard, J. and Cannon, B. (2006). "Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively". *Biochem J* 399(3): 405-414.
- Shepherd, R.G., Baughn, C., Cantrall, M.L., Goodstein, B., Thomas, J.P. and Wilkinson, R.G. (1966). "Structure-activity studies leading to ethambutol, a new type of antituberculous compound". *Ann N Y Acad Sci* 135: 686-710.
- Shimizu, S., Mori, N., Kishi, M., Sugata, H., Tsuda, A. and Kubota, N. (2003). "A novel mutation in the OPA1 gene in a Japanese patient with optic atrophy". *Am J Ophthalmol* 135(2): 256-257.
- Sibille, B., Filippi, C., Piquet, M.A., Leclercq, P., Fontaine, E., Ronot, X., Rigoulet, M. and Leverve, X. (2001). "The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate". *Biochem J* 355(Pt 1): 231-235.
- Singh, H., Hudman, D., Lawrence, C.L., Rainbow, R.D., Lodwick, D. and Norman, R.I. (2003). "Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes". *J Mol Cell Cardiol* 35(5): 445-459.
- Skre, H. (1974). "Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease". *Clin Genet* 6(2): 98-118.
- Skulachev, V.P. (1991). "Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation". *FEBS Lett* 294(3): 158-162.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Newman-Smith, E.D., Pishvae, B. and Van der Blik, A.M. (1999). "A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains". *J Biol Chem* 274(21): 14942-14947.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. and Van der Blik, A.M. (2001). "Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells". *Mol Biol Cell* 12(8): 2245-2256.
- Solecki, T.J., Aviv, A. and Bogden, J.D. (1984). "Effect of a chelating drug on balance and tissue distribution of four essential metals". *Toxicology* 31(3-4): 207-216.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. and Chan, D.C. (2007). "OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L". *J Cell Biol* 178(5):749-755.
- Soriano, F.X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D.C., Palacín, M. and Zorzano, A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma



- coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* 55(6): 1783-1791.
- Spinazzi, M., Cazzola, S., Bortolozzi, M., Baracca, A., Loro, E., Casarin, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Casalena, G., Cenacchi, G., Malena, A., Frezza, C., Carrara, F., Angelini, C., Scorrano, L., Salviati, L. and Vergani, L. (2008). "A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function". *Hum Mol Genet* 17(21): 3291-302.
- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. and Nelson, M.T. (1989). "Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle". *Science* 245(4914): 177-180.
- Starkov, A.A. (2006). "Protein-mediated energy-dissipating pathways in mitochondria". *Chem Biol Interact* 161(1): 57-68.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A. and Wallace, D.C. (1992). "Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation". *J Biol Chem* 267(21): 14592-14597.
- Stojkovic, T., Latour, P., Viet, G., de Seze, J., Hurtevent, J. F., Vandenberghe, A. and Vermersch P. (2004). "Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene." *Neuromuscul Disord* 14(4): 261-4.
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Jekabsons, M.B. and Brand, M.D. (2001). "Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria". *J Biol Chem* 276(21): 18633-18639.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (2000). "Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos". *Biol Reprod* 63(2): 582-590.
- Suzuki, M., Kotake, K., Fujikura, K., Inagaki, N., Suzuki, T., Gono, T., Seino, S. and Takata, K. (1997). "Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun* 241(3): 693-697.
- Szewczyk, A., Wójcik, G. and Nałecz, M.J. (1995). "Potassium channel opener, RP 66471, induces membrane depolarization of rat liver mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun* 207(1): 126-132.
- Szigeti, K. and Lupski, J.R. (2009). "Charcot-Marie-Tooth disease". *Eur J Hum Genet* 17(6): 703-10.

## T

- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. and Mihara, K. (2007). "Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission". *J Biol Chem* 282(15): 11521-11529.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. and Hirokawa, N. (1998). "Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria". *Cell* 93(7): 1147-1158.
- Tieu, Q. and Nunnari, J. (2000). "Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division". *J Cell Biol* 151(2): 353-366.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. and Santel, A. (2005). "The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells". *J Cell Sci* 118(Pt 14): 3049-3059.
- Tooth, H.H. (1886). "Peroneal type of progressive muscular atrophy". HK Lewis & Co Ltd, London.
- Trimmer, P.A., Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Keeney, P., Bennett, J.P. Jr, Miller, S.W., Davis, R.E. and Parker, W.D. Jr. (2000). "Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines". *Exp Neurol* 162(1): 37-50.

## V

- Vallat, J.M., Ouvrier, R.A., Pollard, J.D., Magdelaine, C., Zhu, D., Nicholson, G.A., Grew, S., Ryan, M.M. and Funalot, B. (2008). "Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations". *J Neuropathol Exp Neurol* 67(11): 1097-1102.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J. and Rutter, G.A. (2004). "Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1". *J Cell Sci* 117(Pt 19): 4389-4400.
- Verhoeven, K., Claeys, K.G., Zuchner, S., Schroder, J.M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., Seeman, P., Mazanec, R., Saifi, G.M., Szigeti, K., Mancias, P., Butler, I.J., Kochanski, A., Ryniewicz, B., De Bleecker, J., Van den Bergh, P., Verellen, C., Van Coster, R., Goemans, N., Auer-Grumbach, M., Robberecht, W., Milic Rasic, V., Nevo, Y., Tournev, I., Guerguelcheva, V., Roelens, F., Vieregge, P., Vinci, P., Moreno, M.T., Christen, H.J., Shy, M.E., Lupski, J.R., Vance, J.M., De Jonghe, P. and Timmerman, V. (2006). "MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2." *Brain* 129(Pt 8): 2093-102.

- Verny, C., Loiseau, D., Scherer, C., Lejeune, P., Chevrollier, A., Gueguen, N., Guillet, V., Dubas, F., Reynier, P., Amati-Bonneau, P. and Bonneau, D. (2008). "Multiple sclerosis-like disorder in OPA1-related autosomal dominant optic atrophy". *Neurology* 70(13 Pt 2): 1152-1153.
- Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M. and Lowell, B.B. (2000). "Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice". *J Biol Chem* 275(21): 16258-16266.
- Villani, G., Greco, M., Papa, S. and Attardi, G. (1998). "Low reserve of cytochrome *c* oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types". *J Biol Chem* 273(48): 31829-31836.
- Votruba, M., Moore, A.T. and Bhattacharya, S.S. (1998). "Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy". *J Med Genet* 35(10): 793-800.

## W

- Wagner, K.M., Rüegg, M., Niemann, A. and Suter, U. (2009). "Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAPI are dependent on its tail-anchor". *PLoS ONE* 4(4): e5160.
- Wakahara, N., Katoh, H., Yaguchi, Y., Uehara, A., Satoh, H., Terada, H., Fujise, Y. and Hayashi, H. (2004). "Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts". *Circ J* 68(2): 156-162.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J. 2<sup>nd</sup> and Nikoskelainen, E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242(4884): 1427-1430.
- Wang, H. and Oster, G. (1998). "Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase". *Nature* 396(6708): 279-282.
- Wang, Y., Hirai, K. and Ashraf, M. (1999). "Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity". *Circ Res* 85(8): 731-741.
- Wang, L., Cherednichenko, G., Hernandez, L., Halow, J., Camacho, S.A., Figueredo, V. and Schaefer, S. (2001). "Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5): H2321-2328.
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G. and Zhu, X. (2008). "Amyloid beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins". *Proc Natl Acad Sci USA* 105(49): 19318-19323.
- Wasiak, S., Zunino, R. and McBride, H.M. (2007). "Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death". *J Cell Biol* 177(3): 439-450.

- Waterham, H.R., Koster, J., Van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J. and Leonard, J.V. (2007). "A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission". *N Engl J Med* 356(17): 1736-1741.
- Wieckowski, M.R., Szabadkai, G., Wasilewski, M., Pinton, P., Duszyński, J. and Rizzuto, R. (2006). "Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca<sup>2+</sup> signal transmission between the ER and mitochondria". *Biochem Biophys Res Commun* 348(2): 393-399.
- Wittig, I. and Schägger, H. (2005). "Advantages and limitations of clear-native PAGE". *Proteomics* 5(17):4338-46.
- Wojtczak, L. and Wieckowski, M.R. (1999). "The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane". *J Bioenerg Biomembr* 31(5): 447-455.
- Wojtovich, A.P. and Brookes, P.S. (2008) "The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning". *Biochim. Biophys. Acta.* 1777(7-8): 882-889.
- Wojtovich, A.P. and Brookes, P.S. (2009) "The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels". *Basic Res. Cardiol.* 104(2): 121-129.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Nunnari, J. (2000). "The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria". *J Cell Biol* 151(2): 341-352.
- Wozniak, M.J., Melzer, M., Dorner, C., Haring, H.U. and Lammers, R. (2005). "The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein". *BMC Cell Biol* 6:35.

## Y

- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H. and Newmeyer, D.D. (2008). "Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization". *Mol Cell* 31(4): 557-569.
- Yang, Y., Ouyang, Y., Ynag, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H. and Lu, B. (2008). "Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery". *Proc Natl Acad Sci USA* 105(19): 7070-7075.
- Yen, M.Y., Kao, S.H., Wang, A.G. and Wei, Y.H. (2004). "Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA in Leber's hereditary optic neuropathy". *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(6): 1688-1691.

- Yi, M., Weaver, D. and Hajnóczky, G. (2004). "Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit". *J Cell Biol* 167(4): 661-672.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R. and Yanagi, S. (2006). "A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics". *EMBO J* 25(15): 3618-3626.
- Yoon, Y.H., Jung, K.H., Sadun, A.A., Shin, H.C. and Koh, J.Y. (2000). "Ethambutol-induced vacuolar changes and neuronal loss in rat retinal cell culture: mediation by endogenous zinc". *Toxicol Appl Pharmacol* 162(2): 107-114.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J. and McNiven, M.A. (2003). "The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1". *Mol Cell Biol* 23(15): 5409-5420.
- Youle, R.J. and Karbowski, M. (2005). "Mitochondrial fission in apoptosis". *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 657-663.
- Yu, D.Y. and Cringle, S.J. (2001). "Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease". *Prog Retin Eye Res* 20(2): 175-208.

## Z

- Zamora, M., Granell, M., Mampel, T. and Viñas, O. (2004). "Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells". *FEBS Lett* 563(1-3): 155-160.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Martinuzzi, A., Carelli, V. and Rugolo, M. (2005). "Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G". *Apoptosis* 10(5): 997-1007.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., Valentino, M.L., Rugolo, M. and Carelli, V. (2008). "OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion". *Brain* 131(Pt 2): 352-367.
- Zeviani, M. (2008). "OPA1 mutations and mitochondrial DNA damage: keeping the magic circle in shape". *Brain* 131(Pt 2): 314-317.
- Zhang, C.Y., Hagen, T., Mootha, V.K., Sliker, L.J. and Lowell, B.B. (1999). "Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system". *FEBS Lett* 449(2-3): 129-134.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2002). "Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane". *J Biol Chem* 277(46): 43553-43556.

- Zhang, L., Ging, N.C., Komoda, T., Hanada, T., Suzuki, T. and Watanabe, K. (2005a). "Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation". *FEBS Lett* 579(28): 6423-6427.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2005b). "Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria". *J Biol Chem* 280(33): 29403-29408
- Zhang, X., Chow, C.Y., Sahenk, Z., Shy, M.E., Meisler, M.H. and Li, J. (2008). "Mutation of FIG4 causes a rapidly progressive, asymmetric neuronal degeneration". *Brain* 131(Pt 8): 1990-2001.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y. and Hirokawa, N. (2001). "Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta". *Cell* 105(5): 587-597.
- Zhou, M., Tanaka, O., Sekiguchi, M., Sakabe, K., Anzai, M., Izumida, I., Inoue, T., Kawahara, K. and Abe, H. (1999). "Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uK(ATP)-1) in rat brain". *Brain Res Mol Brain Res* 74(1-2): 15-25.
- Zhou, S., Starkov, A., Froberg, M.K., Leino, R.L., Wallace, K.B. (2001). "Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin". *Cancer Res* 61(2): 771-777.
- Zhuo, M.L., Huang, Y., Liu, D.P. and Liang, C.C. (2005). "KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system". *Int J Biochem Cell Biol* 37(4): 751-764.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. and Vance, J.M. (2004). "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A". *Nat Genet* 36(5): 449-451.
- Züchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., Tournev, I., Verhoeven, K., Langerhorst, C.T., de Visser, M., Baas, F., Bird, T., Timmerman, V., Shy, M. and Vance, J.M. (2006). "Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2". *Ann Neurol* 59(2): 276-281.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M. and McBride, H.M. (2007). "The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function". *J Cell Sci* 120(Pt 7): 1178-1188.
- Zunino, R., Braschi, E., Xu, L. and McBride, H.M. (2009). "Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1 dependent fission during mitosis". *J Biol Chem* [Epub ahead of print].

FICHES  
TECHNIQUES

## Fiche Technique n° 1 :

### Culture primaire de fibroblastes cutanés

#### Milieux et réactifs :

- DMEM-F12 (*Institut de biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France*)
- SVF (*Institut de biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France*)
- Amniomax® (*Gibco, New York, USA*)
- Trypsine-EDTA (*Gibco, New York, USA*)
- PBS (*Eurobio, Paris, France*)

#### Culture des Fibroblastes :

Après la biopsie cutanée et la mise en culture des explants, les fibroblastes cutanés sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu constitué de <sup>2</sup>/<sub>3</sub> de DMEM-F12 - 10% de SVF et 1/3 d'Amniomax®. Ce milieu permet d'obtenir une prolifération cellulaire importante tout en conservant les caractéristiques morphologiques (+/- fusiformes) des cellules fibroblastiques. Les cellules issues des premiers passages sont congelées afin de constituer un échantillonnage des cellules de patients et de les préserver de l'adaptation aux conditions de culture favorisant un métabolisme essentiellement glycolytique. Chaque passage est réalisé en repiquant <sup>1</sup>/<sub>2</sub> de la boîte initiale afin de conserver un rapport constant du nombre de division cellulaire par nombre de passage entre patients et témoins.

#### Récolte des cellules :

Les conditions fixées pour la récolte correspondent à une culture fibroblastique arrivée à confluence +/- 24 heures. Les cellules sont lavées par du tampon phosphate sans calcium ni magnésium (PBS) puis décollées de leur support par de la trypsine 0,25 %-EDTA 0,02 %. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS - 5% SVF puis centrifugées 5 minutes à 900 rpm.



## Fiche technique n° 2 :

### Dosage des protéines par spectrophotométrie

Ce dosage est un dosage colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique d'après Lowry *et al.* (1951). Il est réalisé à l'aide du kit BC Assay® (*Interchim, Montluçon, France*).

Le principe du dosage repose sur le fait qu'en milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  en ions cuivreux  $\text{Cu}^{+}$ . Les ions cuivreux et l'acide bicinchoninique vont alors former un complexe soluble coloré en violet. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique qui est calculée à l'aide d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA).

#### Réactifs :

- Solution d'acide bicinchoninique : réactif A
- Solution de sulfate de cuivre : réactif B
- Solution standard de BSA 1mg/ml

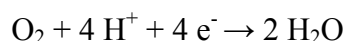
#### Technique :

- Préparer la solution de travail A+B :
  - 49 volumes de réactif A
  - 1 volume de réactif B
- Préparer la gamme étalon de BSA:
  - Point à 0,125 mg/ml : 10  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,125 mg/ml + 200  $\mu\text{l}$  de solution A+B
  - Point à 0,25 mg/ml : 10  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,25 mg/ml + 200  $\mu\text{l}$  de solution A+B
  - Point à 0,5 mg/ml : 10  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,5 mg/ml + 200  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Préparer un blanc :
  - 10  $\mu\text{l}$  de NaCl 0,9%
  - 200  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Préparer les échantillons :
  - 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon (suspension cellulaire, suspension de mitochondries isolées) dilué dans le NaCl 0,9% de manière à être dans la gamme
  - 200  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Incuber 30 min à 37°C
- Lire l'absorbance à 562 nm contre le blanc

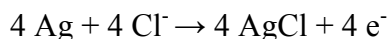
### Fiche technique n° 3 : Mesure de la respiration cellulaire sur fibroblastes non perméabilisés par oxygraphie

Cette technique consiste à mesurer les vitesses de consommation d'oxygène de cellules intactes dans différents états métaboliques selon la méthode développée par Hütter *et al.* en 2004. Les cellules utilisent leur substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe contenant une électrode de «Clark» sensible à l'oxygène (*Rank Brothers Ltd, Cambridge, Angleterre*).

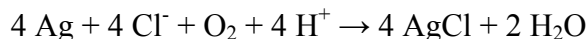
Cette électrode est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent avec une différence de potentiel de -0,7 V, immergées dans une solution de KCl à demi saturée et isolées de la cuve par une membrane semi-perméable laissant diffuser l'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'oxygène traversant la membrane va être réduite au niveau de la cathode selon la réaction suivante :



Une oxydation se produit à l'anode :



L'équation bilan de la réaction est donc :



Dans ces conditions, la variation de courant induite par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Ces variations de courant sont amplifiées et inscrites sur une table traçante. Une analyse du tracé permet d'obtenir les mesures d'intensités respiratoires par le calcul suivant :

$$\text{I.R} = \frac{p \times 203}{200 \times [c]}$$

IR : intensité respiratoire (nmol O<sub>2</sub>/min/mg<sub>prot</sub>)  
p : pente mesurée sur le tracé (mm/min)  
203 : solubilité de l'oxygène dans le milieu à 37°C (nmol O<sub>2</sub>/ml)  
200 : pleine échelle (200mm)  
[c] : concentration protéique (mg/ml)

L'électrode est associée à une cuve de mesure thermostatée, disposant d'une agitation magnétique. Elle est calibrée dans le milieu d'incubation équilibré à l'air à 37°C. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu. Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Ensuite, une

solution de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu, est injectée dans la chambre, donnant ainsi le 0% d'oxygène.

La consommation d'oxygène peut être déterminée à différents états :

- **Routine** : respiration basale de la cellule.
- **Oligomycine** : respiration insensible à l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), il s'agit donc d'une respiration en conditions non phosphorylantes, qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP.
- **FCCP** : le gradient de protons est dissipé par un protonophore (le FCCP). La respiration ainsi mesurée est contrôlée par le système d'oxydation et reflète donc la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire dans des conditions découplées.
- **COX** : Après inhibition de la respiration par un inhibiteur du complexe III (antimycine), de l'ascorbate et du TMPD sont ajoutés. Ce dernier est un transporteur d'électrons qui lorsqu'il est réduit par l'ascorbate va transférer ses électrons au cytochrome *c*. La vitesse de consommation d'oxygène ainsi mesurée va permettre de déterminer la capacité fonctionnelle maximale du complexe IV.

La mesure de ces différents paramètres permet le calcul de rapports suivants :

- **FCCP / Routine** : *rapport de contrôle respiratoire par le potentiel de membrane mitochondrial*. Il permet de déterminer la capacité respiratoire de réserve des fibroblastes et indique donc la part de la capacité respiratoire maximale utilisée par les cellules in situ.
- **FCCP / Oligomycine** : *rapport de contrôle respiratoire par le potentiel de membrane et par l'ATP synthase*. En présence d'oligomycine, l'inhibition de l'ATP synthase augmente le potentiel de membrane puisque celle-ci ne favorise plus le retour des protons vers la matrice mitochondriale. En cas de couplage total, la respiration est totalement inhibée mais si une respiration résiduelle est mesurée, elle permet alors uniquement de compenser la fuite de protons. Ce rapport est donc un indicateur du couplage des phosphorylations oxydatives. Lorsqu'il diminue, en liaison avec une augmentation de respiration en présence d'oligomycine, il indique une diminution de couplage.
- **(Routine - Oligomycine) / FCCP** : Il représente la *part de la respiration couplée à la synthèse d'ATP mitochondriale en fonction de la capacité respiratoire des fibroblastes*.
- **COX / FCCP** : il représente la *capacité maximale de la cytochrome c oxydase relative à la respiration maximale découplée*. Elle est également appelée capacité de réserve du complexe IV.

### Réactifs :

- Milieu de respiration
  - DMEM (*Institut de biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France*)
  - Glutamine 2 mM
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200  $\mu$ M
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mg/ml
- Ascorbate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 M
- TMPD (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 M
- KCN (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM

### Technique :

Les cellules, soit une flasque T75, sont récoltées par trypsination. Entre 3 et  $5 \cdot 10^6$  cellules sont nécessaire pour une oxygraphie.

- Reprendre les cellules dans 500  $\mu$ l de milieu de respiration, les mettre dans la cuve de l'oxygraphe et fermer le bouchon.
- Lorsque la pente correspondant à la respiration basale est régulière, ajouter 2  $\mu$ l d'oligomycine 1 mg/ml.
- Faire un autre ajout de 2  $\mu$ l d'oligomycine afin de s'assurer que ce réactif est bien en concentration saturante (8  $\mu$ g/ml final).
- Ajouter successivement (environ 8 fois) 0,5  $\mu$ l de FCCP 200  $\mu$ M (0,2 à 1,6  $\mu$ M final) afin de stimuler la chaîne respiratoire au maximum.
- Injecter 2  $\mu$ l d'antimycine A 2 mg/ml (8  $\mu$ g/ml final). Ce réactif est un inhibiteur du complexe III permettant de mesurer la consommation d'oxygène qui n'est pas due à la chaîne respiratoire mitochondriale. La valeur de cette respiration en présence d'antimycine A sera retranchée à toutes les autres mesures afin d'exprimer spécifiquement la respiration mitochondriale.
- Injecter 5  $\mu$ l d'ascorbate 1 M (10 mM final) puis successivement (environ 6 fois) 0,5  $\mu$ l de TMPD 250 mM (0,25 à 1,5 mM final).
- Enfin, ajouter 1  $\mu$ l de KCN 1 M (2 mM final), un inhibiteur du complexe IV afin de s'assurer que la respiration mesurée est bien spécifique de ce complexe.
- A la fin de l'oxygraphie, prélever 400  $\mu$ l de suspension dans la chambre de mesure pour le dosage des protéines.

## Fiche technique n° 4 : Mesure de la respiration cellulaire sur fibroblastes perméabilisés par oxygraphie

Cette technique consiste à mesurer les vitesses de consommation d'oxygène de cellules perméabilisées en apportant des substrats à la chaîne respiratoire. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros O2k (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) contenant une électrode de «Clark» sensible à l'oxygène fonctionnant selon le même principe que celui décrit dans la fiche n°3.

### Réactifs :

#### ▪ Tampon de respiration avec ou sans BSA

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 10 mM
- Mannitol : 300 mM
- KCl : 10 mM
- $\text{MgCl}_2$  : 5mM
- BSA : 1 mg/ml

Ajuster à pH 7,4

- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- $\text{NAD}^+$  (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 50 mM
- ADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 8 mg/ml
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM

### Préparation des cellules :

Pour déterminer la consommation d'oxygène maximale des mitochondries de fibroblastes, les substrats de la chaîne respiratoire doivent être apportés en excès. Les cellules sont donc perméabilisées en présence de digitonine.

- Récouter par trypsination les cellules contenues dans une flasque T75. Entre 3 et  $5 \cdot 10^6$  cellules sont nécessaires pour une oxygraphie.
- Reprendre les cellules dans  $50 \mu\text{l}$  par million de cellules de tampon de respiration sans sérum albumine bovine (BSA)
- Perméabiliser les cellules avec  $15 \mu\text{g}$  de digitonine par million de cellules sous agitation douce pendant 2,5 minutes
- Ajouter du tampon de respiration avec BSA qsp 5 volumes pour stopper l'action de la digitonine
- Centrifuger les cellules à 800 g pendant 2 minutes

### Oxygraphie :

Les substrats du complexe I, puis du complexe II seront ajoutés successivement afin de déterminer la respiration dirigée par chacun de ces complexes.

- Reprendre les cellules dans  $200 \mu\text{l}$  de tampon de respiration avec BSA
- Mettre 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA dans la cuve de l'oxygraphe et ajouter les  $200 \mu\text{l}$  de milieu avec les cellules.
- Ajouter dans la cuve :
  - Malate 0,5 M :  $20 \mu\text{l}$  (5 mM final)
  - Pyruvate 0,5 M :  $20 \mu\text{l}$  (5 mM final)
  - NAD<sup>+</sup> 50 mM :  $20 \mu\text{l}$  (0,5 mM final)
  - ADP 150mM :  $20 \mu\text{l}$  (1,5 mM)
  - Succinate 0,5 M :  $40 \mu\text{l}$  (10 mM final)
  - Roténone 2,5 mM :  $8 \mu\text{l}$  (10  $\mu\text{M}$  final)
  - Oligomycine 8 mg/mL :  $2 \mu\text{l}$  (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final)
  - FCCP 1 mM :  $2 \mu\text{l}$  (1  $\mu\text{M}$  final)
- Prélever 4 fois  $400 \mu\text{l}$  dans la cuve pour le dosage des protéines

## Fiche technique n° 5 : Mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP de fibroblastes : détermination du rapport ATP/O

Cette technique consiste à déterminer l'efficacité de la phosphorylation oxydative en dosant sur une même suspension de fibroblastes, la consommation d'oxygène et le taux de synthèse d'ATP correspondant. La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros O2k (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) comme précédemment.

