



Déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial : identification de nouveaux gènes et mécanismes

Laetitia Berg Alonso

► To cite this version:

Laetitia Berg Alonso. Déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial : identification de nouveaux gènes et mécanismes. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4101 . tel-01466739

HAL Id: tel-01466739

<https://theses.hal.science/tel-01466739>

Submitted on 23 Feb 2017

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 DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

ED 85

Thèse de Doctorat

Interactions moléculaires et cellulaires
Présentée publiquement le : 10 novembre 2016
Soutenue par : **Laetitia BERG (BERG ALONSO)**

**« Déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale avec
instabilité de l'ADN mitochondrial :
Identification de nouveaux gènes et mécanismes. »**

Thèse dirigée par le Professeur Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER

« Maladies mitochondriales et instabilité de l'ADNmt »
Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement de Nice (IRCAN)
CNRS UMR 7284-INSERM U1081 UNS
Faculté de Médecine 28 avenue de Valombrose
06107 Nice Cedex 02 - France

Jury :

Mme Agnès ROTIG.

Directeur de recherche.....Rapporteur

M. Vincent PROCACCIO.

Praticien hospitalier-Professeur des Universités.....Rapporteur

M. Bernard MARI.

Directeur de recherche.....Président

Mme Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER.

Praticien hospitalier-Professeur des Universités.....Directeur

A mes parents, mes deux petits anges gardiens, j'espère que vous me voyez et que vous êtes fières de moi. Je vous aime.

« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, c'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles » Sénèque.

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury présents aujourd'hui,

J'adresse tout particulièrement mes sincères remerciements au Professeur Véronique Paquis qui m'a donnée l'opportunité de faire cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Cela a été un grand honneur pour moi de réaliser ces travaux sous sa direction. Ces années m'ont beaucoup apportée tant sur le plan professionnel que personnel, et j'espère malgré les mauvaises périodes avoir été digne de sa confiance et à la hauteur de ses espérances.

Je remercie sincèrement le Docteur Agnès Rotig et le Professeur Vincent Procaccio d'avoir eu la gentillesse et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier le Docteur Bernard Mari de nous faire l'honneur de présider ce jury.

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé, d'abord aux membres de l'équipe :

Sylvie pour ta gentillesse, ton aide, ton soutien et pour ce que tu m'as appris.

Manu et Françoise pour m'avoir beaucoup aidé et supporté ;).

Gaëlle mille mercis, j'ai adoré travaillé à tes côtés, rigueur et rigolades ;).

Morgane pour ta bonne humeur et pour avoir eu des « bébés cellules » avec moi ma « Douce » ;).

Un grand merci aussi au membre du service de génétique médicale du CHU de Nice, merci pour votre accueil, pour le temps que vous m'avez accordé et pour votre aide. Un grand merci aussi à Marjorie, Annick, Magalie et Sabine et au laboratoire cytogénétique du CHU de Nice.

Je remercie également toutes les personnes de la tour Pasteurs et de l'Ircan (Amine, Chantal, Valérie, Didier, Zoubir, David, Dominique, Fabien, Marius, Luigi, William, Régis...et tous les autres), pour votre aide soutien et bonne humeur. Aux filles du deuxième (Les Magnaldettes et Sabine) merci pour votre soutien et pour les nombreux fous rires.

Je remercie du fond du cœur BenJ (de Nice), merci d'avoir été là cette année, (année tellement difficile mais grâce à toi prise avec dérision), et puis parce que : «Well you know, it's like green stem...only green stem... without flowers!!!!».

Je voudrais remercier mes amis, vous êtes tout pour moi, mille mercis du fond du cœur d'être présents, merci pour votre soutien et pour votre amour (ma Josette, ma Douce, Nolan, Adeline, Sophie, Nadège, Max, Stéphanie, Jack, Mr Z., MG du « May crew »).

J'espère n'avoir oublié personne, je m'excuse si c'est le cas et vous remercie aussi ;).