### 1. Détermination de la consommation d'oxygène des fibroblastes par oxygraphie

#### Réactifs :

- Tampon de respiration avec ou sans BSA
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 10 mM
  - Mannitol : 300 mM
  - KCl : 10 mM
  - MgCl<sub>2</sub> : 5mM
  - BSA : 1 mg/mlAjuster à pH 7,4
- Tampon de respiration avec BSA et inhibiteurs
  - Tampon de respiration avec BSA : 9,8 ml
  - EDTA 200 mM : 100 µl
  - Iodoacétate 200 mM : 100 µl
- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 200 mM, pH 7,0
- Iodoacétate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200 mM
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- NAD<sup>+</sup> (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 50 mM
- ADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM

- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 8 mg/ml
- Atractyloside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 7,5 mM
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Acide Trichloroacétique (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1%

### **Préparation des cellules :**

Pour déterminer la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP maximales des mitochondries de fibroblastes, les substrats de la chaîne respiratoire doivent être apportés en excès. Les cellules sont donc perméabilisées en présence de digitonine.

- Récolter par trypsination les cellules contenues dans une flasque T75. Entre 3 et 5.10<sup>6</sup> cellules sont nécessaires pour une oxygraphie.
- Reprendre les cellules dans 50µl par million de cellules de tampon de respiration sans sérum albumine bovine (BSA)
- Perméabiliser les cellules avec 15µg de digitonine par million de cellules sous agitation douce pendant 2,5 minutes
- Ajouter du tampon de respiration avec BSA qsp 5 volumes pour stopper l'action de la digitonine
- Centrifuger les cellules à 800 g pendant 2 minutes

### **Oxygraphie :**

Nos mesures sont réalisées à l'aide d'un oxygraphe (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) en présence des substrats du complexe I (malate-pyruvate) et du complexe II (succinate).

- Reprendre les cellules dans 200 µl de tampon de respiration avec BSA contenant des inhibiteurs (2 mM d'EDTA qui chélate le Ca<sup>2+</sup> essentiellement et le Mg<sup>2+</sup> et donc bloque les ATPases Ca<sup>2+</sup>-dépendantes et 2 mM d'iodoacétate pour inhiber la glycolyse et donc la production d'ATP par cette voie)
- Mettre 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA et inhibiteurs dans la cuve de l'oxygraphe et ajouter les 200µl de milieu avec les cellules.
- Ajouter dans la cuve :
  - Malate 0,5 M : 20 µl (5 mM final)
  - Pyruvate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
  - Succinate 0,5 M : 20µl (5 mM final)

Après obtention d'un plateau lorsque le flux d'oxygène est stable, prélever 10 µl toutes les 30 secondes dans la cuve (faire 3 prélèvements) et les ajouter à 10 µl d'acide trichloroacétique



(TCA) 1%. Le TCA, par son acidité, précipite les protéines, inhibe les ATPases et permet d'éviter l'hydrolyse de l'ATP. Ces prélèvements permettront de s'assurer qu'il n'y a pas de synthèse glycolytique d'ATP.

- Ajouter ensuite :
  - NAD<sup>+</sup> 50 mM : 20µl (0,5 mM final)
  - ADP 150mM : 20µl (1,5 mM)

Attendre le début du plateau et faire 5 prélèvements dès le début du plateau. Prélever toutes les 30 secondes dans la cuve 10µl que l'on met dans 10µl de TCA 1%. Ces prélèvements permettront de déterminer la synthèse d'ATP.

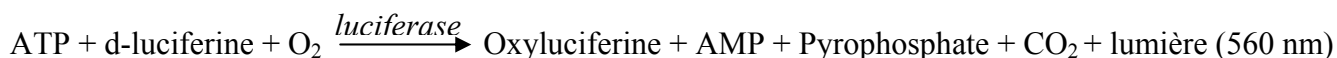
- Ajouter :
  - Oligomycine 8 mg/mL : 2µl (8 µg/ml final)
  - Atractyloside 7,5 mM : 8µl (30 µM final)

Attendre la stabilisation du flux et faire 3 prélèvements espacés de 30 secondes de 10 µl dans la cuve et les ajouter à 10 µl d'acide trichloroacétique (TCA) 1%. Ces prélèvements permettront de s'assurer qu'il n'y a pas d'hydrolyse de l'ATP dans nos prélèvements.

- Enfin, ajouter :
  - FCCP 1 mM : 2µl (1 µM final)
- Conserver les prélèvements à -80°C jusqu'au jour du dosage
- Prélever 4 fois 400µl dans la cuve pour le dosage des protéines

## **2. Dosage de la synthèse d'ATP sur fibroblastes par bioluminescence**

Cette technique utilise le système luciférine – luciférase pour catalyser la réaction suivante :



Le dosage est réalisé à partir du kit ENLITEN ATP Assay System (*Promega, Madison, USA*) et du luminomètre MiniLumat LB 9506 (*Berthold technologies, TN, USA*).

### **Réactifs :**

- Kit ENLITEN ATP Assay System (*Promega, Madison, USA*)
  - Réactif L/L (luciférine/luciférase)
  - Tampon de reconstitution (12 ml)
  - Solution standard d'ATP (10<sup>-7</sup> M)
  - Un flacon d'eau ATP-free (25 ml)

Le kit est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  et ses constituants ne doivent pas être exposés à la lumière

▪ Tampon de Neutralisation

- Hepes 25 mM
- EDTA 2 mM

Ajuster à pH 7,75 et autoclaver pour éliminer toute trace d'ATP

**Préparation des échantillons :**

- Ajouter à chaque échantillon prélevé au cours de l'oxygraphie 980  $\mu\text{l}$  de tampon de neutralisation
- Vortexer et laisser décongeler à température ambiante
- Diluer chaque échantillon au 1/10<sup>ème</sup> par million soit par exemple 1/30<sup>ème</sup> pour 3 millions de cellules

**Dosage :**

Le kit doit être sortit 1 à 2 heures avant le dosage. Une fois décongelé, le réactif L/L est reconstitué à l'abri de la lumière par la totalité du tampon de reconstitution puis agité par retournements. Il doit être régénéré au moins 30 minutes avant le dosage qui doit être réalisé dans les 4 heures. Le dosage est réalisé à l'abri de la lumière.

- Préparer une gamme d'ATP de  $10^{-7}$  à  $10^{-11}$  M. A partir de la solution standard, faire des dilutions en cascade au 1/10<sup>ème</sup> dans l'eau ATP-free (10  $\mu\text{l}$  de la dilution précédente + 90  $\mu\text{l}$  d'eau)
- Prendre un tube adapté au bioluminomètre et déposer 10  $\mu\text{l}$  de l'échantillon à doser
- Ajouter 90  $\mu\text{l}$  de solution L/L
- Faire aussitôt une mesure de 10 secondes au bioluminomètre
- Faire de même pour chaque point de gamme et chaque échantillon

A partir de valeurs obtenues pour chaque point de gamme, réaliser une gamme étalon qui permettra de déduire la quantité d'ATP dans chaque échantillon. Tracer la droite correspondant aux valeurs d'ATP exprimées en nmoles d'ATP / mg de protéines en fonction du temps. La pente correspond au nombre de nmoles d'ATP synthétisées/min/mg de protéines.

Déterminer le rapport ATP/O en calculant le rapport du nombre de nmoles d'ATP synthétisées/min/mg de protéines par la consommation d'oxygène à l'état 3 (en présence d'ADP).

## Fiche technique n° 6 : Détermination de la quantité d'ANT fonctionnel par oxygraphie : titration au carboxyatractyloside

Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) réalise l'échange ATP/ADP entre la matrice mitochondriale et le cytosol. L'activité de cette protéine peut intervenir dans la consommation du gradient de protons et ainsi provoquer une diminution du couplage des phosphorylations oxydatives.

Cette technique adaptée de la méthode décrite par Zhou *et al.*, (2001) vise à évaluer la dépendance de la respiration mitochondriale maximale stimulée par l'ADP (état 3) à l'égard de l'activité de l'ANT. Pour cela, la respiration à l'état 3 des fibroblastes perméabilisés, en présence des substrats du complexe I et du complexe II, est inhibée par l'ajout de doses croissantes de carboxyatractyloside (cATR), un inhibiteur de l'ANT non compétitif vis-à-vis de l'ADP.

### Réactifs :

#### ▪ Tampon de respiration avec ou sans BSA

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 10 mM
- Mannitol : 300 mM
- KCl : 10 mM
- MgCl<sub>2</sub> : 5mM
- BSA : 1 mg/ml

Ajuster à pH 7,4

- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml à chauffer à 95°C
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- NAD<sup>+</sup> (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 50 mM
- ADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Carboxyatractyloside (*Calbiochem, San Diego, USA*) 10 µM

### Préparation des cellules :

- Les cellules sont perméabilisées en présence de digitonine.

- Récolter par trypsination les cellules contenues dans une flasque T75. Entre 3 et 5.106 cellules sont nécessaires pour une oxygraphie.
- Reprendre les cellules dans 50µl par million de cellules de tampon de respiration sans sérum albumine bovine (BSA)
- Perméabiliser les cellules avec 15µg de digitonine par million de cellules sous agitation douce pendant 2,5 minutes
- Ajouter du tampon de respiration avec BSA qsp 5 volumes pour stopper l'action de la digitonine
- Centrifuger les cellules à 800 g pendant 2 minutes

### Oxygraphie :

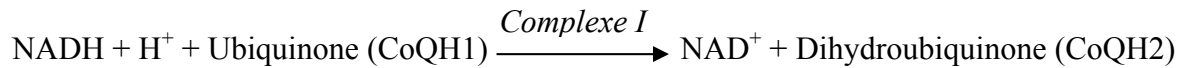
- Reprendre les cellules dans 200 µl de tampon de respiration avec BSA
- Mettre 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA dans la cuve de l'oxygraphe et ajouter les 200µl de milieu avec les cellules.
- Ajouter dans la cuve :
  - Malate 0,5 M : 20 µl (5 mM final)
  - Pyruvate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
  - Succinate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
  - NAD+ 50 mM : 20µl (0,5 mM final)
  - ADP 150mM : 20µl (1,5 mM)
- Faire une titration au cATR en ajoutant des doses croissantes de cATR 10 µM soit (0,01 à 0,2 µM final)
- Ajouter
  - FCCP 1 mM : 2µl (1 µM final)
- Prélever 4 fois 400µl dans la cuve pour le dosage des protéines

La courbe de la respiration à l'état 3 en fonction de la quantité en cATR nous permet d'obtenir une régression polynomiale avec une équation de la forme  $y = a x^2 + b x + c$ .

La résolution de l'équation pour  $y = 0$  nous donne la quantité de cATR correspondant à l'inhibition complète de la respiration de l'état 3, ce qui permet d'estimer le contenu en ANT fonctionnel en nmol de cATR/mg protéines.

# Fiche technique n°7 : Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (Complexe I) sur fibroblastes

Le complexe I transfère les électrons du NADH au coenzyme Q :



Le dosage de l'activité du complexe I est réalisé en présence d'un accepteur d'électrons artificiel, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP). L'activité est donc mesurée en suivant la réduction du DCPIP par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé. Cette technique est adaptée de celle décrite par Kuznetsov et Gnaiger (Mitochondrial Physiology Network 8.15, 2003).



Cependant, le NADH peut aussi être oxydé par la cytochrome  $b_5$  réductase de la membrane mitochondriale externe. En cours de dosage, de la roténone (inhibiteur du complexe I) est ajoutée pour soustraire l'activité non sensible à la roténone et donc non spécifique du complexe I.

## Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,4
- Ubiquinone 1 (CoQH1) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 M
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- NADH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 15 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules
- Transvaser les cellules dans un tube en verre résistant à la sonication et compléter avec du tampon A qsp 250 µl par million de cellules
- Soniquer les cellules maintenues dans la glace 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication et en prenant garde que la sonde soit au centre du tube et de la suspension cellulaire. Le sonicateur est réglé à une amplitude de 39%
- Cette étape doit être réalisée juste avant le dosage.

### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, pH 7,4	815	80 mM
KCN 0,5 M	2	1 mM
NaN <sub>3</sub> 1 M	2	2 mM
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
Eau ppi	25	
CoQH1 2,5 mM	40	0,1 mM
DCPIP 5 mM	15	75 µM

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 250.000 cellules soit 62,5 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 µl de NADH 15 mM soit 300 µM final

- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 40 secondes, puis ajouter :

Roténone 2,5 mM	4	10 μM
-----------------	---	-------

- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 40 secondes

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans roténone et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO^{-Rot} - \Delta DO^{+Rot})}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-Rot}$  : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée sans roténone

$\Delta DO^{+Rot}$  : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

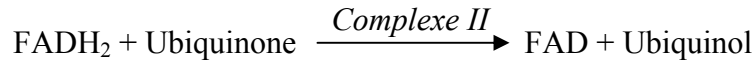
$\epsilon_{DCPIP}$  : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{nDCPIP}$  : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{cellules}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,25

## Fiche technique n°8 : Dosage de l'activité Succinate Ubiquinone Réductase (Complexe II) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe II est la suivante :



Lors de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage fait intervenir une seconde réaction impliquant un accepteur d'électrons artificiel, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP). Ce dernier va être réduit par l'ubiquinol formé lors de la réaction précédente. L'activité est donc mesurée en suivant la réduction du DCPIP par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé. Cette technique est adaptée à partir de celle décrite par James *et al.* (1996).



### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
 Ajuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- Ubiquinone 1 (CoQH1) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 10 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Thenoyltrifluoroacétone (TTFA) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 40 mM



### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules

### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, pH 7,5	500	50 mM
Eau ppi	160	
EDTA 10 mM	10	0,1 mM
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
KCN 10 mM	200	2 mM
Roténone 2,5 mM	4	10 µM
Antimycine A 1 mg/ml	2	2 µM
Succinate 0,5 M	40	20 mM
DCPIP 5 mM	15	80 µM

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Ajouter 500.000 cellules soit 25 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 µl d'ubiquinone-1 2,5 mM soit 50 µM
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 90 secondes, puis ajouter :

TFA 40 mM	5	0,2 mM
-----------	---	--------

- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 90 secondes

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans TTFA et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO^{-TTFA} - \Delta DO^{+TTFA})}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-TTFA}$  : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée sans TTFA

$\Delta DO^{+TTFA}$  : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée avec TTFA

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

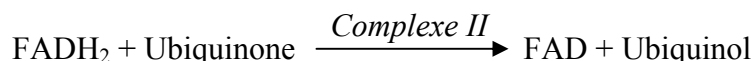
$\epsilon_{DCPIP}$  : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{nDCPIP}$  : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

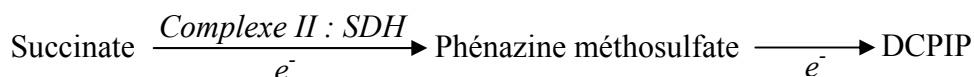
$q_{cellules}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## Fiche technique n° 9 : Dosage de l'activité Succinate Déshydrogénase (complexe II) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe II est la suivante :



Ce dosage s'appuie sur le couplage de l'oxydation du succinate par l'activité SDH du complexe II avec la réduction d'un système artificiel d'accepteur d'électrons : le phénazine méthosulfate (PMS) et le DCPIP. Le dosage est réalisé en présence de thenoyl trifluoroacétone (TTFA), un inhibiteur du transfert d'électrons au coenzyme Q afin de doser uniquement l'activité succinate déshydrogénase du complexe II.



### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Phénazine méthosulfate (PMS) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 mM
- Thenoyltrifluoroacétone (TTFA) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 40 mM

### Préparation des cellules

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50  $\mu\text{l}$  de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace

- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules

### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, pH 7,5	500	50 mM
Succinate 0,5 M	40	20 mM
KCN 10 mM	150	1,5 mM
PMS 20 mM	50	1 mM
TTFA 40 mM	5	0,2 mM
Eau ppi	35	

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Ajouter 500.000 cellules soit 25 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 200 µl de DCPIP 0,5 mM soit 0,1 mM
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 90 secondes.

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO : variation de densité optique par minute à 600 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

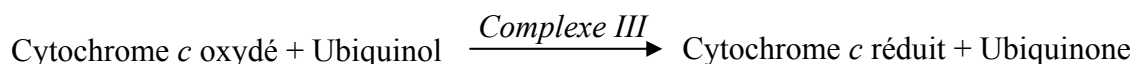
ε<sub>DCPIP</sub>: coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>nDCPIP</sub> : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## Fiche Technique n° 10 : Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome *c* Réductase (complexe III) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



Le dosage consiste à suivre la réduction du cytochrome *c* oxydé à 550 nm. En effet, le cytochrome *c* réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc l'apparition de la forme réduite du cytochrome *c* entraînera une augmentation de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe III. Il existe des activités parallèles, non respiratoires, d'oxydation de l'ubiquinol. L'antimycine A est un des inhibiteurs spécifiques du complexe III. L'activité spécifique du complexe III est donc calculée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à l'antimycine A qui est mesurée par un dosage parallèle en présence d'antimycine A. Cette technique est adaptée de celle décrite par Rustin *et al.* (1993).

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM, pH 7,8
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 10 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Cytochrome *c* oxydé (*Acros, Noisy-Le-Grand, France*) : 1 mM
- Décylubiquinol : 25 mM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante

- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules

### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM, pH 7,8	500	10 mM
EDTA 10 mM	200	2 mM
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
KCN 10 mM	25	0,25 mM
Cytochrome <i>c</i> oxydé 1mM	40	40 µM
Eau ppi	200	
Cellules	5	100.000 cellules

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 3 µl de Décylubiquinol 25 mM soit 75 µM
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 66 secondes.
- Faire le même dosage avec 4 µl d'Antimycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 4 µg/ml final

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans antimycine et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome *c* réduit/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO^{-\text{Anti}} - \Delta DO^{+\text{Anti}})}{l \times \epsilon_{\text{Cyt } c} \times S_{\text{Cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta\text{DO}^{-\text{Anti}}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm sans antimycine

$\Delta\text{DO}^{+\text{Anti}}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm avec antimycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\varepsilon_{\text{Cyt } c}$  : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm =  $18,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

$\text{Sn}_{\text{Cyt } c}$  : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

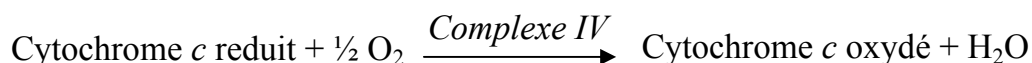
### **Préparation du décyubiquinol (25 mM) :**

Cette préparation se fait à l'abri de la lumière.

- Préparer une solution de décyubiquinone (*Biomol Research Labs, Plymouth Meeting, PA, USA*) à 13 mM (20 mg dans 4.8 ml d'éthanol).
- Prendre le spectre de la solution oxydée (1  $\mu\text{l}$  + 1 ml d'éthanol dans une cuve en quartz) et noter le pic d'absorbance à 275 nm qui doit être aux alentours de 2,6.
- Sous une hotte, ajouter quelques cristaux de borohydrure de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) et agiter.
- Acidifier avec 30  $\mu\text{l}$  d'HCl 12M, 37% jusqu'à décoloration de la solution en jaune pâle.
- Centrifuger cette solution 15 minutes à 4000 rpm et récupérer le surnageant.
- Prendre le spectre de la solution réduite (1  $\mu\text{l}$  + 1 ml d'éthanol dans une cuve en quartz) et noter le pic d'absorbance à 285 nm qui doit être aux alentours de 0,7.
- Ajouter 5 ml de tampon ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M; Sorbitol 0,25 M; pH 7,4), puis 3 ml de cyclohexane.
- Agiter fortement pendant 5 minutes et laisser décanter quelques secondes
- Centrifuger 10 minutes à 1000 g afin d'extraire la phase organique et la récupérer dans un tube en verre. Faire plusieurs extractions au cyclohexane (2 à 3 fois) et rassembler les phases organiques.
- Evaporer le cyclohexane sous courant d'azote afin d'éviter la réoxydation de la solution et peser le tube contenant l'extrait sec.
- Reprendre le résidu dans 2 ml de cyclohexane et faire des aliquotes de 60  $\mu\text{l}$ .
- Evaporer sous azote et conserver à  $-80^\circ\text{C}$ .
- Peser le tube ayant contenu l'extrait sec après l'avoir nettoyé et séché afin de déterminer la masse de l'extrait sec.
- Déduire la masse d'extrait par aliquote afin de déterminer la quantité d'éthanol nécessaire à la reprise de chaque aliquote pour avoir une concentration de 25 mM.

## Fiche Technique n° 11 : Dosage de l'activité Cytochrome c Oxydase (complexe IV) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome *c*, son activité sera donc évaluée par la disparition du cytochrome *c* réduit qui absorbe à 550 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 6,5
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 125 mM
- Cytochrome *c* oxydé (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Cytochrome *c* réduit : 100 μM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 μl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 μl de tampon A par million de cellules



### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
Eau ppi	455	
Cytochrome <i>c</i> réduit 100 μM	500	50 μM

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 5 μl de cellules soit 100.000 cellules
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 μl de laurylmaltoside 125 mM soit 2,5 mM
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 90 secondes.

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome *c* réduit/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{Cyt } c} \times S_{\text{Cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO : variation de densité optique par minute à 550 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>Cyt c</sub> : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm = 18,5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>Cyt c</sub> : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

### Préparation du cytochrome *c* réduit (100 μM) :

- Diluer la solution de Cytochrome *c* oxydé 1 mM : 1 ml + 9 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,5 (C).
- Oxyder 1 ml de cette solution (O) par quelques cristaux de ferricyanure de potassium.
- Réduire 1 ml de cette solution (R) par quelques cristaux de dithionite de sodium.
- Mesurer le rapport des densités optiques à 550/560 nm des solutions oxydées et réduites
- Le rapport sera proche de 1,16 pour la solution 100% oxydée et entre 7,1 et 10 pour la 100% réduite.

- A partir des densités optiques à 550 nm, on calcule la DO à obtenir pour avoir une solution de cytochrome *c* à 80 μM réduite entre 92 et 97 % en utilisant les formules suivantes :
  - $DO_{(92\%)} = DO \text{ 100\% oxydée} + [(DO \text{ 100\% réduite} - DO \text{ 100\% oxydée}) \times 0,92]$
  - $DO_{(97\%)} = DO \text{ 100\% oxydée} + [(DO \text{ 100\% réduite} - DO \text{ 100\% oxydée}) \times 0,97]$
- Ajouter le cytochrome *c* réduit obtenu précédemment (solution R) par fractions de 20 μl aux 8 ml de Cytochrome *c* 100 μM (C) restant et mesurer la densité optique à 550 nm de façon à obtenir la DO désirée et être à 92-97% de réduction.



- Tampon G1
  - PEP : 2 mM
  - ATP : 0,5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> : 5 mM
  - KCl : 10 mM
  - Tris : 50 mM
  - BSA : 5 mg/ml

Ajuster à pH 8,0
- Tampon G2 :  
 Pour 5 ml de tampon G1, ajouter :
  - FCCP 10 mM : 1,5 µl soit 3 µM final
  - Antimycine 2,5 mg/ml : 1 µl soit 0,5 µg/ml
  - LDH 5 U/µl : 20 µl soit 20 mU/µl
  - PK 5 U/µl : 20 µl soit 20 mU/µl

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules
- Transvaser les cellules dans un tube en verre résistant à la sonication et compléter avec du tampon A qsp 250 µl par million de cellules
- Soniquer les cellules maintenues dans la glace 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication et en prenant garde que la sonde soit au centre du tube et de la suspension cellulaire. Le sonicateur est réglé à une amplitude de 39%
- Cette étape doit être réalisée juste avant le dosage.

### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon G2	200	

Eau ppi	655	
---------	-----	--

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 500.000 cellules soit 125 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 30 µl de NADH 2 mM soit 60 µM final
- Suivre la variation d'absorbance à 340 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 90 secondes.
- Faire le même dosage avec 10 µl d'oligomycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 10 µg/ml final

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans oligomycine et l'activité enzymatique en nmol de NADH oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO^{-\text{oligo}} - \Delta DO^{+\text{oligo}})}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{NADH}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-\text{Oligo}}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée sans oligomycine

$\Delta DO^{+\text{Oligo}}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{NADH}}$  : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

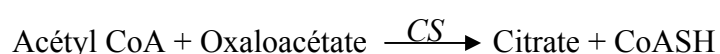
$S_{\text{NADH}}$  : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

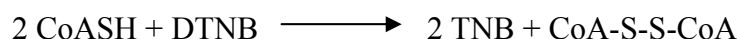
## Fiche technique n° 13 : Dosage de l'activité Citrate synthase (CS) sur fibroblastes

La citrate synthase (CS) est une enzyme clé du cycle de l'acide citrique (cycle de KREBS) se déroulant dans la matrice mitochondriale. Elle est spécifique aux mitochondries et le dosage de son activité est généralement utilisé comme un marqueur enzymatique quantitatif reflétant le contenu cellulaire en mitochondries (Jackman et Willis, 1996 ; Kirby *et al.*, 1999).

Cette enzyme catalyse la formation de l'acide citrique à partir de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate.



Le dosage est réalisé grâce à l'utilisation de l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le CoASH issu de la réaction catalysée par la citrate synthase va réagir avec le DTNB pour former du trinitrobenzène (TNB). Le dosage consiste à mesurer la formation du trinitrobenzène (TNB).



### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1 M, pH 8,1
- DTNB (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Acétyl CoA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %
- Oxaloacétate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont préparées par congélation-décongélation comme pour les complexes II, III et IV pour normaliser les activités de ces complexes (CS1). Elles sont préparées par congélation-

décongélation puis sonication pour les complexes I et V pour normaliser les activités de ces complexes (CS2).

**Technique :**

Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
DTNB 1 mM <i>(repris dans le tampon Tris)</i>	150	0,15 mM
Oxaloacétate 10 mM	50	0,5 mM
Acétyl CoA 10 mM	30	0,3 mM
Triton 10 %	10	0,1 %
Eau ppi	755 (CS1) 735 (CS2)	

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 100.000 cellules soit 5 µl (CS1) ou 25 µl (CS2)
- Suivre la variation d'absorbance à 412 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) pendant 90 secondes

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de TNB formé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{TNB} \times S_{n_{TNB}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 412 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>TNB</sub>: coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm = 13,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

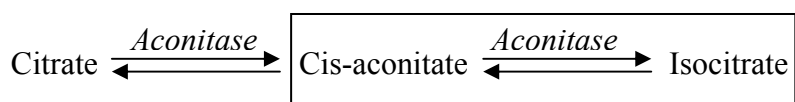
S<sub>n<sub>TNB</sub></sub> : nombre stoechiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

## Fiche technique n° 14 :

### Dosage de l'activité Aconitase sur fibroblastes

L'aconitase est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Cette protéine catalyse la réaction d'interconversion du citrate en isocitrate via le cis-aconitate. Le dosage consiste à mesurer le cis-aconitate absorbant à 240 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Krebs et Holzach, 1952.



Cette enzyme contient un centre fer-souffre ce qui fait que son activité est sensible aux espèces réactives de l'oxygène. Une baisse d'activité sera donc un indicateur indirect de la production de ROS.

#### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 100mM pH7,4
- MnCl<sub>2</sub> (Chlorure de manganèse) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10mM
- Isocitrate de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

#### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Tris 100 mM, pH 7,4	495	50 mM
Chlorure de Manganèse 10 mM	50	0,5 mM



Isocitrate de sodium 0,5 M	200	100 mM
Triton 10 %	10	0,1 %
Eau ppi	220	

- Incuber 5 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 25 µl de cellules soit 500.000
- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 240 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 240 secondes
- Remarque : l'activité est sensible à la présence de xanthine et xanthine oxydase

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de cis-aconitate/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{ACO} \times S_{n_{ACO}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 240 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>ACO</sub>: coefficient d'extinction molaire du cis-aconitate à 240nm = 3,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

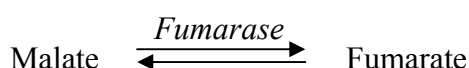
S<sub>n<sub>ACO</sub></sub> : nombre stoechiométrique du cis-aconitate dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## Fiche technique n° 15 :

### Dosage de l'activité Fumarase sur fibroblastes

La fumarase (ou fumarate hydratase), est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Elle catalyse l'hydratation du fumarate en L-malate qui est une réaction réversible. Ainsi, en présence de malate, la fumarase produit du fumarate absorbant à 250 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Hill et Bradshaw, 1969.



#### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH7,4
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 10 mM, pH7,4
- Malate (repris dans le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH7,4
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

#### Technique :

Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,4	845	85 mM
EDTA 10 mM, pH 7,4	10	0,1 mM
Malate 0,5 M	100	50 mM
Triton 10 %	20	0,2 %

- Incuber 5 minutes à 37°C

- Démarrer la réaction en ajoutant 25 µl de cellules soit 500.000
- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 250 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 240 secondes

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de fumarate/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (cell)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{FUM} \times S_{nFUM}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 250 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>FUM</sub>: coefficient d'extinction molaire du fumarate à 250nm = 4,88 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>nFUM</sub> : nombre stoechiométrique du fumarate dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## Fiche technique n° 16 :

### Extraction d'ARN de fibroblastes

L'extraction des ARN est réalisée avec le Kit Qiagen « RNeasy » (*Qiagen, Courtaboeuf, France*). Cette technique repose sur l'accrochage sélectif des ARN totaux sur une colonne de silice. L'utilisation d'un tampon fortement concentré en sels permet l'accrochage de plus de 100 µg d'ARN d'une taille pouvant atteindre 200 bases. Une première étape consiste à lyser mécaniquement les cellules puis à inhiber les RNases dans un tampon de guanidine thiocyanate très dénaturant. Les lysats sont alors déposés sur colonne de silice et les ARN sont retenus alors que les contaminants sont élués. Enfin, les ARN sont décrochés de la colonne et élués.

#### Technique :

##### Lyse des cellules

- Mettre 10µl/mL de β-mercaptoethanol dans du tampon RLT contenant du thiocyanate de guanidium
- Prendre un culot sec de fibroblastes (< 5.10<sup>6</sup> cellules)
- Mettre 350µl de tampon RLT contenant du β-mercaptoethanol dans le tube contenant le culot cellulaire
- Vortexer le tube jusqu'à décongélation du culot
- Mettre le tout dans une colonne violette
- Centrifuger 2 minutes à 10000 g

##### Extraction des ARN totaux

- Enlever la colonne et ajouter 1 volume d'éthanol 70% (350 µl) dans l'éluât
- Mettre l'éluât dans une colonne rose RNeasy (bien reprendre le précipité)
- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Ajouter 350µl de tampon RW1 contenant une petite quantité de thiocyanate de guanidium dans la colonne rose
- Centrifuger 15secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Ajouter 80µl de DNase (10µl de DNase + 70µl de tampon RDD) dans la colonne rose et incubé 15 minutes à température ambiante
- Ajouter 350µl de tamon RW1

- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Faire un lavage en ajoutant 500µl de tampon RPE pour éliminer les contaminants
- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Faire un second lavage avec 500µl de tampon RPE
- Centrifuger 1min à vide à 16000g

#### *Elution des ARN totaux*

- Passer la colonne dans un tube eppendorf propre de 1,5mL
- Eluer les ARN totaux retenus dans la colonne avec 30µl d'eau RNase free
- Centrifuger 1 minute à vide à 10000g
- Récupérer l'éluât contenant les ARN et conserver à -80°C

#### *Mesure de la concentration en ARN*

La densité optique des échantillons est lue avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Delaware, USA*) à 260 nm (longueur d'ondes d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons.

Sachant qu'une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN simple brin, la concentration en ARN contenue dans les échantillons peut être calculée à partir de leur absorbance à 260 nm.

## Fiche technique n° 17 :

### Transcription inverse d'ARN de fibroblastes

La réaction de transcription inverse consiste à transcrire les ARN en ADN complémentaires à l'aide de la reverse transcriptase rétrovirale (MMLV : Moloney-Murine Leukemia Virus) et à partir d'une amorce. La rétro-transcription des ARN de fibroblaste en ADNc est effectuée à l'aide du kit Advantage<sup>®</sup> TM RT-for-PCR Kit (*Clontech, Saint-Germain-en-Lay, France*).

#### Technique :

- Mettre 1µg de l'ARN préalablement extrait qsp 12,5 µl d'eau « RNase free » en présence de 1µl d'hexamères soit 1µM final.
- Placer le tube est alors placé au bain-marie sec pendant 2 minutes à 70°C.
- Ajouter successivement :
  - 4µl du tampon 5X (250mM Tris-HCl (pH8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)
  - 1µl du mix de dNTP (500 µM de chaque dNTP)
  - 0,5 µl de RNAsin (inhibiteur de ribonucléases) soit 20 unités
  - 1 µl de MMLV reverse transcriptase soit 200 unités
- Placer le tube dans un thermocycleur pendant 1 heure à 42°C puis 5 min à 95°C
- Conserver les ADNc synthétisés à -80°C.

## Fiche technique n° 18 : RT PCR quantitative

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente : le SYBR green. Ce fluorochrome, qui a une longueur d'onde d'excitation de 497 nm et une longueur d'onde d'émission de 521 nm, a la propriété de s'incorporer dans le petit sillon de l'ADN double brin et n'est fluorescent que sous cette forme. La fluorescence émise,

Cette réaction d'amplification suit les mêmes étapes que pour une PCR « classique » c'est-à-dire plusieurs cycles contenant chacun une phase de dénaturation de l'ADN, une phase d'hybridation des amorces et une phase d'extension de l'ADN néosynthétisé. Au cours de chaque cycle, lors de l'élongation, la quantité de fluorochrome fixé à l'ADN augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence mesurée en fin de chaque cycle. L'augmentation de la fluorescence détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé.

### Technique :

Les transcrits des gènes ANT2, ANT3, UCP2 et ARP (acidic ribosomal phosphoprotein) sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel grâce au thermocycleur Chromo 4 real-time PCR detector et au kit iQ Sybr green Supermix (BioRad, CA, USA). ARP sert de gène de référence pour normaliser la quantité d'ADNc de chaque échantillon.

### Préparer une gamme de référence pour chaque gène

La gamme contient, pour chaque point, un nombre déterminé de copies de la séquence d'intérêt. Pour cela, une PCR « classique » est réalisée à partir d'ADNc issu de fibroblastes contrôles en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées lors de la PCR quantitative. La concentration du produit de PCR est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 260nm. Pour déterminer le nombre de copies du fragment amplifié par PCR, le calcul suivant est utilisé :

$$N = [c] \times \frac{Na}{Pb \times 660}$$

N : nombre de copies (copies/ $\mu$ l)

[c] : concentration en ADNc mesurée par spectrophotométrie (g/ $\mu$ l)

Na : nombre d'Avogadro = 6,02.10<sup>23</sup> molécules (=1mol)

Pb : taille du fragment amplifié en paire de base

660 : masse d'une paire de base (Da ou g/mol)

A partir de ce produit de PCR, des dilutions successives sont effectuées afin d'obtenir une gamme dont le nombre de copies est connu.

### PCR quantitative en temps réel

Mettre dans une barette adaptée au Chromo 4 real-time PCR detector :

- 8 µl de cDNA issu de la reverse transcription et dilué au 1/40<sup>ème</sup> (1/100<sup>ème</sup> final)
- 1 µl d'amorce sens (0,5 µM final)
- 1 µl d'amorce anti-sens (0,5 µM final)
- 10 µl de mix 2X contenant l'enzyme Taq DNA polymerase et le fluorochrome

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

GENE	AMORCES	TAILLE DE L'AMPLICON
<b>ANT2</b>	<i>Amorce sens</i> 5'-GCTTGTCTTGTATGATGAAA-3'	192 pb
	<i>Amorce antisens</i> 5'-AGAAAAGTGGTCAGATGAAT-3'	
<b>ANT3</b>	<i>Amorce sens</i> 5'-TCGAGAAATTCCAGTTGTCTTT-3'	223 pb
	<i>Amorce antisens</i> 5'-AGAACACGACTTGGCTCCTACA-3'	
<b>UCP2</b>	<i>Amorce sens</i> 5'-GGGCCAGTGCGCGCTACAGC-3'	657 pb
	<i>Amorce antisens</i> 5'-TCGGGGCCCTCCTTCTGGA-3'	
<b>ARP</b>	<i>Amorce sens</i> 5' CGACCTGGAAGTCCAACACTAC 3'	109 pb
	<i>Amorce antisens</i> 5' ATCTGCTGCATCTGCTTG 3'	

Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

AMPLIFICATION	Nombre de cycle	40
<i>Dénaturation</i>	Température	95°C
	Temps d'incubation	15s
<i>Hybridation des amorces</i>	Température	58°C
	Temps d'incubation	5s
<i>Extension</i>	Température	72°C
	Temps d'incubation	15s



## Fiche technique n° 19 :

### Isolement de mitochondries de fibroblastes

L'isolement des mitochondries est basé sur le principe de centrifugation différentielle.

#### Réactifs :

- Digitonine, chauffer à 95°C (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml
- Solution d'antiprotéases (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 1X
- Triethanolamine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Tampon d'isolement (maintenir à 4°C. Conservation 1 mois.)
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*): 0,2 mM
  - Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,25 M
  - Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM

Amener le pH à 7,8

#### Matériel :

- Un petit potter de 4ml
- 3 tubes à centrifugation à bouchons à vis

#### Technique :

Toutes les étapes se réalisent à 4°C.

- Prendre environ 6 boîtes T150 de fibroblastes en culture et les trypsiner pour avoir entre  $20 \cdot 10^6$  et  $40 \cdot 10^6$  cellules.
- Reprendre le culot de cellules dans 5ml de tampon d'isolement, le congeler à -80°C puis le décongeler
- Ajouter dans le tube :
  - 0,1mg/ml de digitonine (soit 50µl de solution à 10µg/µl)
  - 10mM de triethanolamine (soit 6,6µl de la solution stock)
  - 1X d'antiprotéase (pastille à diluer donne solution à 25X)
- Placer 10minutes à 4°C
- Potériser par 15 allers-retours l'homogénat obtenu
- Centrifuger à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C
- Récupérer le surnageant S1 dans un tube à fond rond pour la centrifugation finale

- Reprendre le culot dans 5ml final de tampon d'isolement contenant de la digitonine et des antiprotéases
- Repotériser par 15 allers-retours l'homogénat obtenu
- Recentrifuger à 1000g pendant 10 minutes à 4°C
- Récupérer le surnageant S2 dans le tube à fond rond contenant S1 pour la centrifugation finale (garder le culot qui contient les noyaux et cellules non cassées)
- Centrifuger S1 + S2 à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C
- Récupérer 1,5mL de surnageant qui contient la fraction cytosolique
- Reprendre le culot de mitochondries dans 200 µl de tampon d'isolement + antiprotéases
- Faire un dosage de protéines en diluant les mitochondries au 1/20

## Fiche technique n° 20 : Western blot

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité d'une protéine contenue dans un échantillon. Elle est basée sur la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire. Cet anticorps est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation du complexe antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire se fait par chimioluminescence.

### Milieus et Réactifs :

- Tampon Tris SDS pH 8,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1 M
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,2 %Ajuster à pH 8,8
- Tampon Tris SDS pH 6,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 325 mM
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,2 %Ajuster à pH 6,8
- Tampon échantillon -2X
  - Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 0,4 M
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Glycérol (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Bleu de bromophénol (*Eurobio, Paris, France*) : 2 mM
  - $\beta$ -mercaptoéthanol (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,6 MAjuster à pH 6,8
- Tampon électrophorèse
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 25 mM
  - Glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 192 mM
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,1 %Amener à pH 8,3
- Tampon de transfert
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - Glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
  - Ethanol : 20 %

Amener à pH 8,3

▪ Tampon TBS

- NaCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,2 M
- KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 25 mM

Amener à pH 7,4

**Technique :**

**Préparation des gels**

Les gels sont coulés entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques (*système Miniprotean, Biorad, CA, USA*).

Préparer le gel de séparation (pour 4 gels) :

Réactifs	Gel à 12,5%	Gel à 8%
H <sub>2</sub> O	2 ml	5,7 ml
Tampon Tris-SDS pH 8,8	12,5 ml	12,5 ml
30 % Acrylamide/Bis solution 29 :1	10,4 ml	6,7 ml

- Ajouter 250 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 12,5 µl de TEMED
- Couler le gel et laisser polymériser 30 min. à température ambiante

Couler le gel de concentration (pour 4 gels) :

Réactifs	Quantité
H <sub>2</sub> O	4 ml
Tampon Tris-SDS pH 8,8	5 ml
30 % Acrylamide/Bis solution 29 :1	1,2 ml

- Ajouter 100 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 10 µl de TEMED
- Couler le gel, insérer les peignes et laisser polymériser 30 min. à température ambiante

**Préparation des échantillons**

Les western-blots ont été réalisés à partir de lysats cellulaires obtenus par congélation - décongélation de culots secs de fibroblastes ou à partir de mitochondries isolées de fibroblastes ou de cerveau de souris.

- Reprendre les échantillons dans une solution d'inhibiteurs de protéases.
- Diluer les échantillons au ½ dans du tampon échantillon 2X.
- Dénaturer les protéines par chauffage à 100°C pendant 10 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm 4°C.

### Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les protéines sont ensuite séparées par migration en gel SDS-PAGE (« Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel »).

- Déposer un volume d'échantillon correspondant à 50 µg de protéines cellulaires ou 10 µg de protéines mitochondriales dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 12,5% ou 8% selon la taille des protéines d'intérêt.
- Déposer un standard protéique de masse moléculaire connue afin d'étalonner la migration des protéines et d'estimer leur masse moléculaire.
- Migrer dans une cuve contenant du tampon électrophorèse à 100 volts pendant 15 minutes afin de concentrer les échantillons dans le gel de concentration puis à 140 volts pendant 1 heure 15 pour les séparer.

### Transfert sur membrane de nitrocellulose

Les protéines sont transférées à partir du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose en appliquant un faible courant.

- Préparer la membrane de nitrocellulose par immersion dans trois bains successifs d'éthanol, d'eau puis de tampon de transfert
- Placer la membrane dans l'appareil de transfert au contact du gel entre des feuilles de papier Whatman imbibées dans le même tampon.
- Appliquer un courant de 280mA pendant 1 heure 30.

### Incubation avec les anticorps

- Saturer la membrane 1h à température ambiante sous agitation ou toute la nuit à 4 °C dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%, lait 5%.
- Laver 1X 5 min. dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%

- Incuber la membrane dans l'anticorps primaire correspondant à la protéine d'intérêt, pendant 2h à température ambiante sous agitation. L'anticorps est dilué dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%, lait 1%. Tous les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris.

PROTEINE CIBLE	TAILLE	DILUTION	PROVENANCE
ANT	~ 30 kDa	1/500 <sup>ème</sup>	Calbiochem, CA, USA
HSP60	60 kDa	1/1000 <sup>ème</sup>	Stressgene, Victoria, Canada
MFN2	110 kDa	1/500 <sup>ème</sup>	Abnova, Taipei City, Taiwan
MnSOD	24 kDa	1/2000 <sup>ème</sup>	Abcam, Cambridge, UK
OPA1	80-100 kDa	1/500 <sup>ème</sup>	BD biosciences CA, USA
OXPPOS (V : V $\alpha$ , III : core2, II : SDHB, IV : COX II, I : 20KDa)	55, 47, 30, 26, 20 kDa	1/250 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
SDHA	70 kDa	1/1000 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
SDHB	30 kDa	1/1000 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
$\alpha$ -Tubuline	~ 55 kDa	1/1000 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
V $\alpha$	55 kDa	1/500 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
V $\beta$	55 kDa	1/500 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA
VDAC	~ 30 kDa	1/1000 <sup>ème</sup>	Mitosciences, Oregon, USA

- Laver 3 fois 5 min. dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%
- Incuber la membrane pendant 1h à température ambiante sous agitation dans l'anticorps secondaire de lapin anti-souris conjugué à la peroxidase et dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%.
- Laver 3 fois 5 min. dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%

### Révélation

- Incuber pendant 1 minute dans le réactif de révélation par chimioluminescence ECL-Plus<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, UK) constitué de 2 ml de réactif A + 50  $\mu$ l de réactif B.
- Faire une capture du signal et quantifier l'intensité des bandes obtenues grâce à l'imageur « Molecular Imager ChemiDoc XRS System » (Biorad) et au logiciel d'analyse « Quantity One 1-D Analysis Software ».

## Fiche technique n° 21 :

### Isolement de mitochondries de cerveau de souris

L'isolement des mitochondries est basé sur le principe de centrifugation différentielle. La vitesse de la dernière centrifugation (6500 g) est inférieure à la précédente (10000 g) dans le but de bien nettoyer le culot de mitochondries.

#### Milieus et Réactifs :

- Tampon d'isolement (maintenir à 4°C. Conservation 1 mois.)
  - Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250mM
  - Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 10mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 1mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,25mg/ml

Amener le pH à 7,4

- Tampon de suspension (maintenir à 4°C. Conservation 1 semaine)
  - Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250mM
  - EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 2mM
  - Tris-base (*Eurobio, Paris, France*) : 20mM

Amener le pH à 7,4

#### Matériel :

- Un petit potter de 4ml et un gros de 50ml
- Un cristalliseur
- Une tige boule
- Des petits ciseaux
- Un entonnoir
- De la gaze
- 3 tubes à centrifugation à bouchons à vis

#### Technique :

Toutes les étapes se réalisent à 4°C. Après prélèvement, le cerveau est conservé dans 10 ml de tampon d'isolement et dans la glace.

- Peser le cerveau et le rincer rapidement dans le tampon d'isolement.
- Dans le cristallisateur, hacher le cerveau en petits morceaux aux ciseaux dans 5 ml de tampon d'isolement. Verser dans le gros potter et rincer le cristallisateur.
- Broyer au gros potter par 11 allers-retours, à 1000 tours/min jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Transférer dans le petit potter et broyer par 3 allers-retours.
- Centrifuger à 3200 g pendant 10 min. à 4°C pour éliminer les débris cellulaires, noyaux et synaptosomes (conserver le culot = C1).
- Filtrer le surnageant sur une couche de gaze et centrifuger à 10000 g pendant 10 min. à 4°C.
- Eliminer le surnageant (à conserver = S1) puis resuspendre doucement le culot dans 5 ml de tampon d'isolement.
- Centrifuger à 6500 g pendant 10 min. à 4°C.
- Eliminer le surnageant et ajouter 300 µl de tampon de suspension. Reprendre le culot de mitochondries avec la tige boule, puis le transférer dans un tube et conserver dans la glace.
- Faire un dosage de protéines en diluant les mitochondries au 1/25 et 1/50, C1 au 1/25 et S1 au 1/10.



## Fiche Technique n° 22 :

### Oxygraphie sur mitochondries isolées de cerveau de souris

La consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP liées à l'oxydation des substrats du complexe I (malate-pyruvate) ou du complexe II (succinate) ont été mesurées. Pour les mesures en présence de succinate, de la roténone (inhibiteur du complexe I) est ajoutée afin d'empêcher un flux réverse d'électrons du complexe II au complexe I. De plus, afin de nous assurer de l'intégrité de nos mitochondries, du cytochrome *c* est ajouté en cours d'expérimentation. Si l'intégrité de la membrane mitochondriale externe n'est pas préservée suite à l'isolement, le cytochrome *c* sera accessible au complexe IV et la respiration sera stimulée. Au cours de ces oxygraphies, des prélèvements ont été réalisés afin de doser la synthèse d'ATP.

#### Milieux et Réactifs :

##### ▪ Tampon de respiration

- Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 225 mM
- Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 1 mM
- MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 4 mM
- BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml

Ajuster à pH 7,4

- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- ADP<sup>+</sup> (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 100 mM
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1mg/ml
- Ascorbate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 M
- TMPD (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 M
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200 mM
- Azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM

- Cytochrome *c* (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 320  $\mu$ M
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM

### Technique :

#### Oxygraphie en Malate - Pyruvate

Dans la cuve de mesure placer 3,1 ml de tampon de respiration – volume de mitochondries correspondant à 0,1 mg/ml de mitochondries soit 0,3 mg.

Après stabilisation du flux, ajouter :

- Malate 0,5 M : 30  $\mu$ l (5 mM final)
- Pyruvate 0,5 M : 15  $\mu$ l (2,5 mM final)
- ADP 100 mM : 15  $\mu$ l (0,5 mM final)

Attendre l'établissement d'un plateau, puis ouvrir la cuve. Prélever alors 5 fois 200 $\mu$ l à la pipette, toutes les 30 secondes pour déterminer la synthèse d'ATP. Les ajouter à 200 $\mu$ l d'acide perchlorique 7%.

Puis ajouter :

- Antimycine A 1 mg/ml : 4  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ml final)
- Ascorbate 1 M : 20  $\mu$ l (10 mM final)
- TMPD 0,1 M : 20  $\mu$ l (1 mM final)
- KCN 200 mM : 20  $\mu$ l (2 mM final)
- Azide 100 mM : 2  $\mu$ l (1  $\mu$ M final)

Centrifuger les prélèvements pour le dosage d'ATP à 8000g pendant 10 min et transvaser 300 $\mu$ l de surnageant dans un eppendorf stérile. Conserver à -80°C jusqu'au dosage.

### Oxygraphie en Succinate-Roténone

Dans la cuve de mesure placer 3,1 ml de tampon de respiration – volume de mitochondries correspondant à 0,1 mg/ml de mitochondries soit 0,3 mg.

Après stabilisation du flux, ajouter :

- Succinate 0,5 M :            30 $\mu$ l            (5 mM final)
- Roténone 2,5 mM :        12 $\mu$ l            (10  $\mu$ M final)
- ADP 100 mM :            15 $\mu$ l            (0,5 mM final)

Attendre l'établissement d'un plateau, puis ouvrir la cuve. Prélever alors 5 fois 200 $\mu$ l à la pipette, toutes les 30 secondes pour déterminer la synthèse d'ATP. Les ajouter à 200 $\mu$ l d'acide perchlorique 7%.

Puis ajouter :

- Cytochrome *c* 320  $\mu$ M :    50 $\mu$ l            (8  $\mu$ M final)
- Oligomycine 1 mg/ml :    4 $\mu$ l            (2  $\mu$ g/ml final)
- FCCP 1 mM:                2 $\mu$ l            (1  $\mu$ M final)

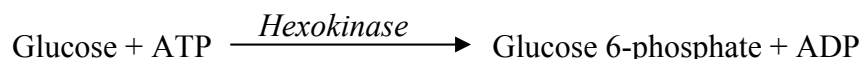
Centrifuger les prélèvements pour le dosage d'ATP à 8000g pendant 10 min et transvaser 300 $\mu$ l de surnageant dans un eppendorf stérile. Conserver à -80°C jusqu'au dosage.

## Fiche Technique n° 23 :

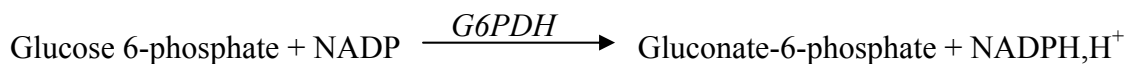
### Mesure de la Synthèse d'ATP de mitochondries isolées de cerveau de souris par spectrophotométrie

Le principe du dosage repose sur la transformation de l'ATP produit par la mitochondrie en NADPH par l'utilisation d'un système d'enzyme.

En présence d'ATP, le glucose va être phosphorylé par la glucose hexokinase (HK).



Le glucose 6-phosphate produit est déshydrogéné en présence de NADP par la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH).



La variation d'absorbance liée à la production du NADPH et mesurée à 340 nm au spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) est directement proportionnelle au taux de synthèse d'ATP.

#### Milieux et réactifs :

##### ▪ Tampon de respiration

- Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 225 mM
- Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 1 mM
- MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 4 mM
- BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml

Ajuster à pH 7,4

- Glucose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- NADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 7 mM
- Hexokinase (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 U/ml
- G6PDH (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 U/ml

### Technique :

- Neutraliser les prélèvements obtenus lors de l'oxygraphie (*cf.* fiche n°22) à l'aide d'un papier pH et de solution de KOH 5M et d'HCl 5M.
- Dans une cuve de spectrophotomètre, ajouter :
  - Glucose 0,5 M : 2 µl soit 1 mM final
  - NADP 7 mM : 71 µl soit 0,5 mM final
  - Hexokinase 5 U/ml : 180 µl soit 0,9 U/ml final
  - Prélèvement neutralisé : 200 µl
  - Tampon de respiration : 507 µl
- Faire un blanc identique où le prélèvement est remplacé par de l'eau bidistillée autoclavée.
- Lire au spectrophotomètre la densité optique à 340 nm (DO1) contre le blanc
- Démarrer la réaction par ajout de 40 µl de G6PDH 2,5 U/ml soit 0,1 U/ml final
- Transvaser le mélange dans un tube à hémolyse et incuber au bain marie pendant 1 heure à 37°C
- Lire au spectrophotomètre la densité optique à 340 nm (DO2) contre le blanc

La variation de densité optique est mesurée et la synthèse d'ATP en nmol de NADH formé/minute/mg de protéines est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Synth}_{(\text{ATP})} = \frac{(\Delta\text{DO})}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{NADH}}} \times \frac{10^3}{C_{\text{mito}}}$$

$\text{Synth}_{(\text{ATP})}$  : Synthèse d'ATP en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta\text{DO}$ : variation de densité optique par minute à 340 nm

$l$  : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{NADH}}$ : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{\text{NADH}}$  : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

$C_{\text{mito}}$  : concentration de protéines mitochondriales dans le dosage en mg.ml<sup>-1</sup>

## Fiche technique n° 24 : Détermination de la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante sur mitochondries isolées

Le potentiel de membrane est mesuré par l'utilisation d'une électrode sensible au TPMP selon la méthode de Brand (1995). Le principe repose sur l'équilibration, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, d'une molécule-sonde chargée positivement (TPMP<sup>+</sup>). Le TPMP<sup>+</sup> qui est une molécule lipophile va diffuser dans la matrice en fonction du potentiel électrique jusqu'à atteindre un équilibre comme décrit par l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi = 2,3 (RT/F) \log ([TPMP^+]_{in}/[TPMP^+]_{out})$$

L'accumulation du TPMP<sup>+</sup> est mesurée indirectement en déterminant sa concentration extramitochondriale à l'aide d'une électrode sensible au TPMP. Cependant la force proton-motrice ( $\Delta p$ ) est l'addition du potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ; différence de charge électrique de part et d'autre de la membrane interne) et du gradient de protons ( $\Delta pH$ ; différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne) :

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2,3 RT \Delta pH$$

L'ajout de nigéricine (catalyseur de l'antiport  $K^+/H^+$ ) dissipe le  $\Delta pH$  et le transforme en potentiel électrique. Finalement la force proton-motrice est directement proportionnelle au potentiel de membrane.

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est déterminée à l'aide d'une électrode sensible à l'oxygène (*cf.* fiche technique oxy)

La consommation d'oxygène et le potentiel de membrane sont déterminés en parallèle, dans la même cuve de mesure et sont inhibés progressivement par des concentrations croissantes et non-saturantes de malonate (inhibiteur du complexe II) ou de roténone (inhibiteur du complexe I) en présence d'oligomycine. La consommation d'oxygène est donc proportionnelle à l'utilisation de la force proton-motrice par la fuite de protons et est contrôlée par la fuite de protons et le système d'oxydation. Les différents points obtenus correspondent donc à la consommation d'oxygène nécessaire pour le maintien d'un potentiel de membrane

donné et décrivent ainsi une cinétique indicative de l'efficacité de l'utilisation de l'énergie rédox (fuite de protons et efficacité de pompage des protons) de la mitochondrie.

### Milieux et réactifs :

#### ▪ Tampon de respiration

- Sucrose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 225 mM
- Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 1 mM
- MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 4 mM
- BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml

Ajuster à pH 7,4

- Nigéricine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 80 µg/ml
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM, 1 et 10 ng/ml
- TPMP<sup>+</sup> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 mM
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Malonate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM et 500 mM
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM

### Technique :

Le potentiel de membrane est mesuré en présence des substrats du complexe I (malate et pyruvate) ou du complexe II (succinate).

- Dans la cuve de mesure injecter :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon de respiration	qsp 2000	
Nigéricine 80 µg/ml	2 µl	0,08 µg/ml
Oligomycine 1 mg/ml	4 µl	2 µg/ml
Roténone 2,5 mM ( <i>Uniquement pour les mesures en succinate</i> )	8 µl	5 µM

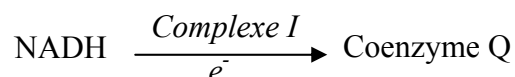
- Immerger l'électrode sensible au TPMP dans la cuve de mesure.
- Calibrer l'électrode par 4 additions successives de 2  $\mu$ l de TPMP+ 0,5 mM soit 0,5  $\mu$ M à chaque injection (attendre la stabilité entre chaque addition).
- Injecter 1 mg/ml de mitochondries soit 2 mg.
- Ajouter les substrats : 5 mM malate et 2,5 mM pyruvate ou 5mM succinate.
- Inhiber progressivement la respiration par l'ajout de concentrations croissantes et non saturantes de roténone 1 et 10 ng/ml (1-90 ng) afin d'inhiber l'utilisation du malate et du pyruvate par la chaîne respiratoire ou de malonate 100 et 500 mM (0,1-5,5 mM) afin d'inhiber l'utilisation du succinate par la chaîne respiratoire.
- Dissiper le potentiel électrique par l'ajout de 2  $\mu$ M de FCCP.



## Fiche technique n° 25 :

### Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (Complexe I) sur mitochondries isolées de cerveau de souris

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH par le complexe I.



Le complexe I transfère les électrons du NADH au coenzyme Q. Dans le dosage, le coenzyme Q est remplacé par un analogue, la décylubiquinone. Cependant, le NADH peut aussi être oxydé par la cytochrome  $b_5$  réductase de la membrane mitochondriale externe. Le dosage est donc également réalisé en présence de roténone (inhibiteur du complexe I) pour soustraire l'activité non sensible à la roténone et donc non spécifique du complexe I.

#### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Décylubiquinone (*Biomol Research Labs, PA, USA*) : 25 mM
- NADH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 10 mM

#### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (<math>\mu\text{l}</math>)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,5	500	50 mM
BSA sans acides gras 50 mg/ml	75	3,75 mg/ml
Décylubiquinone 25 mM	4	0,1 mM
Eau ppi	400	

Mitochondries 1µg/µl (diluées dans le tampon M)	10	10 µg
--	----	-------

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 10 µl de NADH 10 mM soit 100 µM final
- Suivre la variation d'absorbance à 340 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre
- Faire le même dosage avec 4 µl de roténone 2,5 mM dans le milieu réactionnel soit 10 µM final

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de NADH oxydé/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO^{-Rot} - \Delta DO^{+Rot})}{l \times \epsilon_{NADH} \times S_{n_{NADH}}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-Rot}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée sans roténone

$\Delta DO^{+Rot}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{NADH}$  : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{n_{NADH}}$  : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

$V_{mito}$  : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en µl, soit : 10

## Fiche technique n° 26 :

### Dosage de l'activité Succinate ubiquinone reductase (complexe II) sur mitochondries isolées de cerveau de souris

Ce dosage consiste à mesurer la réduction du dichlorophénol-indophénol (DCPIP).



Le complexe II transfère les électrons du succinate au coenzyme Q. Comme pour le dosage du complexe I, le coenzyme Q est remplacé dans le dosage par un analogue, la décylubiquinone. Le dosage est réalisé en présence d'un accepteur d'électrons artificiel, le DCPIP.

#### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,51 mM

#### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,5	500	50 mM
BSA sans acides gras 50 mg/ml	50	2,5 mg/ml
KCN 10 mM	100	1 mM

Roténone 2,5 mM	2	5 µM
Antimycine A 1 mg/ml	5	5 µg/ml
Succinate 0,5 M	60	30 mM
Mitochondries 1 µg/µl (diluées dans le tampon M)	5	5 µg
DCPIP 0,51 mM	195	100 µM

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 2 µl de decylubiquinone 25 mM soit 50 µM final
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP réduit/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO : variation de densité optique par minute à 600 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>DCPIP</sub>: coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

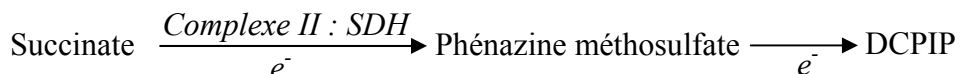
S<sub>nDCPIP</sub> : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

V<sub>mito</sub> : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en µl, soit : 5

## Fiche technique n° 27 :

### Dosage de l'activité Succinate déshydrogénase (complexe II) sur mitochondries isolées de cerveau de souris

Ce dosage consiste à mesurer la réduction du dichlorophénol-indophénol (DCPIP).



Ce dosage s'appuie sur le couplage de l'oxydation du succinate par l'activité SDH du complexe II avec la réduction d'un système artificiel d'accepteur d'électrons : le phénazine méthosulfate (PMS) et le DCPIP. Le dosage est réalisé en présence de thenoyl trifluoroacétone (TTFA), un inhibiteur du transfert d'électrons au coenzyme Q afin de doser uniquement l'activité succinate déshydrogénase du complexe II.

#### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Phénazine méthosulfate (PMS) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM
- Thénoyltrifluoroacétone (TTFA) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 40 mM
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,51 mM

#### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,5	500	50 mM
KCN 10 mM	150	1,5 mM

Succinate 0,5 M	35	17,5 mM
PMS 20 mM	50	0,1 mM
Mitochondries 1 µg/µl (diluées dans le tampon M)	20	20 µg
Eau ppi	40	
TTFA 40 mM	5	0,2 mM

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 200 µl de DCPIP 0,51 mM soit 100 µM final
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP réduit/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO : variation de densité optique par minute à 600 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>DCPIP</sub>: coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

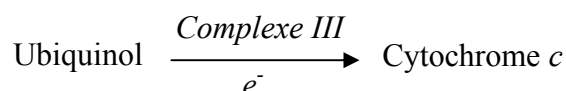
S<sub>nDCPIP</sub> : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

V<sub>mito</sub> : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en µl, soit : 20

## Fiche technique n° 28 :

### Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome *c* réductase (complexe III) sur mitochondries isolées de cerveau de souris

Ce dosage consiste à mesurer la réduction du cytochrome *c*.



Le complexe III permet le transfert des électrons du coenzyme Q réduit (ubiquinol) au cytochrome *c*. L'ubiquinol est remplacé dans le dosage par un analogue : le décylubiquinol. Le dosage est aussi effectué en présence d'antimycine (inhibiteur du complexe III) pour quantifier la réduction du cytochrome *c* non spécifique du complexe III.

#### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200 mM, pH 7,5
- BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*): 1 mM, pH 7,4
- Cytochrome *c* oxydé (*Acros, Noisy-Le-Grand, France*) : 1 mM
- Décylubiquinol (préparation : cf. fiche technique n° 10) : 25 mM

#### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 200 mM, pH 7,5	500	100 mM
BSA sans acides gras 50 mg/ml	20	1 mg/ml

KCN 10 mM	100	1 mM
EDTA 1 mM, pH 7,4	50	50 $\mu$ M
Cytochrome <i>c</i> oxydé 1 mM	100	100 $\mu$ M
Eau ppi	220	
Mitochondries 1 $\mu$ g/ $\mu$ l (diluées dans le tampon M)	5	5 $\mu$ g

- Incuber 30 secondes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 4  $\mu$ l de décylubiquinol 25 mM soit 100  $\mu$ M final
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre
- Faire le même dosage avec 5  $\mu$ l d'antimycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 5  $\mu$ g/ml final.

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome *c* réduit/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO^{-Anti} - \Delta DO^{+Anti})}{l \times \epsilon_{Cyt\ c} \times Sn_{Cyt\ c}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-Anti}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm sans antimycine

$\Delta DO^{+Anti}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm avec antimycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{Cyt\ c}$  : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm = 18,5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$Sn_{Cyt\ c}$  : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

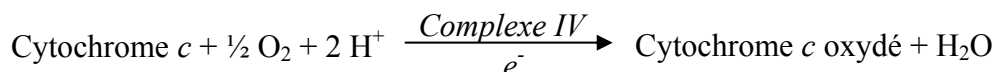
$V_{mito}$  : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en  $\mu$ l, soit : 5



## Fiche technique n° 29 :

### Dosage de l'activité Cytochrome c Oxydase - COX (complexe IV) sur mitochondries isolées de cerveau de souris

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du cytochrome *c*.



Le complexe IV catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome *c* ferreux par l'oxygène moléculaire. Cette réaction est l'étape finale de la chaîne respiratoire et permet donc d'évaluer la capacité oxydative des mitochondries.

#### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Cytochrome *c* réduit : 80 μM

#### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Cytochrome <i>c</i> réduit 80 μM	998	80 μM

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 2 μl de mitochondries 1 μg/μl diluées dans le tampon M soit 2 μg/ml final
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome *c* oxydé/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{Cyt\ c} \times Sn_{Cyt\ c}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO$ : variation de densité optique par minute à 550 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{Cyt\ c}$ : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm = 18,5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$Sn_{Cyt\ c}$  : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

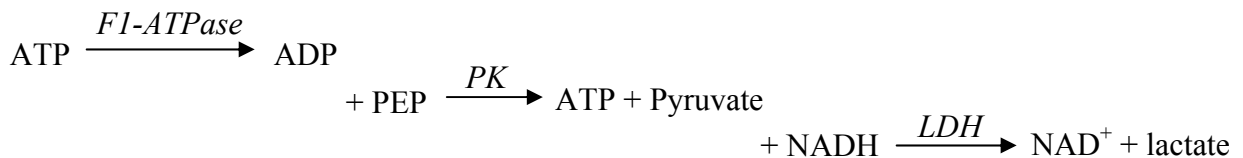
$V_{mito}$  : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en  $\mu$ l, soit : 2

### **Préparation du cytochrome *c* réduit (80 $\mu$ M) :**

- Diluer la solution de Cytochrome *c* oxydé 1 mM (12,9 mg/ml H<sub>2</sub>O) : 0,8 ml + 9,2 ml de tampon phosphate 55 mM, pH 7,0 (C).
- Oxyder 1 ml de cette solution (O) par quelques cristaux de ferricyanure de potassium.
- Réduire 1 ml de cette solution (R) par quelques cristaux de dithionite de sodium.
- Mesurer le rapport des densités optiques à 550/560 nm des solutions oxydées et réduites
- Le rapport sera proche de 1,16 pour la solution 100% oxydée et entre 9 et 10 pour la 100% réduite.
- A partir des densités optiques à 550 nm, on calcule la DO à obtenir pour avoir une solution de cytochrome *c* à 80  $\mu$ M réduite entre 92 et 97 % en utilisant les formule suivantes :
  - $DO_{(92\%)} = DO \text{ 100\% oxydée} + [(DO \text{ 100\% réduite} - DO \text{ 100\% oxydée}) \times 0,92]$
  - $DO_{(97\%)} = DO \text{ 100\% oxydée} + [(DO \text{ 100\% réduite} - DO \text{ 100\% oxydée}) \times 0,97]$
- Ajouter le cytochrome *c* réduit obtenu précédemment (solution R) par fractions de 20  $\mu$ l aux 8 ml de cytochrome *c* 80  $\mu$ M (C) restant et mesurer la densité optique à 550 nm de façon à obtenir la DO désirée et être à 92-97% de réduction.

## Fiche technique n° 30 : Dosage de l'activité F1-ATPase (complexe V) sur mitochondries isolées de cerveau

La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP + Pi. Cette réaction est réversible. Le principe de la réaction consiste donc à mesurer l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi par la F<sub>1</sub>-ATPase, la formation d'ADP étant couplée à la formation de NAD<sup>+</sup> en présence de phosphoénol pyruvate (PEP), de NADH, de la pyruvate kinase (PK) et de la lactate déshydrogénase (LDH). Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH. Le NADH peut aussi être oxydé par la cytochrome *b*<sub>5</sub> réductase de la membrane mitochondriale externe. Le dosage est donc également réalisé en présence d'oligomycine (inhibiteur du complexe V) pour soustraire l'activité non sensible à l'oligomycine et donc non spécifique du complexe V.



### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM
 Ajuster à pH 7,4
- Tampon G1
  - PEP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - ATP (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 0,5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
  - KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 50 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml
 Ajuster à pH 8,0
- Tampon G2 :  
Pour 5 ml de tampon G1, ajouter :
  - FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) 10 mM : 1,5 µl soit 3 µM final
  - Antimycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) 2,5 mg/ml : 1 µl soit 0,5 µg/ml

- LDH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) 5 U/ $\mu$ l : 20  $\mu$ l soit 20 mU/ $\mu$ l
- PK (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) 5 U/ $\mu$ l : 20  $\mu$ l soit 20 mU/ $\mu$ l

### Technique :

- Avant le dosage, diluer 50  $\mu$ l de mitochondries à 1  $\mu$ g/ $\mu$ l avec 950  $\mu$ l d' $H_2O$  dans un tube à hémolyse résistant à la sonication.
- Soniquer les mitochondries, maintenues dans la glace, 6 x 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication et en prenant garde que la sonde soit au centre du tube et de la suspension de mitochondries. Le sonicateur est réglé à une amplitude de 39%.
- Préparer deux tubes à hémolyse en verre contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (<math>\mu</math>l)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon G2	200	
Eau ppi	590	
Mitochondries diluées soit 50 $\mu$ g/ml	200	10 $\mu$ g

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 10  $\mu$ l de NADH 15 mM soit 150  $\mu$ M final
- Suivre la variation d'absorbance à 340 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre
- Faire le même dosage avec 10  $\mu$ l d'oligomycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 10  $\mu$ M final

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de NADH oxydé/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO^{-Oligo} - \Delta DO^{+Oligo})}{l \times \epsilon_{NADH} \times S_{n_{NADH}}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-Oligo}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm sans oligomycine

$\Delta DO^{+Oligo}$  : variation de densité optique par minute à 340 nm avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{NADH}$  : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

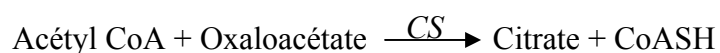
$S_{n_{NADH}}$  : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

$V_{mito}$  : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en  $\mu$ l, soit : 10

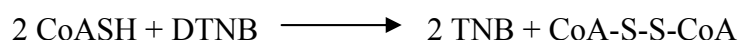
## Fiche technique n° 31 : Dosage de l'activité Citrate synthase (CS) sur mitochondries isolées de cerveau

La citrate synthase (CS) est une enzyme clé du cycle de l'acide citrique (cycle de KREBS) se déroulant dans la matrice mitochondriale. Elle est spécifique aux mitochondries et le dosage de son activité est généralement utilisé comme un marqueur enzymatique quantitatif reflétant le contenu cellulaire en mitochondries (Jackman et Willis, 1996 ; Kirby *et al.*, 1999).

Cette enzyme catalyse la formation de l'acide citrique à partir de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate.



Le dosage est réalisé grâce à l'utilisation de l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le CoASH issu de la réaction catalysée par la citrate synthase va réagir avec le DTNB pour former du trinitrobenzène (TNB). Le dosage consiste à mesurer la formation du trinitrobenzène (TNB).



### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1 M, pH 8,1
- DTNB (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Acétyl CoA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %
- Oxaloacétate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM

### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
DTNB 1mM (repris dans du tampon Tris 1 M, pH 8,1)	150	150 μM
Oxaloacétate 10 mM	50	500 μM
Acétyl CoA 10 mM	30	300 μM
Triton 10 %	10	0,1 %
Eau ppi	750	

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 10 μl de mitochondries 1 μg/μl diluées dans le tampon M soit 10 μg/ml final
- Suivre la variation d'absorbance à 412 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de TNB formé minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times S_{\text{TNB}}} \times \frac{10^3}{V_{\text{mito}}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 412 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

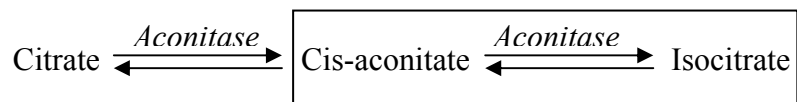
ε<sub>TNB</sub> : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm = 13,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>TNB</sub> : nombre stoechiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit : 1

V<sub>mito</sub> : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en μl, soit : 10

## Fiche technique n° 32 : Dosage de l'activité Aconitase sur mitochondries isolées de cerveau de souris

L'aconitase est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Cette protéine catalyse la réaction d'interconversion du citrate en isocitrate via le cis-aconitate. Le dosage consiste à mesurer le cis-aconitate absorbant à 240 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Krebs et Holzach, 1952.



Cette enzyme contient un centre fer-souffre ce qui fait que son activité est sensible aux espèces réactives de l'oxygène. Une baisse d'activité sera donc un indicateur indirect de la production de ROS.

### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mM
 Ajuster à pH 7,4
- Tampon Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 100mM pH7,4
- MnCl<sub>2</sub> (Chlorure de manganèse) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10mM
- Isocitrate de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,4	500	50 mM
Chlorure de Manganèse 10 mM	50	0,5 mM
Isocitrate de sodium 0,5 M	200	100 mM
Triton 10 %	10	0,1 %

Eau ppi	220	
---------	-----	--

- Incuber 5 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 µl de mitochondries 1 µg/µl diluées dans le tampon M soit 20 µg/ml final
- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 240 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

Remarque : l'activité est sensible à la présence de xanthine et xanthine oxydase

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de cis-aconitate/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{Aco} \times S_{n_{Aco}}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 240 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>Aco</sub> : coefficient d'extinction molaire du cis- aconitate à 240 nm = 3,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

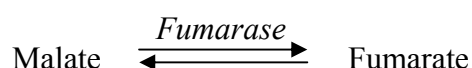
S<sub>n<sub>Aco</sub></sub> : nombre stoechiométrique du cis- aconitate dans l'équation de la réaction, soit : 1

V<sub>mito</sub> : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en µl, soit : 20



## Fiche technique n° 33 : Dosage de l'activité Fumarase sur mitochondries isolées de cerveau de souris

La fumarase (ou fumarate hydratase), est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Elle catalyse l'hydratation du fumarate en L-malate qui est une réaction réversible. Ainsi, en présence de malate, la fumarase produit du fumarate absorbant à 250 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Hill et Bradshaw, 1969.



### Réactifs :

- Tampon M (tampon de resuspension des mitochondries)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 280 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 10 mMAjuster à pH 7,4
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH7,4
- EDTA (*Boehringer Ingelheim, Reims, France*) : 10 mM, pH7,4
- Malate (repris dans le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH7,4
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

### Technique :

- Préparer deux tubes à hémolyse en plastique contenant :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,4	850	85 mM
EDTA 10 mM, pH 7,4	10	0,1 mM
Malate 0,5 M	100	50 mM
Triton 10 %	20	0,2 %

- Incuber 5 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 μl de mitochondries 1 μg/μl diluées dans le tampon M soit 20 μg/ml final

- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 250 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre

La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de fumarate/minute/mg de protéine est déterminée selon la formule suivante :

$$AS \text{ (mito)} = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{Fum} \times S_{n_{Fum}}} \times \frac{10^3}{V_{mito}}$$

AS (mito) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO$ : variation de densité optique par minute à 250 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{Fum}$  : coefficient d'extinction molaire du fumarate à 250 nm = 4,88 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{n_{Fum}}$  : nombre stoechiométrique du fumarate dans l'équation de la réaction, soit : 1

$V_{mito}$  : volume de mitochondrie ajouté dans le mélange réactionnel en  $\mu$ l, soit : 20

## Fiche technique n° 34 : Estimation de l'activité du $mK_{ATP}$ par mesure du gonflement mitochondrial au spectrophotomètre

L'ouverture du  $mK_{ATP}$  permet l'entrée du potassium dans la mitochondrie. Cette entrée de potassium s'accompagne d'une entrée d'eau qui provoque un gonflement de la matrice mitochondrial. Ce gonflement peut être déterminé par mesure de la décroissance de la densité optique au spectrophotomètre à 520 nm.

### Réactifs :

- Tampon KCl
  - KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM
  - Hepes (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml
  - EGTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100  $\mu$ M
  - MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mMAjuster à pH 7,2
- Tampon NaCl
  - NaCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM
  - Hepes (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1 mg/ml
  - EGTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100  $\mu$ M
  - MgCl<sub>2</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mMAjuster à pH 7,2
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- ATP (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 100 mM
- DZX (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM
- 5HD (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM
- Malonate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM

### Technique :

- Ajouter à 10 ml de milieu KCl : Tampon KCl(+)
  - Succinate 0,5 M : 20  $\mu$ l soit 10 mM final
  - Oligomycine 1 mg/ml : 2  $\mu$ l soit 2  $\mu$ g/ml final
  - Roténone 2,5 mM: 4  $\mu$ l soit 10  $\mu$ M final
- Ajouter à 10 ml de milieu NaCl : Tampon NaCl(+)
  - Succinate 0,5 M : 20  $\mu$ l soit 10 mM final
  - Oligomycine 1 mg/ml : 2  $\mu$ l soit 2  $\mu$ g/ml final
  - Roténone 2,5 mM: 4  $\mu$ l soit 10  $\mu$ M final

- Préparer 7 tubes avec du milieu KCl (+) comme ci-dessous :

<i>Tube</i>	<i>KCl(+)</i>	<i>ATP 100 mM</i>	<i>DZX 20 mM</i>	<i>5HD 100 mM</i>	<i>Malonate 20 mM</i>
<b>N° 1 : Contrôle</b>	1000 $\mu$ l				
<b>N° 2 : ATP</b>	990 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)			
<b>N° 3 : ATP + DZX</b>	985 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)	5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)		
<b>N° 4 : ATP + DZX + 5HD</b>	980 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)	5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)	5 $\mu$ l (500 $\mu$ M)	
<b>N° 5 : ATP + Malonate</b>	985 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)			5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)
<b>N° 6 : ATP + Malonate + 5HD</b>	980 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)		5 $\mu$ l (500 $\mu$ M)	5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)
<b>N° 7 : 5HD</b>	995 $\mu$ l			5 $\mu$ l (500 $\mu$ M)	

- Préparer 3 tubes avec du milieu NaCl (+) comme ci-dessous :

<i>Tube</i>	<i>KCl(+)</i>	<i>ATP 100 mM</i>	<i>DZX 20 mM</i>	<i>Malonate 20 mM</i>
<b>N° 1 : ATP</b>	990 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)		
<b>N° 2 : ATP + DZX</b>	985 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)	5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)	
<b>N° 3 : ATP + Malonate</b>	985 $\mu$ l	10 $\mu$ l (1 mM)		5 $\mu$ l (100 $\mu$ M)

Ces tubes sont des contrôles. Ils permettent de s'assurer de la spécificité du potassium vis-à-vis du  $mK_{ATP}$ .

- Incuber les tubes à 37°C
- Faire un blanc au spectrophotomètre avec de l'eau
- Mettre 0,5mg/ml de mitochondries isolées soit 10µl à 1 mg/ml dans chaque cuve
- Pour chaque milieu préparé préalablement dans les tubes, ajouter 200µl de milieu dans les cuves contenant les mitochondries et déclencher la lecture aussitôt sur 30 secondes.  
*(Remarque : la réaction se fait dans les premières secondes).*

AUTRES  
PUBLICATIONS

### **Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect.**

Nochez Y, Arsene S, Gueguen N, Chevrollier A, Ferré M, Guillet V, Desquiret V, Toutain A, Bonneau D, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Pisella PJ, Reynier P.

*Molecular vision*, 2009 Mar, 15: 598-608.

**PURPOSE:** Autosomal dominant optic atrophy (ADOA, OMIM 165500), an inherited optic neuropathy that leads to retinal ganglion cell degeneration and reduced visual acuity during the early decades of life, is mainly associated with mutations in the *OPA1* gene. Here we report a novel ADOA phenotype associated with a new pathogenic *OPA1* gene mutation. **METHODS:** The patient, a 62-year-old woman, was referred for acute, painless, and severe visual loss in her right eye. Acute visual loss in her left eye occurred a year after initial presentation. MRI confirmed the diagnosis of isolated atrophic bilateral optic neuropathy. We performed DNA sequencing of the entire coding sequence and the exon/intron junctions of the *OPA1* gene, and we searched for the mitochondrial DNA mutations responsible for Leber hereditary optic atrophy by sequencing entirely mitochondrial DNA. Mitochondrial respiratory chain complex activity and mitochondrial morphology were investigated in skin fibroblasts from the patient and controls. **RESULTS:** We identified a novel heterozygous missense mutation (c.2794C>T) in exon 27 of the *OPA1* gene, resulting in an amino acid change (p.R932C) in the protein. This mutation, which affects a highly conserved amino acids, has not been previously reported, and was absent in 400 control chromosomes. Mitochondrial DNA sequence analysis did not reveal any mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy or any pathogenic mutations. The investigation of skin fibroblasts from the patient revealed a coupling defect of oxidative phosphorylation and a larger proportion of short mitochondria than in controls. **CONCLUSIONS:** The presence of an *OPA1* mutation indicates that this sporadic, late-onset acute case of optic neuropathy is related to ADOA and to a mitochondrial energetic defect. This suggests that the mutational screening of the *OPA1* gene would be justified in atypical cases of optic nerve atrophy with no evident cause.

### **Reversible Optic Neuropathy with OPA1 exon 5b mutation.**

Cornille K, Milea D, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Zazoun L, Guillet V, ElAhoury G, Delettre C, Gueguen N, Loiseau D, Muller A, Ferre M, Chevrollier A, Wallace D, Bonneau D, Hamel C, Reynier P, Lenears G.

*Annals of Neurology*, 2008 May, 63(5): 667-671.

A new c.740G>A (R247H) mutation in *OPA1* alternate spliced exon 5b was found in a patient presenting with bilateral optic neuropathy followed by partial, spontaneous visual recovery. R247H fibroblasts from the patient and his unaffected father presented unusual highly tubular mitochondrial network, significant increased susceptibility to apoptosis, oxidative phosphorylation uncoupling, and altered OPA1 protein profile, supporting the pathogenicity of this mutation. These results suggest that the clinical spectrum of the *OPA1*-associated optic neuropathies may be larger than previously described, and that spontaneous recovery may occur in cases harboring an exon 5b mutation.

### **Multiple sclerosis-like disorder in OPA1-related autosomal dominant optic atrophy.**

Verny C, Loiseau D, Scherer C, Lejeune P, Chevrollier A, Gueguen N, Guillet V, Dubas F, Reynier P, Amati-Bonneau P, Bonneau D.

*Neurology*, 2008 Mar, 70(13 Pt2): 1152-1153.

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is a progressive ophthalmologic disorder caused in two-thirds of the cases by a mutation in the optic atrophy 1 (*OPA1*) gene, a nuclear gene encoding a mitochondrial protein.<sup>1</sup> We report a patient in whom an *OPA1* mutation was responsible for bilateral optic atrophy associated with multiple sclerosis-like (MSL) features. In addition, biochemical studies performed on fibroblasts from this patient showed a significant mitochondrial coupling defect associated with reduced ATP production and respiratory function in comparison to controls.

### **Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease.**

Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferré M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthièry Y, Bonneau D, Reynier P.

*Annals of Neurology*, 2007 Apr, 61(4): 315-323.

**OBJECTIVE:** Mutations of the mitofusin 2 gene (*MFN2*) may account for at least a third of the cases of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2). This study investigates mitochondrial cellular bioenergetics in *MFN2*-related CMT2A. **METHODS:** Mitochondrial network morphology and metabolism were studied in cultures of skin fibroblasts obtained from four CMT2A patients harboring novel missense mutations of the *MFN2* gene. **RESULTS:** Although the mitochondrial network appeared morphologically unaltered, there was a significant defect of mitochondrial coupling associated with a reduction of the mitochondrial membrane potential. **INTERPRETATION:** Our results suggest that the sharply reduced efficacy of oxidative phosphorylation in *MFN2*-related CMT2A may contribute to the pathophysiology of the axonal neuropathy.



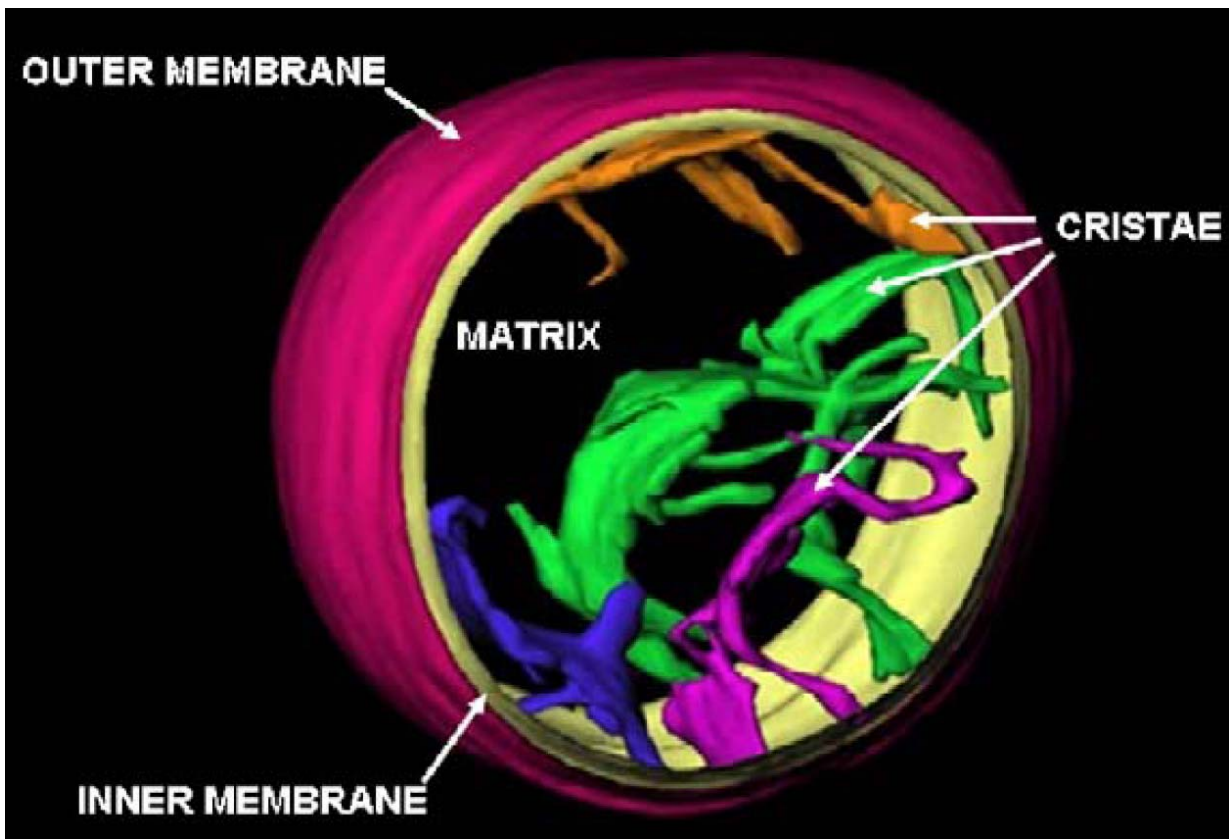
L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) et la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) sont deux neuropathies héréditaires respectivement liées aux mutations des gènes *OPA1* et *MFN2*. Les protéines OPA1 et MFN2 sont impliquées dans la dynamique de fusion des mitochondries. Ces organites intracellulaires sont essentiels dans les processus de synthèse d'ATP. L'hypothèse d'un déficit énergétique impliqué dans la physiopathologie de ces neuropathies devait alors être testée. Nous avons mis en évidence une baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives dans les fibroblastes de peau de patients atteints d'ADOA et de CMT2A. Ce découplage est associé à une baisse d'activité du complexe IV et à une augmentation de l'activité du complexe V dans le cas de l'ADOA. Dans le cas de la CMT2A, le découplage est associé à une augmentation de l'activité et de la quantité de la translocase des nucléotides adényliques (ANT). Une étude sur mitochondries isolées de cerveaux d'un modèle murin *MFN2*<sup>R94Q</sup> de CMT2A montre une baisse d'activité des complexes II et V associée à l'ouverture du canal mitochondrial potassique sensible à l'ATP ( $mK_{ATP}$ ). Nos résultats montrent qu'OPA1 et MFN2, deux protéines de la dynamique mitochondriale ont un rôle majeur dans la régulation énergétique mitochondriale.

### **Mitochondrial energetic metabolism in hereditary neuropathies associated with *OPA1* and *MFN2* genes mutations**

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) and Charcot-Marie-Tooth type 2A disease are two hereditary neuropathies associated with mutations in *OPA1* and *MFN2* genes respectively. These genes encode OPA1 and MFN2 proteins involved in mitochondrial fusion. Mitochondria being essential organelles for ATP production, we hypothesised that a mitochondrial energetic defect could take part in ADOA and CMT2A pathogenesis. We showed a decrease in oxidative phosphorylation efficiency in skin fibroblasts from patients affected by ADOA and CMT2A. This uncoupling was associated with a decrease in complex IV activity and an increase in complex V activity in ADOA fibroblasts. In CMT2A fibroblasts, the uncoupling was associated with increased adenine nucleotide translocase (ANT) activity and expression. Study of brain mitochondria from a *MFN2*<sup>R94Q</sup> mouse model of CMT2A showed mitochondrial complexes II and V deficiencies associated with ATP-sensitive potassium channels opening. These results demonstrated that OPA1 and MFN2 proteins involved in mitochondrial dynamics play a major role in mitochondrial energetic metabolism.

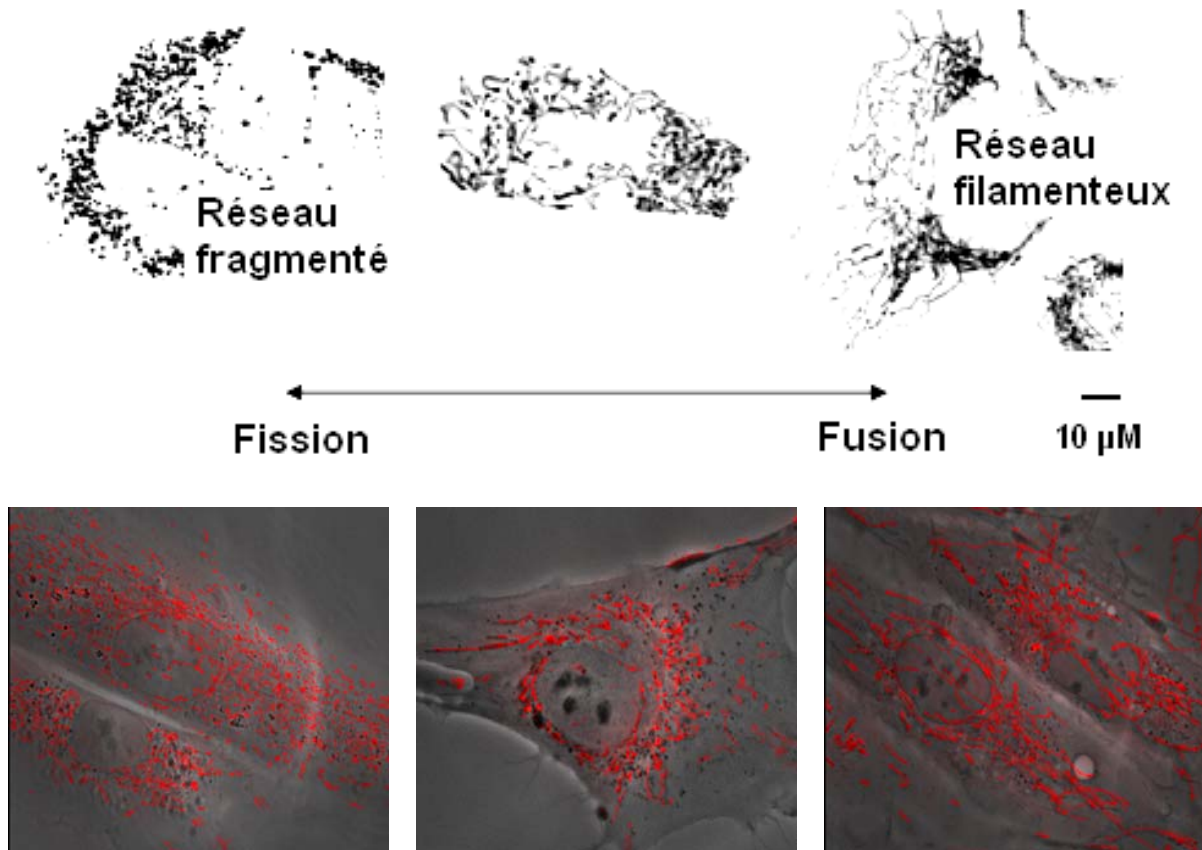
**Mots clés :** atrophie optique autosomique dominante, maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A, OPA1, MFN2, dynamique mitochondriale, fonction énergétique mitochondriale.

**Figure 1** : Modélisation de l'architecture mitochondriale par cryo-tomographie électronique à partir de mitochondries isolées de foie de rat (D'après Manella, 2006).



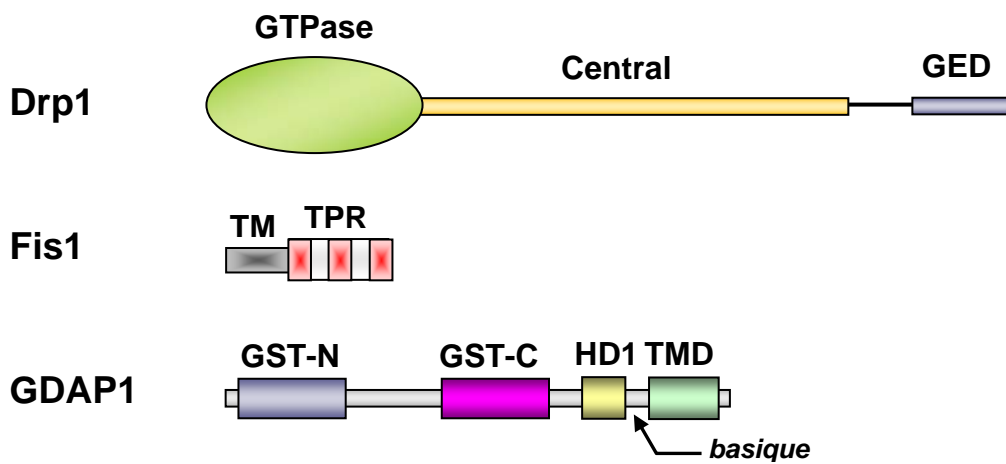
**Figure 2 : Morphologie du réseau mitochondrial**

Représentation des formes caractéristiques du réseau mitochondrial et morphologie du réseau dans des fibroblastes après marquage au MitoTracker rouge.



### **Figure 3 : La machinerie de fission mitochondriale**

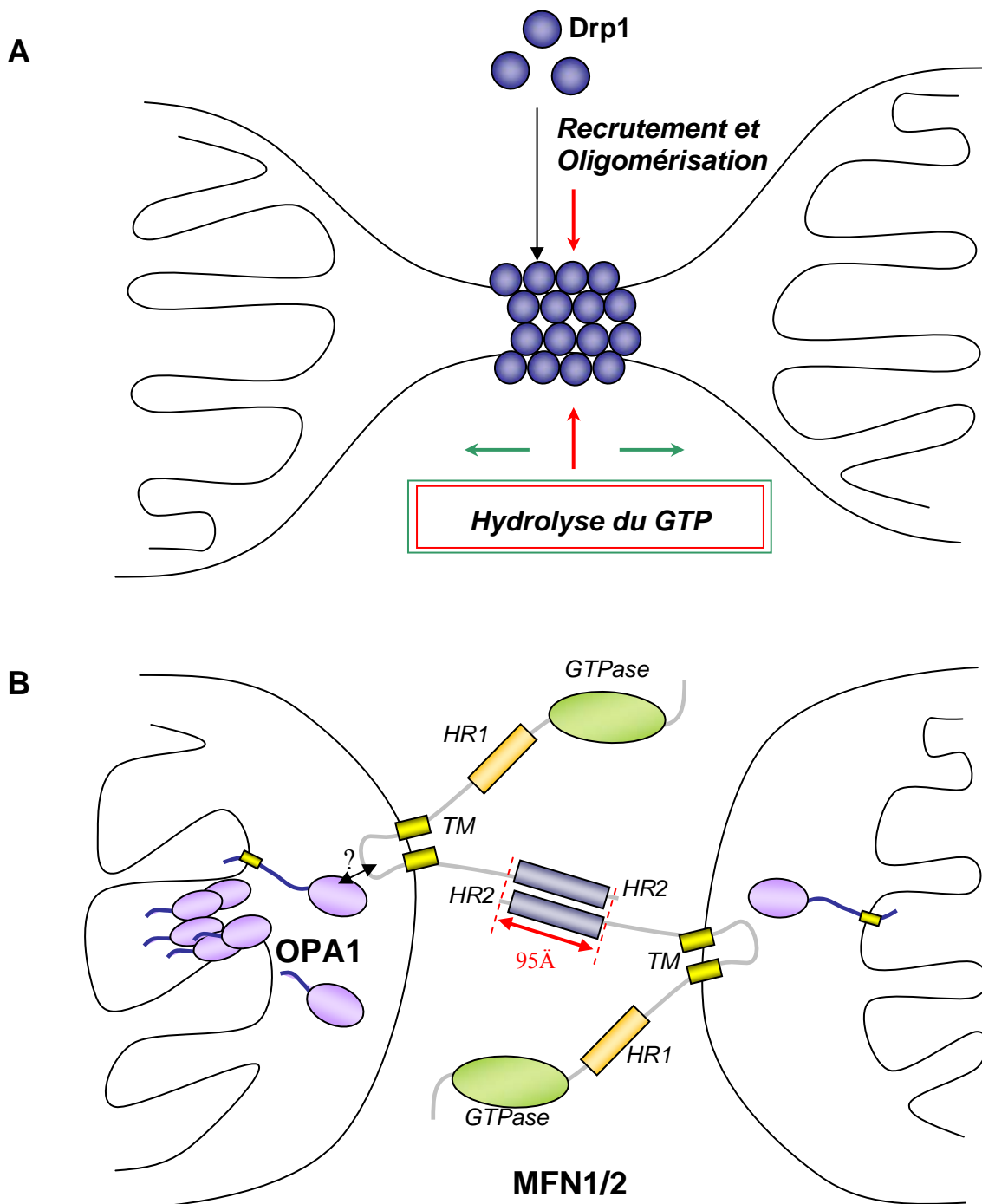
Représentation schématique des protéines Drp1, Fis1 et GDAP1. Drp1 possède des domaines caractéristiques de la famille des dynamines GTPases avec un domaine GTPase, un domaine central et un domaine GTPase effecteur (GED). Fis1 est constituée d'un domaine transmembranaire C-terminal (TM) et d'un domaine de six hélices alpha antiparallèles avec deux domaines tetratricopeptides (TPR). GDAP1 possède deux domaines caractéristiques des protéines GST (GST-N et GST-C), un domaine hydrophobe (HD1) et un domaine transmembranaire (TMD) encadrant une séquence basique importante pour la localisation et la fonction de la protéine.



**Figure 4 : Mécanisme moléculaire de la fission – fusion mitochondriale**

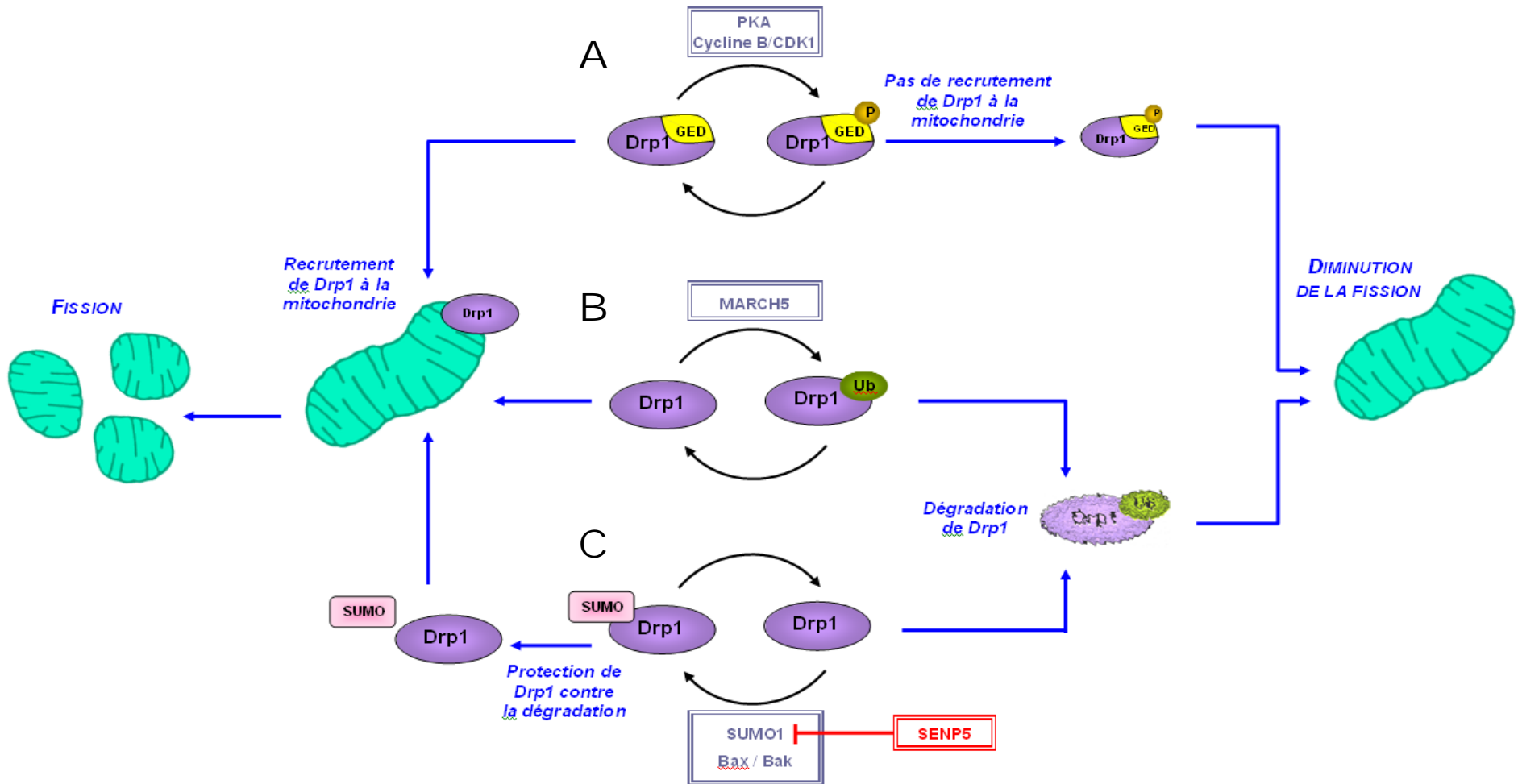
(A) *La fission mitochondriale* : Drp1 est recruté à la membrane mitochondriale et s'oligomérise au niveau des sites de fission. L'hydrolyse du GTP permet soit une constriction d'un anneau de protéines Drp1 (flèches rouges), soit un étirement d'une spirale de protéines Drp1 (flèches vertes) pour effectuer la fission.

(B) *La fusion mitochondriale* : Les mitofusines localisées à la surface des mitochondries adjacentes vont interagir au niveau de leur domaine HR2, favoriser le rapprochement des mitochondries et permettre leur fusion en présence de la protéine OPA1 qui intervient également dans ce processus.



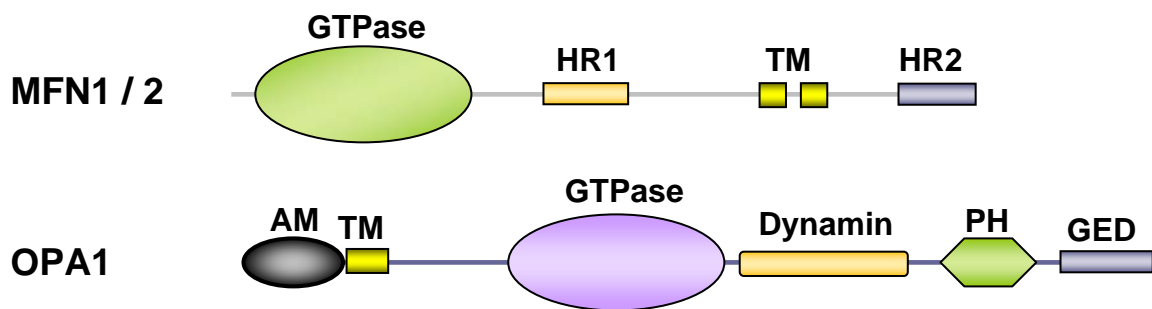
**Figure 5 : Régulation de la fission mitochondriale par phosphorylation, ubiquitination et sumoylation de Drp1.**

(A) La phosphorylation de Drp1 au niveau de son domaine GTPase effecteur (GED), inhibe l'auto-assemblage de la protéine et son recrutement à la mitochondrie. (B) L'ubiquitination de Drp1 par MARCH5 entraîne la dégradation de Drp1 par le protéasome. (C) Drp1 est également la cible de phénomènes de sumoylation par la protéine SUMO1 ou par les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. La sumoylation de Drp1 protège Drp1 de la dégradation et favorise la fission. SENP5 est une protéase SUMO-spécifique qui inhibe la sumoylation de Drp1 par SUMO1.



**Figure 6 : La machinerie de fusion mitochondriale.**

Représentation schématique des protéines mitofusine 1 et 2 (MFN1/2) et OPA1. Les mitofusines possèdent un domaine GTPase caractéristique de la famille des dynamines, deux structures « coiled-coil » constituées de motifs hydrophobes heptad repeat 1 et 2 (HR1, HR2) et un double domaine transmembranaire (TM). OPA1 possède une séquence d'adressage mitochondriale (AM), un domaine transmembranaire (TM), un domaine GTPase, un domaine dynamine, un domaine d'homologie aux pleckstrines (PH) et un domaine effecteur GTPase (GED).

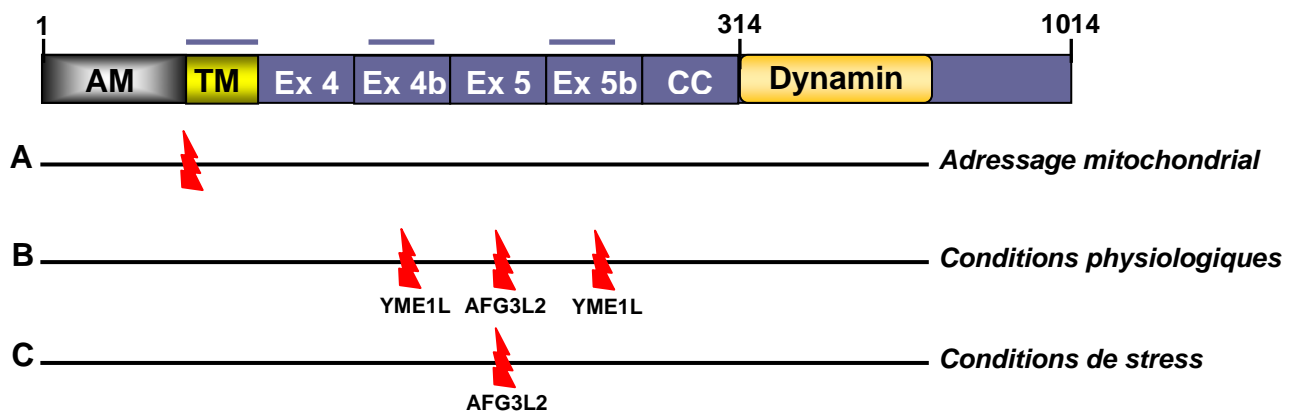


**Figure 7 : Régulation de OPA1 par clivage protéolytique** (D'après Lenaers *et al.*, 2009).

Les domaines de l'extrémité N-terminale de OPA1 sont représentés, incluant les domaines correspondant aux exons alternatifs 4, 4b et 5b, les trois domaines transmembranaires (TM + lignes noires), la séquence d'adressage mitochondriale (AM), le domaine coiled-coil (CC) et le domaine dynamine. Les numéros correspondent à la position des acides aminés de l'isoforme 8 de la protéine OPA1 qui contient tous les exons alternatifs.

(A) Le premier clivage par la peptidase mitochondriale (MPP) survient lors de l'adressage de OPA1 à la mitochondrie et génère des isoformes longues. (B) Le second clivage est aussi un clivage physiologique qui survient à trois sites différents générant des isoformes courtes. Les exons 4b et 5b sont clivés par la protéase YME1L tandis que l'exon 5 est clivé par la protéase AFG3L2. (C) Dans des conditions de stress, un troisième clivage par la protéase AFG3L2 touchant les isoformes longues survient au niveau de l'exon 5.

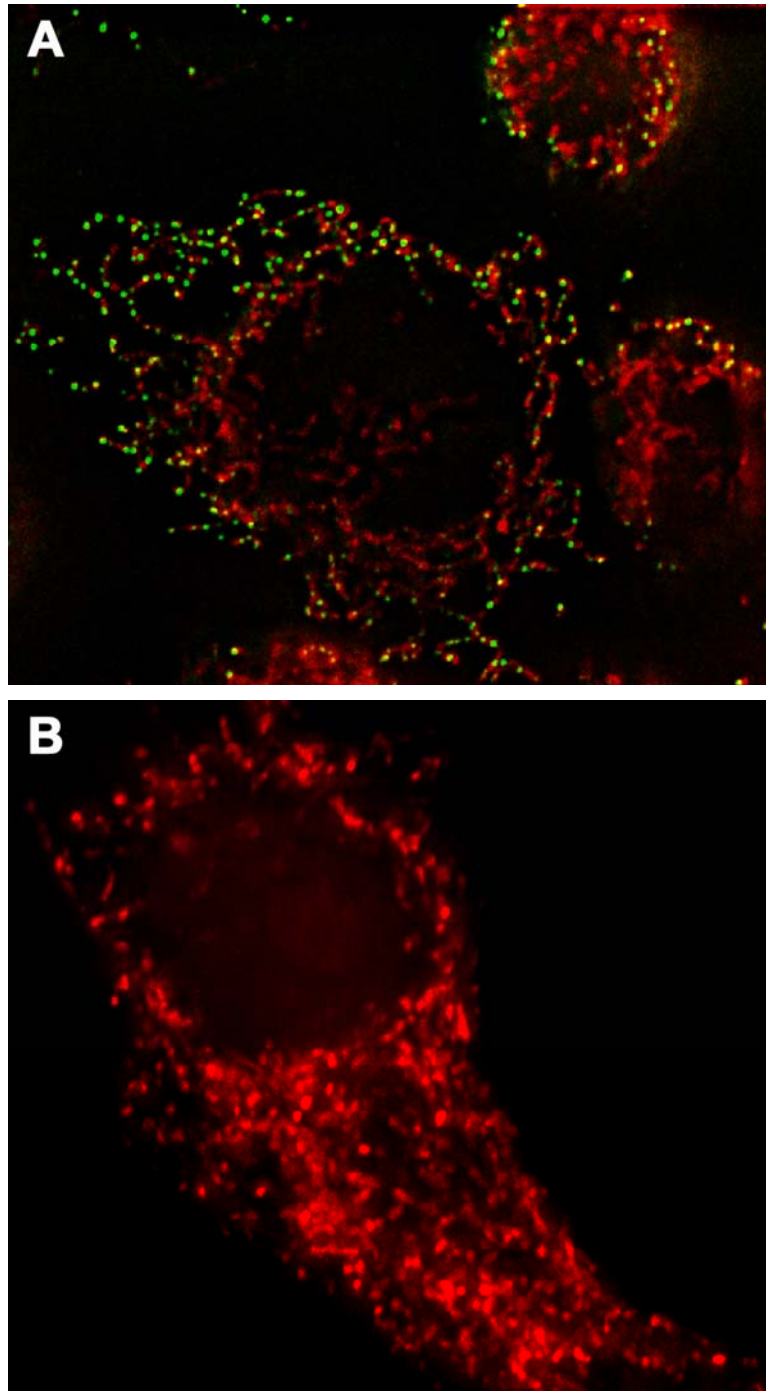
La romboïde sérine protéase PARL génère une forme soluble de OPA1 ayant une fonction anti-apoptotique mais la localisation de ce clivage sur la séquence de OPA1 n'est pas connue.





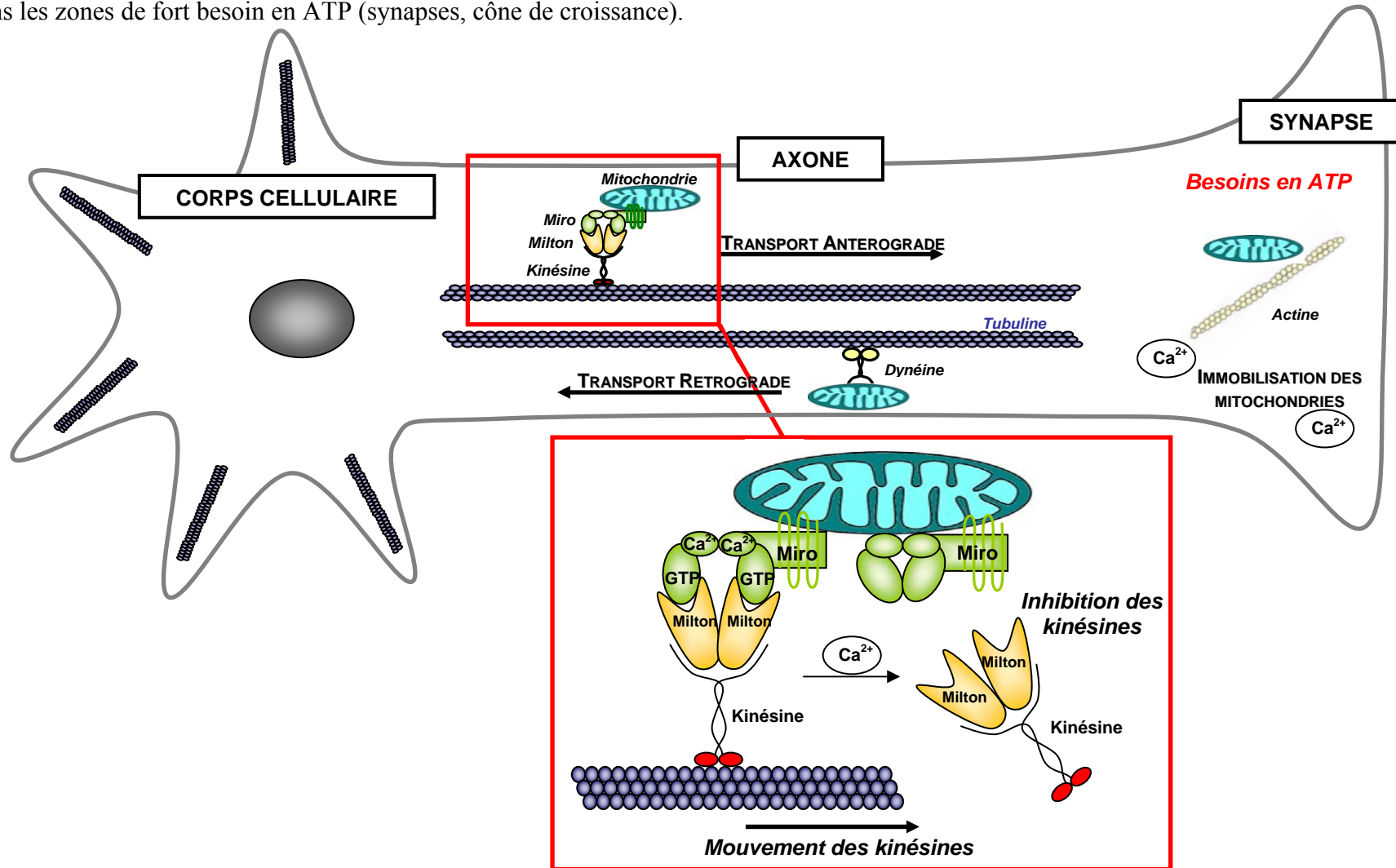
**Figure 8 : Structure du réseau mitochondrial de cellules HeLa (A) et HeLa  $\rho^0$  (B).**

Le réseau mitochondrial est marqué au MitoTracker rouge. L'ADNmt est marqué en vert à l'aide d'un anticorps anti-ADNmt. Les cellules HeLa  $\rho^0$  sont dépourvues d'ADNmt.



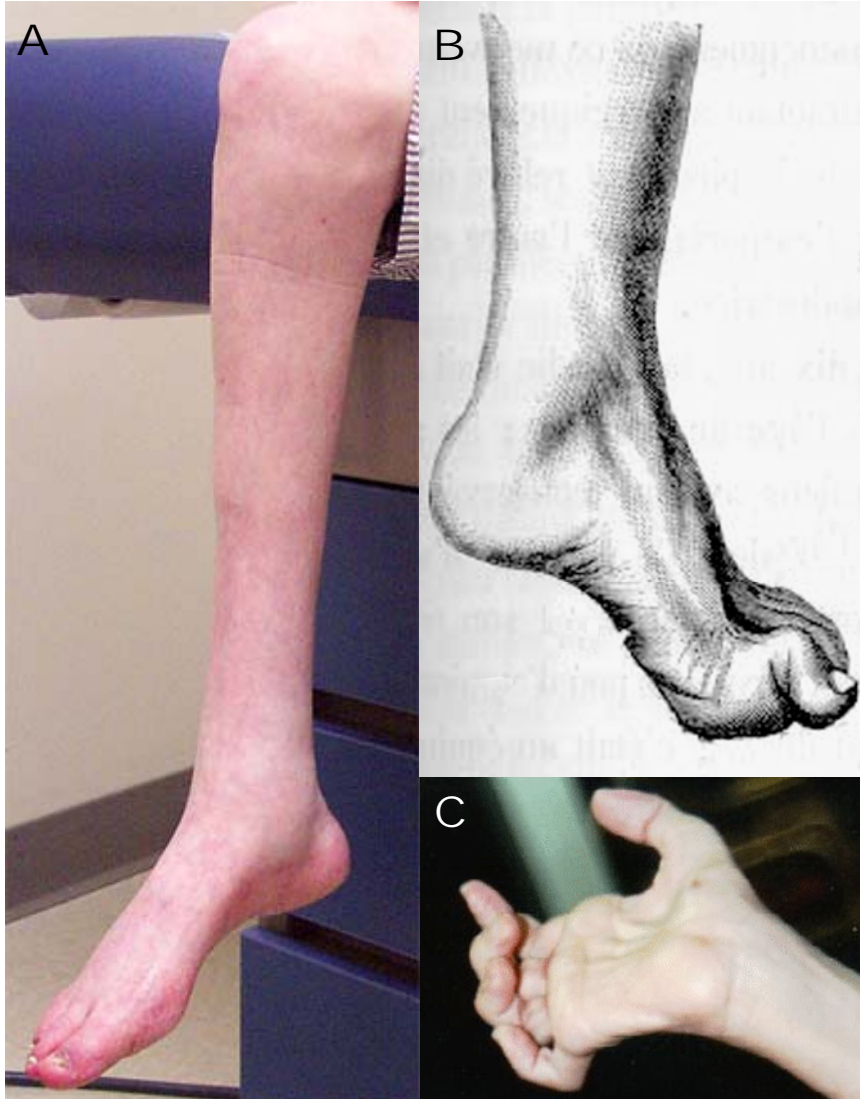
**Figure 9 : Organisation du transport axonal mitochondrial.**

Les mitochondries sont transportées le long des microtubules dans le sens antérograde par les kinésines et dans le sens rétrograde par les dynéines. Leur interaction avec ces deux types de protéines motrices se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que Milton et Miro. Le transport mitochondrial est inhibé par le calcium au niveau des filaments d'actine, ce qui permet l'immobilisation des mitochondries dans les zones de fort besoin en ATP (synapses, cône de croissance).



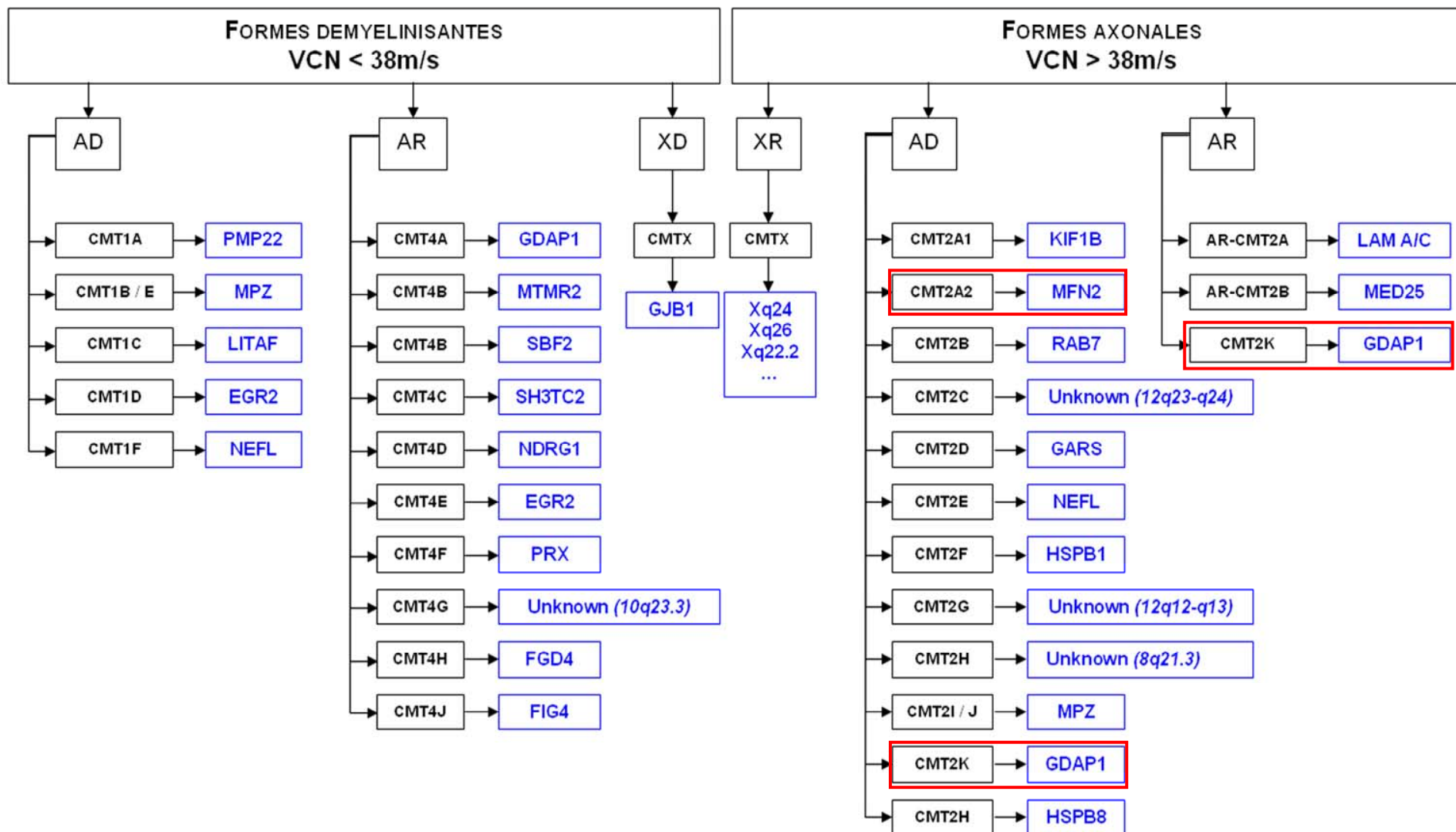
**Figure 10 : Aspects cliniques de la maladie de Charcot-Marie-Tooth.**

(A) amyotrophie des mollets, (B) pieds creux, (C) Déformation des mains.



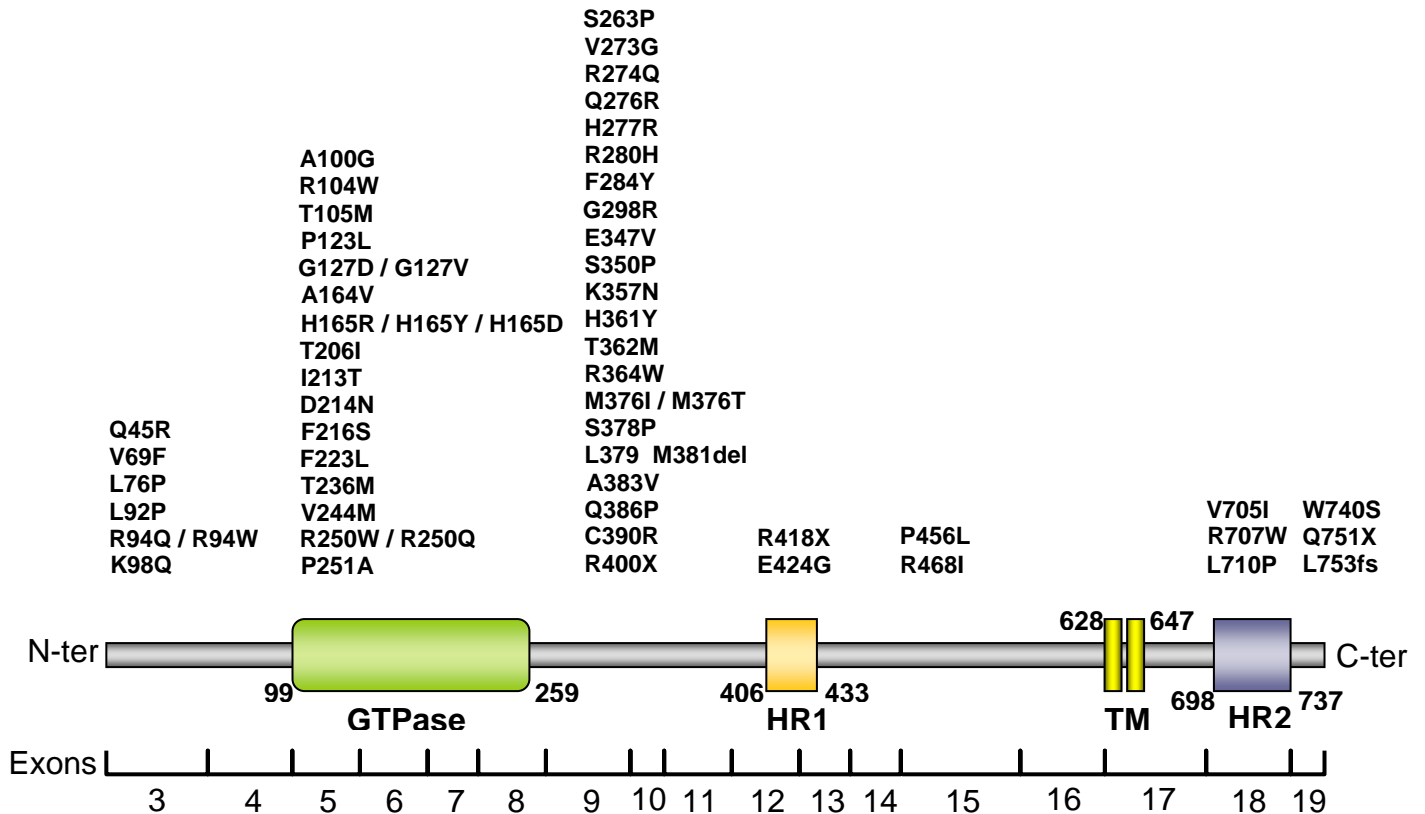
### Figure 11 : Classification des formes de CMT

AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, XD : lié à X dominant, XR : lié à X récessif. Les gènes et loci responsables des différentes formes sont représentés en bleu. Les formes liées à des mutations de gènes codant des composants de la machinerie de fission/fusion mitochondriale sont indiquées en rouge.



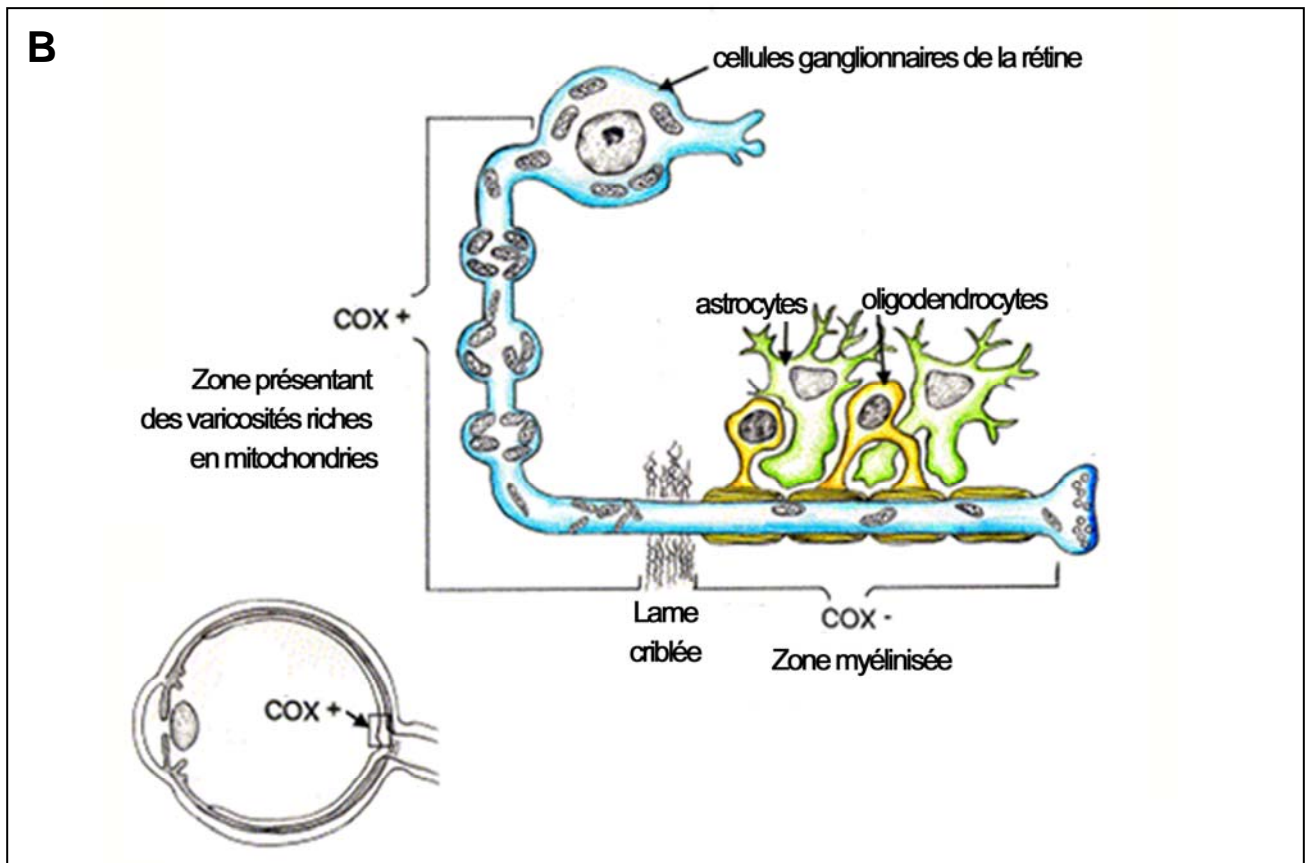
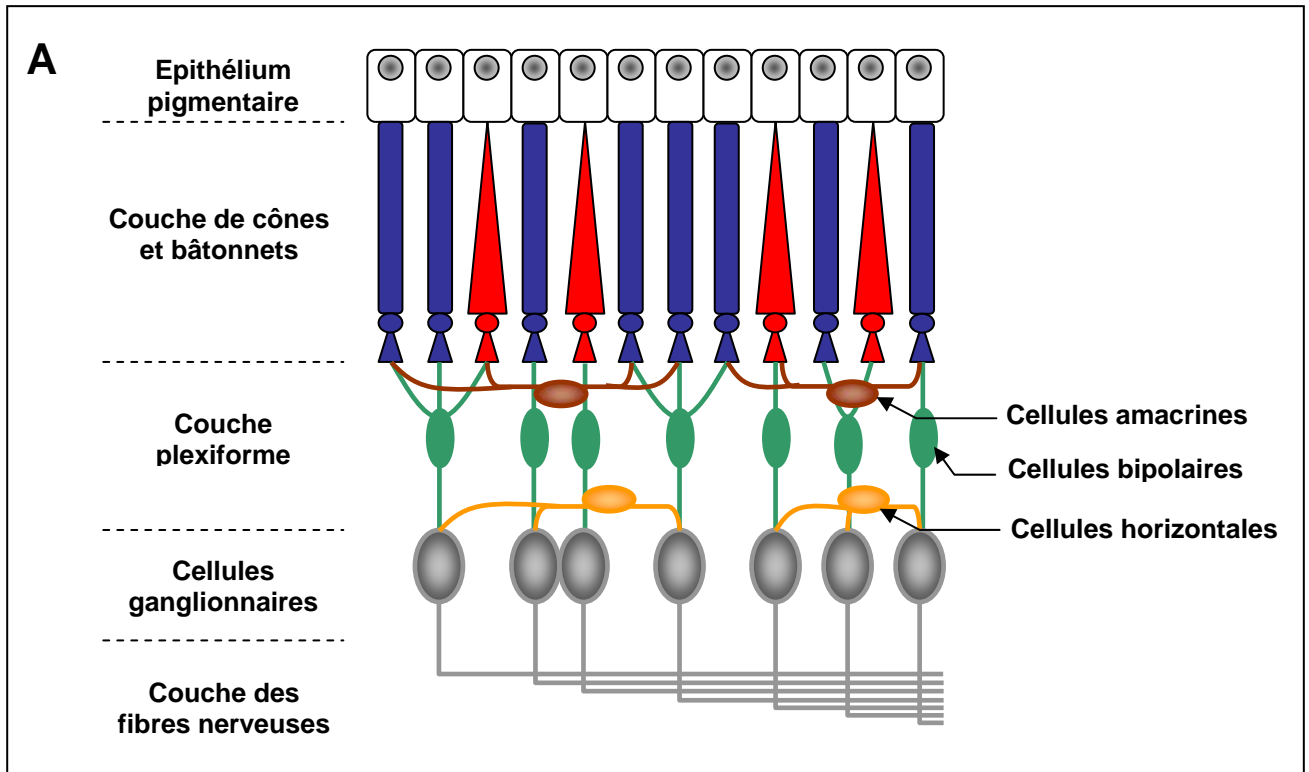
**Figure 12 : Distribution des mutations pathogènes du gène MFN2.**

Les mutations du gène MFN2 sont distribuées le long des exons et domaines protéiques impliqués. Les numéros correspondent à la position des acides aminés. GTPase : domaine GTPase, TM : domaine transmembranaire, HR1 et HR2 (heptad repeat 1 et 2) : domaines « coiled-coil ». Les mutations se trouvent principalement au niveau du domaine GTPase et du domaine HR2 impliqué dans l'attachement des mitochondries adjacentes avant la fusion.



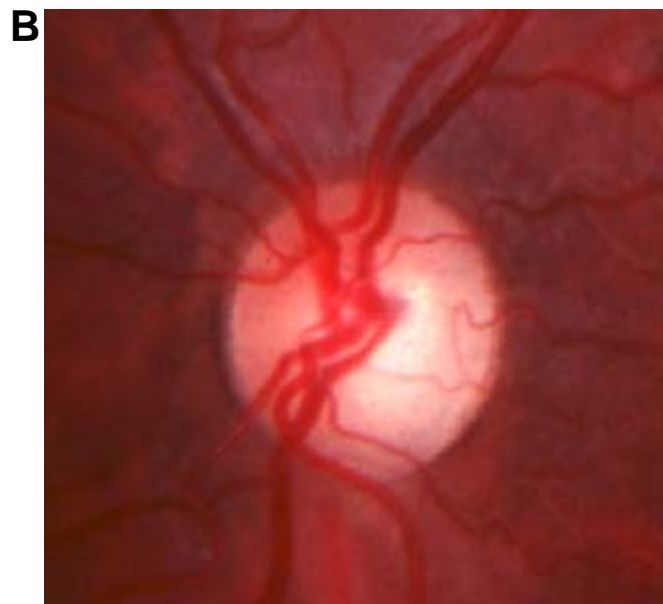
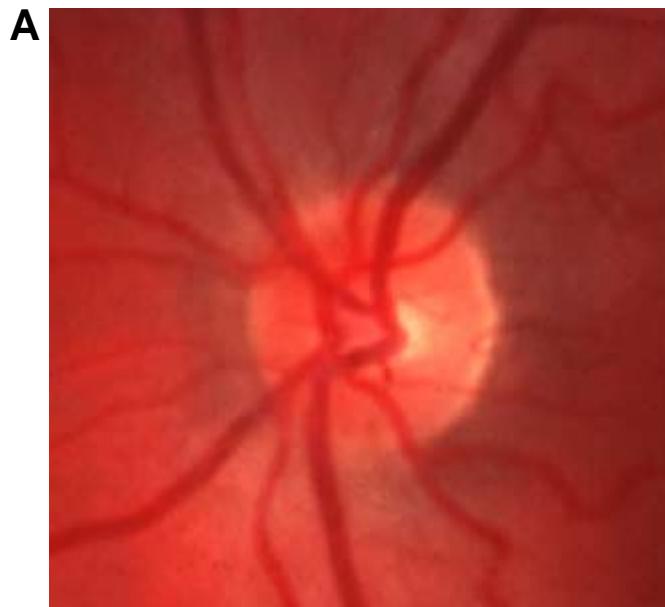
**Figure 13 : Structure de la rétine et des cellules ganglionnaires de la rétine.**

(A) Schéma de l'histologie de la rétine. (B) Dessin de la morphologie d'une cellule ganglionnaire de la rétine (Daprès Carelli *et al.*, 2004a).



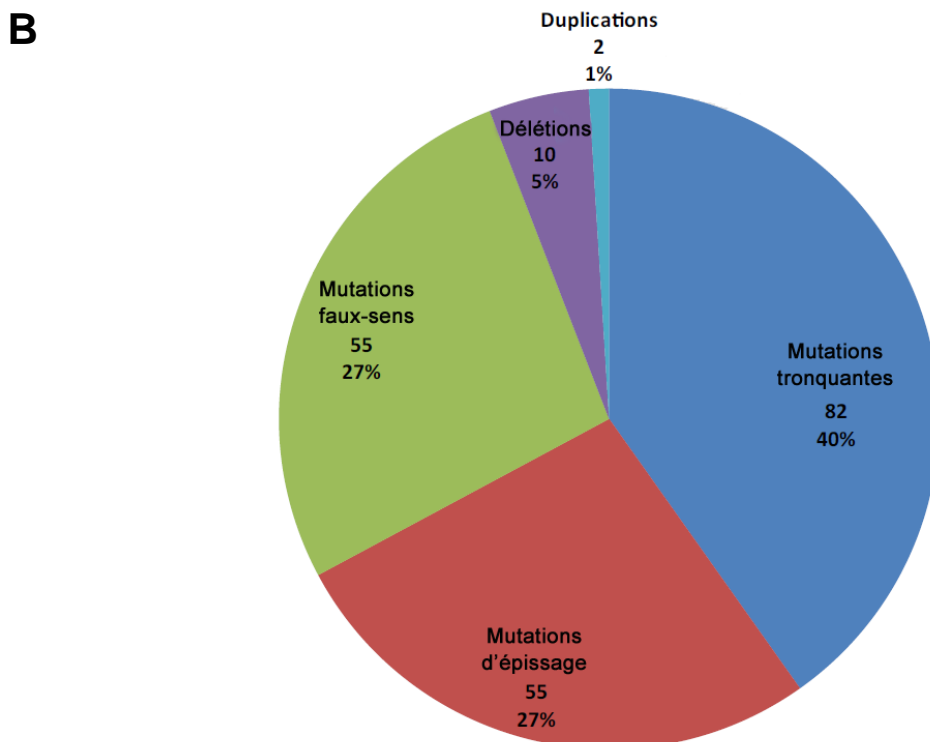
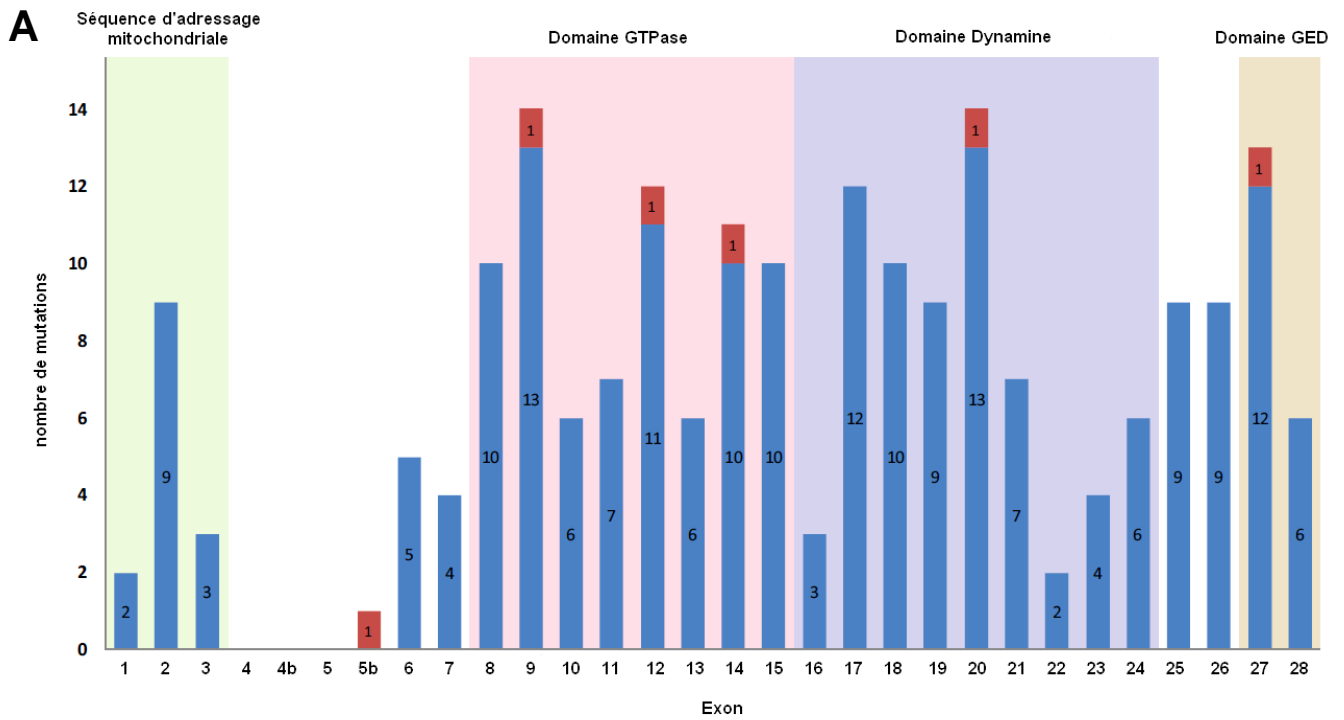
**Figure 14 : Photographies d'examens du fond d'œil.**

(A) Fond d'œil d'un individu sain. (B) Fond d'œil d'un patient atteint d'ADOA et porteur d'une mutation du gène OPA1. Chez le patient, le disque optique est caractéristique d'une atrophie optique puisqu'il apparaît blanc pâle et non jaune orangé comme chez l'individu sain.



**Figure 15 : Distribution des mutations pathogènes du gène OPA1.**

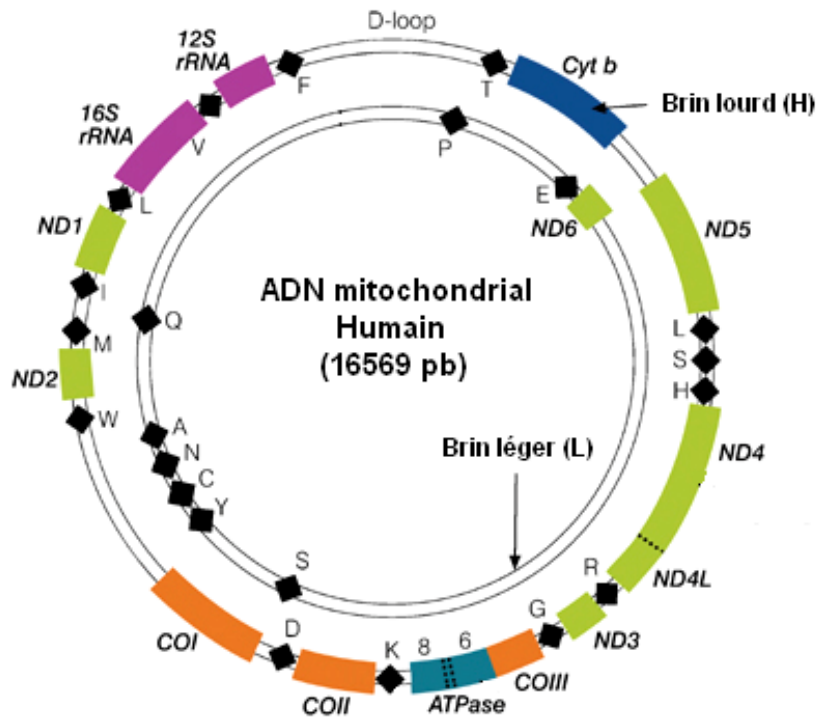
Distribution des 204 mutations du gène OPA1 : (A) selon les exons et domaines impliqués, (B) selon leurs conséquences au niveau protéique. Les mutations exoniques sont représentées en bleu et les introniques en rouge. GED : GTPase effector domain





**Figure 16 : Le génome mitochondrial Humain.**

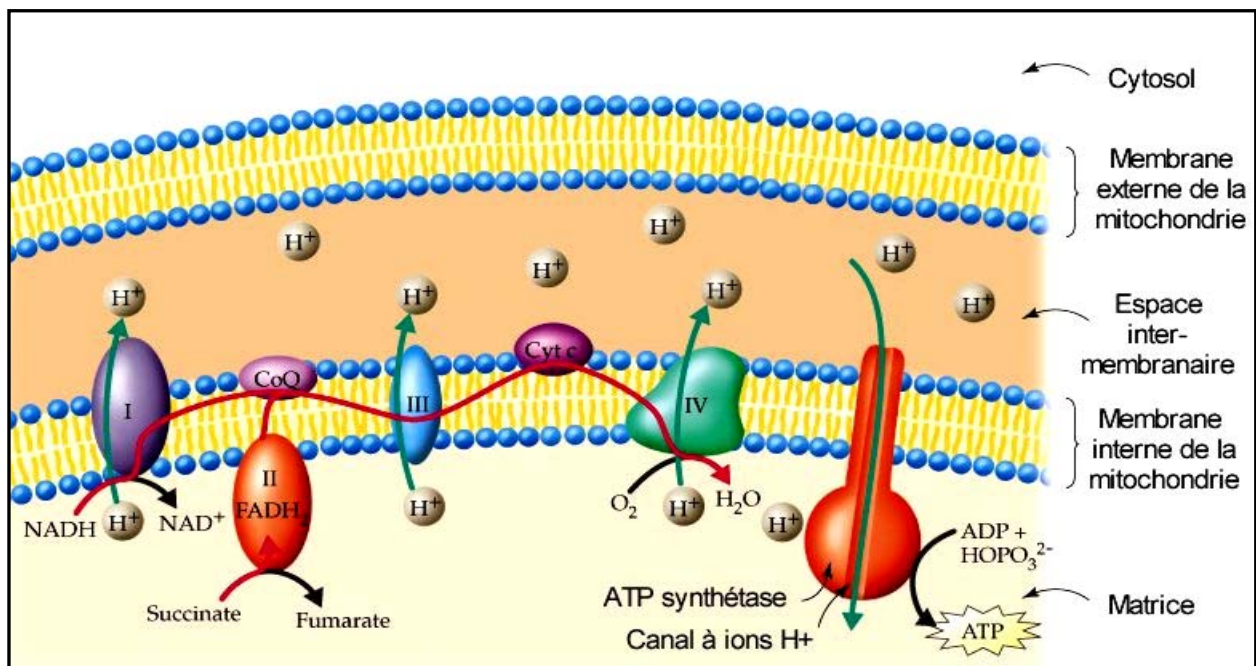
Il contient une région non codante régulatrice (D-loop) et code 22 ARN de transfert (noir), 2 ARN ribosomiaux (violet), 13 protéines des phosphorylation oxydatives dont 7 sous unités du complexe I (vert), 3 sous unités du complexe IV (orange), 2 sous unités du complexe V (bleu clair) et le cytochrome b (bleu foncé).



### **Figure 17 : Les phosphorylations oxydatives.**

Le système des phosphorylations oxydatives est constitué de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à IV) et du complexe de phosphorylation, l'ATP synthase. La dégradation des nutriments permet la formation d'équivalents réduits qui vont fournir leurs électrons à la chaîne respiratoire. Ces derniers seront transportés du complexe I au complexe IV pour réduire l'oxygène en eau. Ce transport d'électrons s'accompagne, au niveau des complexes I, III et IV, d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire à l'origine de la formation d'un gradient de protons et d'une force protonmotrice. Cette force est utilisée par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP. Il y a donc un couplage entre oxydation et phosphorylation à la base de la théorie chimio-osmotique énoncée par Mitchell en 1961.

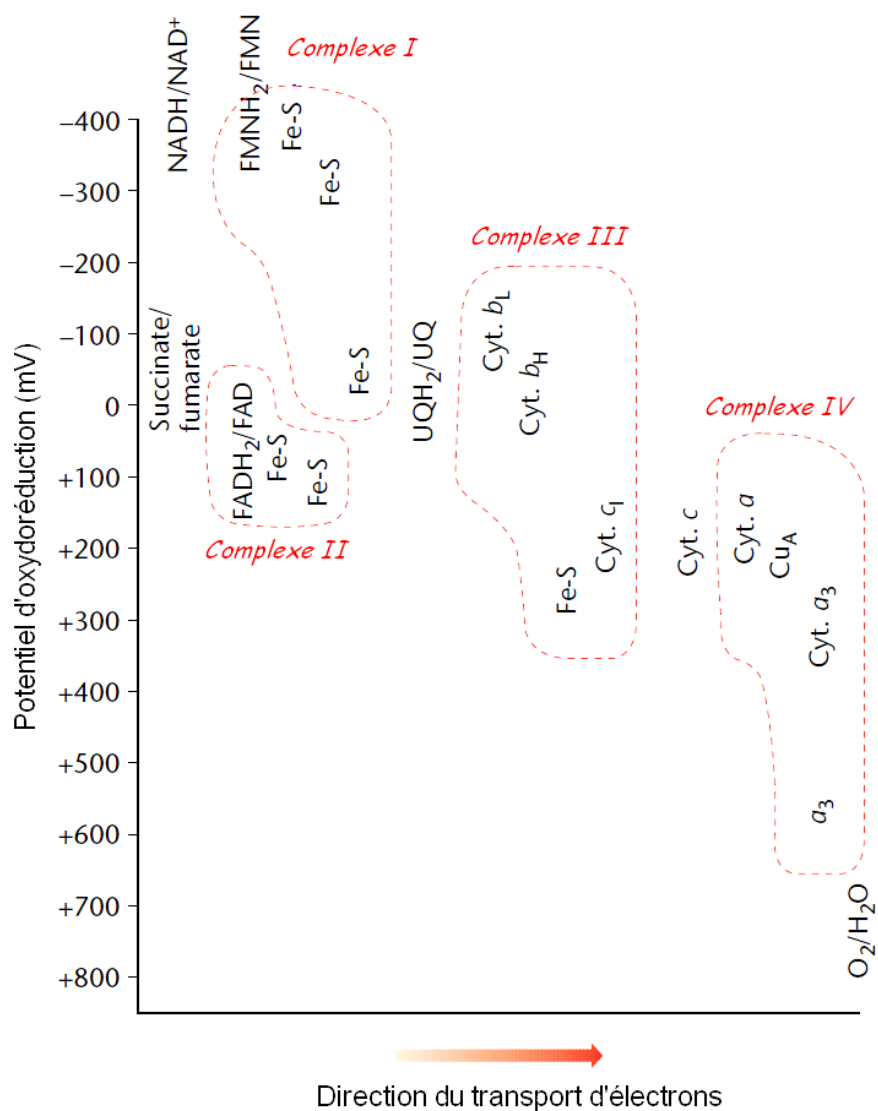
Les flèches rouges représentent le trajet des électrons et les vertes celui des protons.



**Figure 18 : Potentiels d'oxydoréduction des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

Le transport d'électrons se fait au travers de protéines ayant un potentiel d'oxydoréduction croissant. L'énergie libérée par les électrons lors des réactions catalysées par les complexes I, III et IV est utilisée pour transporter les protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. En effet, il y a une chute du potentiel redox importante au niveau des composés des complexes I, III et IV qui n'est pas retrouvée au niveau du complexe II. Le couple redox de chaque cytochrome est le couple  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  du groupement prosthétique héminique.

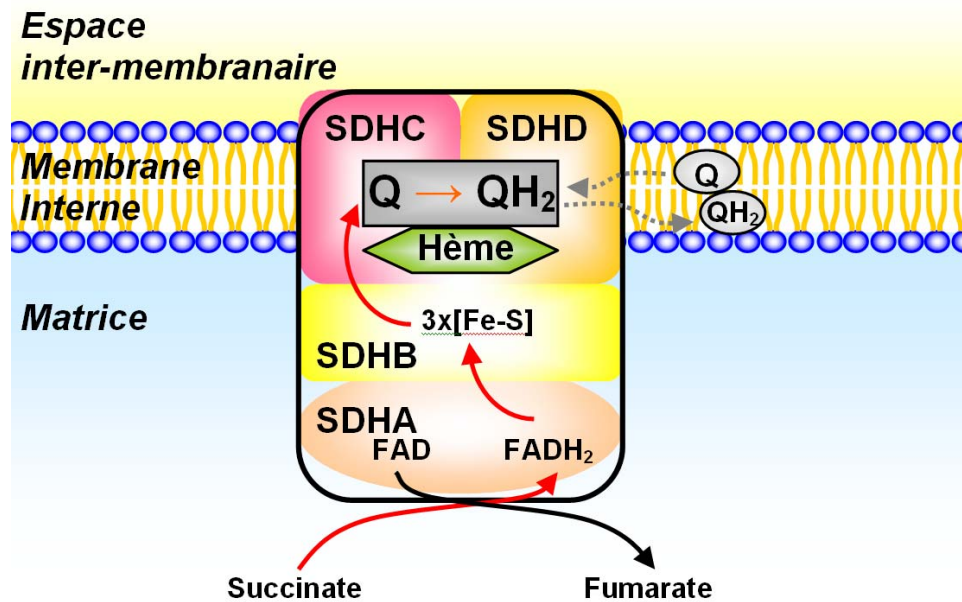
UQ : ubiquinone, Fe-S : centres fer/soufre, Cyt. : cytochrome.



**Figure 19 : Structure du complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase).**

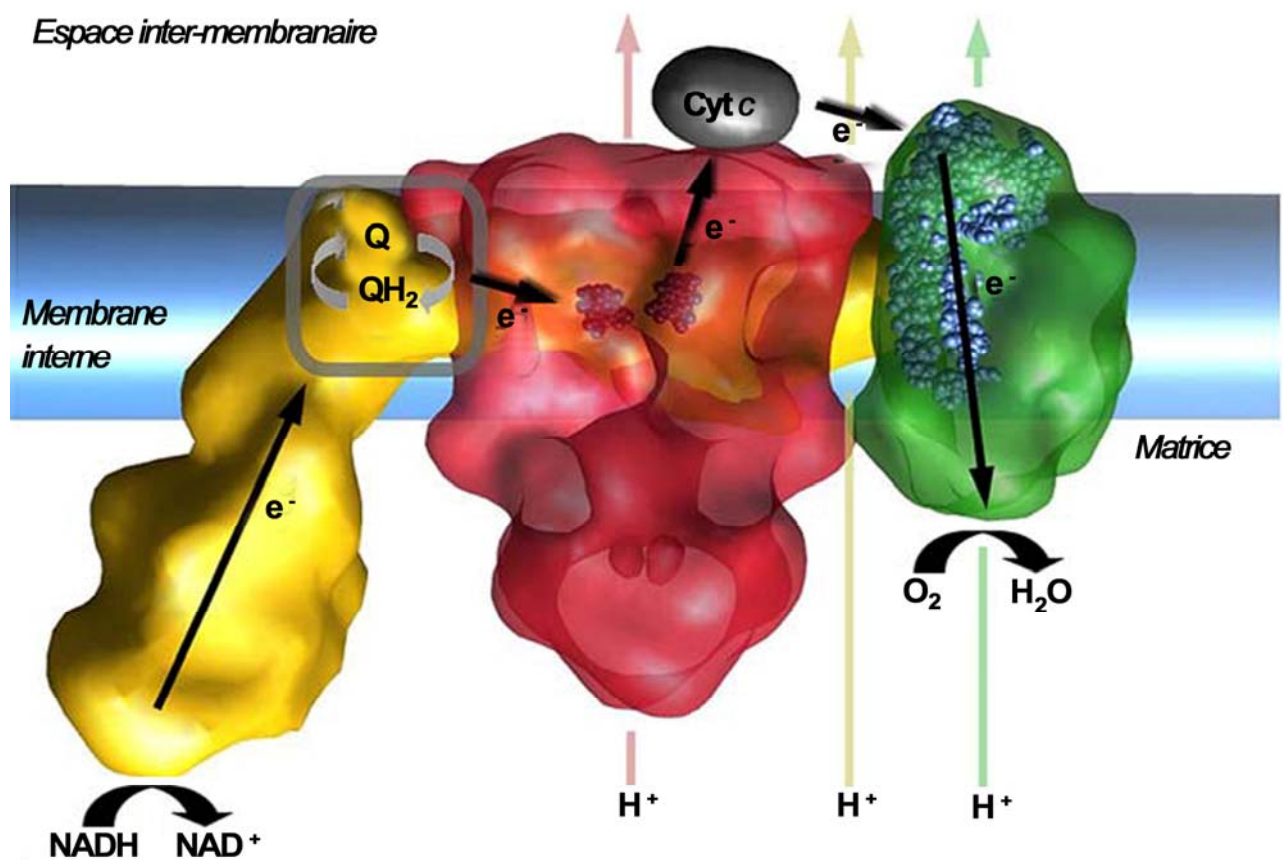
La sous-unité SDHA qui contient un groupement prosthétique FAD fixe le succinate et transfère les électrons vers les centres fer/soufre au niveau de la sous-unité SDHB. Les électrons vont ensuite être dirigés vers les sous unités SDHC et SDHD où l'ubiquinone va être réduite. Les sous-unités SDHA et SDHB portent donc l'activité succinate déshydrogénase du complexe (SDH) tandis que l'ensemble du complexe porte l'activité succinate-ubiquinone réductase (SUR).

Le trajet des électrons est représenté en rouge. Q : ubiquinone, QH<sub>2</sub> : ubiquinol, Fe-S : centres fer/soufre.



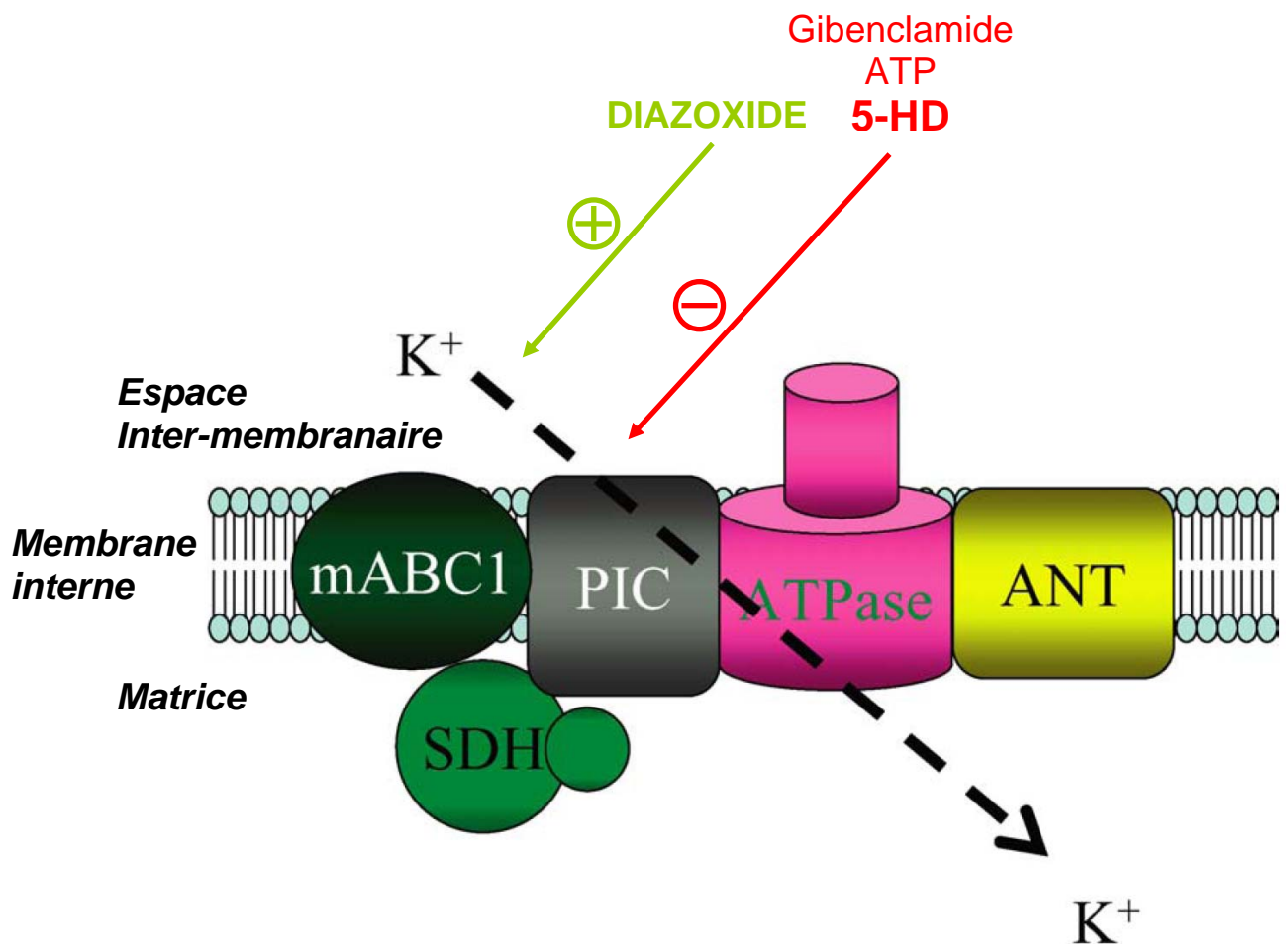
**Figure 20 : Structure cristallographique du supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1</sub> bovin et transfert d'électrons hypothétique au sein de ce supercomplexe. (D'après Vonck et Schäfer, 2009).**

Le supercomplexe constitué du complexe I (jaune), du dimère de complexe III (rouge) et du complexe IV (vert) est ancré dans la membrane interne mitochondriale (bleu). Les électrons transitent d'un complexe à l'autre via des transporteurs mobiles : l'ubiquinone dont le site d'interaction avec le complexe I et le dimère de complexe III est entouré de gris, et le cytochrome *c* (gris).



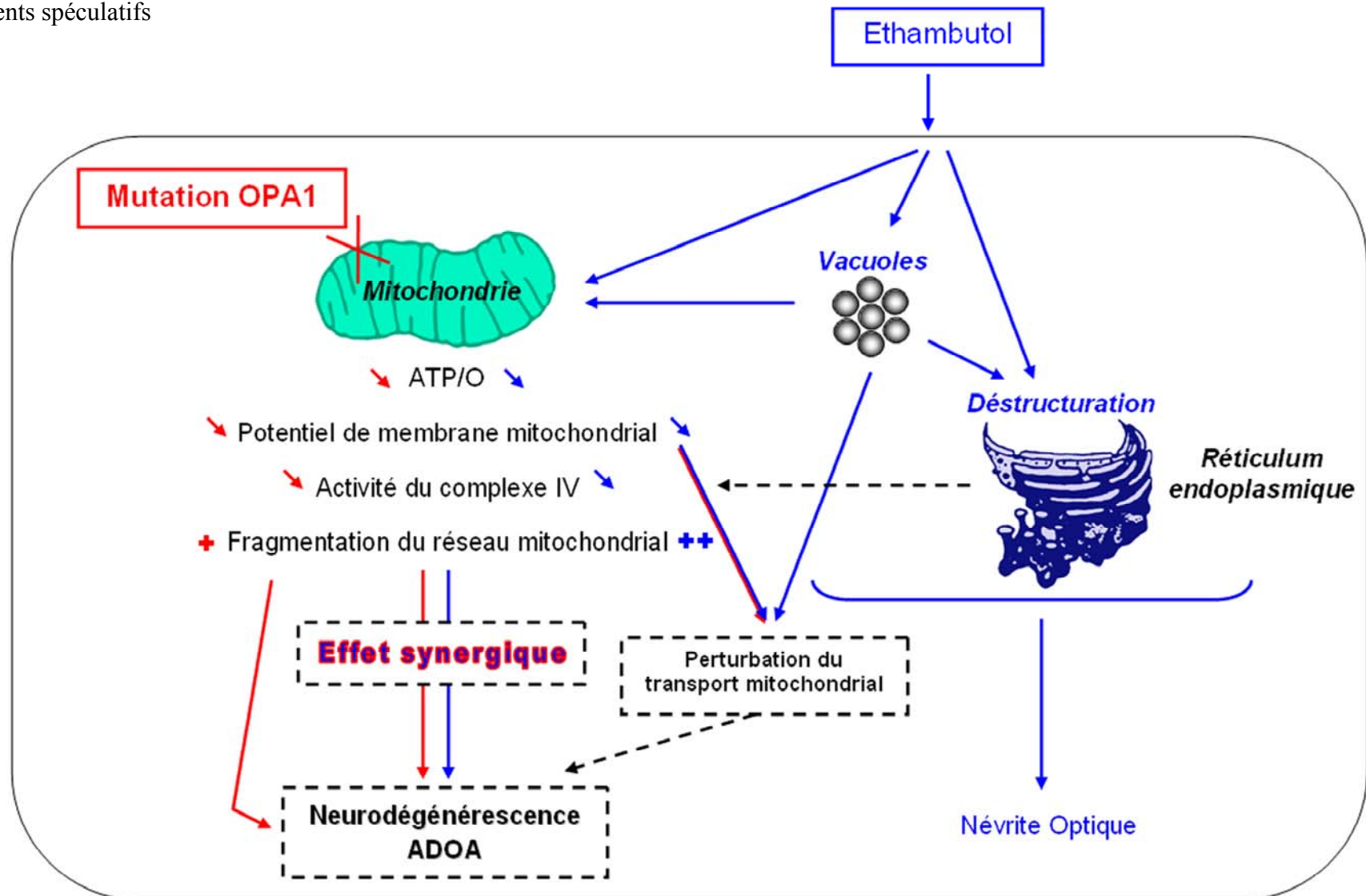
**Figure 21** : Représentation hypothétique de la structure du canal potassium mitochondrial sensible à l'ATP ( $mK_{ATP}$ ) (D'après Ardehali et O'Rourke, 2005).

Le  $mK_{ATP}$  serait constitué des complexes II (succinate déshydrogénase : SDH) et V (ATPase) de la chaîne respiratoire ainsi que du transporteur des nucléotides adényliques (ANT), du transporteur de phosphate inorganique (PiC) et de l'ATP-binding cassette mitochondriale 1 (mABC1). L'activité du  $mK_{ATP}$  est inhibée par l'ATP, les sulfonylurées tels que le glibenclamide et le 5-hydroxydécanotate (5-HD). Il est activé par le diazoxide.



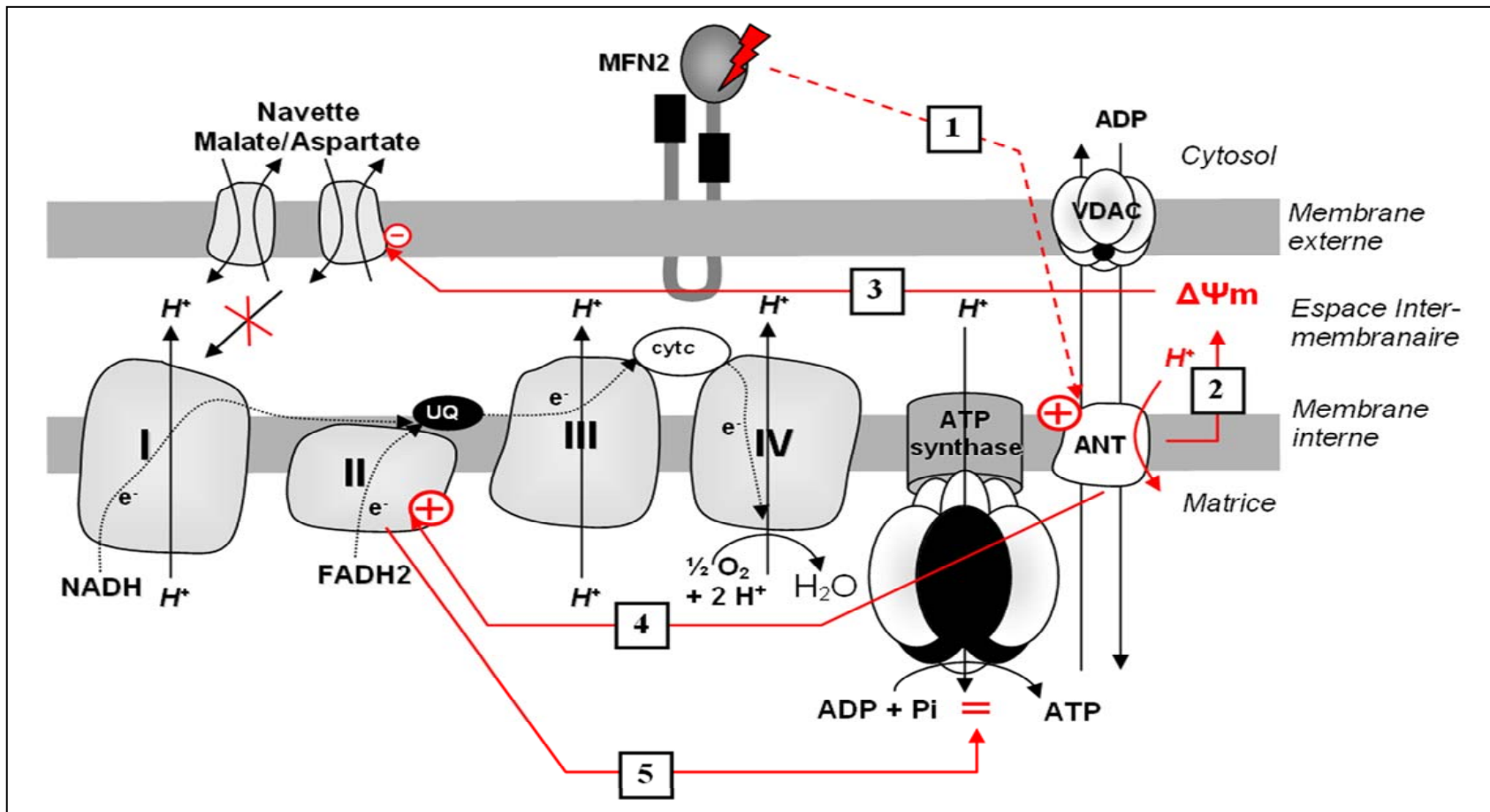
**Figure 22 : Effets communs des mutations du gène *OPA1* et de l'éthambutol sur la fonction énergétique et la structure mitochondriale.**

Les résultats issus de la première étude sont représentés en rouge et ceux de la deuxième étude en bleu. Les pointillés noirs représentent des éléments spéculatifs



**Figure 23 : Schéma hypothétique de l'effet des mutations du gène *MFN2* sur le fonctionnement des phosphorylations oxydatives dans des fibroblastes de patients atteints de CMT2A.**

Les mutations du gène *MFN2* permettraient l'augmentation spécifique de l'expression de l'ANT3 via un signal faisant intervenir le dialogue mitochondrie-noyau (1). L'augmentation de l'expression et de l'activité de l'ANT3 provoque un découplage des phosphorylations oxydatives et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (2). Ce découplage stimule les complexes de la chaîne respiratoire afin de limiter la baisse du potentiel de membrane. Cependant, l'apport des substrats du complexe I à la mitochondrie qui est dépendant du potentiel de membrane est donc limité (3). L'utilisation des substrats du complexe II est alors augmentée (4) ce qui permet le maintien de la synthèse d'ATP.





**Figure 24 :** Effets du diazoxide, du 5-hydroxydécanoate et du malonate sur le métabolisme énergétique et le  $mK_{ATP}$  de mitochondries contrôles et porteuses de la mutation R94Q du gène MFN2.

Le diazoxide (DZX) ouvre le  $mK_{ATP}$  et inhibe l'oxydation du succinate ainsi que les activités des complexes II et V de mitochondries contrôles au niveau de celles des mitochondries Tg-R94Q. A l'inverse, le 5-hydroxydécanoate (5-HD) ferme le  $mK_{ATP}$  et active l'oxydation du succinate ainsi que les activités des complexes II et V de mitochondries Tg-R94Q au niveau de celles des mitochondries contrôles. Le malonate inhibe le complexe II et ferme le  $mK_{ATP}$ .