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc ou cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNn : Acide désoxyribonucléique nucléaire
ADOA : Autosomal dominant optic atrophy ou Atrophie optique dominante
AOA1 : Ataxie avec Apraxie oculomotrice de type 1
AOD ou DOA : Atrophie optique dominante
ANT1 : Adenine nucleotide translocator 1
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
ADP : Adénosine diphosphate
AP : Aputique ou Apyrimidique
ARTX : Apraxin
ATI : Alternative Translation Initiation
ATP : Adénosine triphosphate
BER : Réparation par excision de base (Base Excision Repair)
BER-SP : Base Excision Repair Short-Patch
BER-LP : Base Excision Repair Long-Patch
BSA : Bovin Serum Albumine ou Albumine de veau fœtal
CI : complexe I ou NADH déshydrogénase ou NADH coenzyme Q réductase
CII : complexe II ou succinate déshydrogénase ou succinate-Co-enzymeQ réductase
CIII : complexe III ou complexe b-c1 ou cytochrome C réductase
CIV : complexe IV ou cytochrome oxydase
CV : complexe V ou ATP Synthétase
Ca²⁺ : Calcium
cDNA : ADN complémentaire
CHCHD10 : Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10
CMT : Maladie de Charcot-Marie-Tooth
CMT2A : Maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A
HMSN VI : forme de CMT associée à une neuropathie optique
CMT4A : Maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A
CMT2K : Maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2K

COX : Cytochrome c oxidase
CPK : Créatine Phosphokinase
CR : Chaîne Respiratoire
CSB : Conserved sequence blocks
dNTP : Deoxyribonucléotide triphosphate
dATP : Deoxyadenosine triphosphate
dCTP : Deoxycytidine triphosphate
DFT ou FDT : Démence Fronto-temporale
dGK : Deoxyguanosine kinase
dGTP : Deoxyguanosine triphosphate
DGUOK : Deoxyguanosine kinase
D-loop : Displacement loop
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Diméthyl Sulphoxide
Dnm1 : Dynamine 1 (Orthologue de DRP1 chez la levure)
dRP : DésoxyRibose Phosphate
DRP1 : Dynamin Related Protein 1 (autres noms de DRP1 : DNM1L, DLP, Dymple, DVL1)
DSB : Double-strand break
EMG : Electromyogramme
ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase
Exp-D : expanded D-LOOP intermédiaire
FIS1 : Fission 1
GDAP1 : Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
GDP : Guanosine diphosphate
GED : GTPase Effector Domain
GFP : Green Fluorescent Protein
GGR : Global Genome Repair
GpC : Gapped circle
GTP : Guanosine triphosphate
H⁺ : Proton
HR : Homologous Recombinaison
HSP : Heavy strand promotor
IRM : Imagerie par résonance magnétique
K⁺ : Potassium
KDa : Kilo Dalton
KI : Knock-in

KO : knock-out

LIG3 : ADN ligase 3

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LSP : Light strand promotor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MDS : Syndrome avec déplétion de l'ADN mitochondrial (Mitochondrial Depletion Syndrome)

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts

MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes

MEMSA : Epilepsie myoclonique, myopathie, ataxie proprioceptive (Myoclonic Epilepsy Myopathy Sensory Ataxia)

MERRF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers

Mg²⁺ : Magnésium

Mid49 : Mitochondrial dynamic protein of 49 kDa

Mid51 : Mitochondrial dynamic protein of 51 kDa

Mff : Mitochondrial Fision receptor

MFN : Mitofusine

MICOS : Mitochondrial Contact Site

MM : Maladie mitochondriale

MME ou ME : Membrane mitochondriale externe

MMEJ : Microhomology-Mediated End-Joining

MMI ou MI : Membrane mitochondriale interne

MMR : Mismatch repair

MNGIE : Encéphalopathie neurogastrointestinale mitochondriale (Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalopathy)

MTS : Mitochondrial Transport Signal

mtSSB : Mitochondrial single-stranded DNA binding protein

NDPK : Nucléoside diphosphate kinase mitochondriale

NER : Réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair)

NGS : Next generation sequencing

NHEJ : Non homologous end-joining

NTP : Nucléotide TriPhosphate

OGG1 : 8-oxoguanine DNA Glycosylase 1

ORI : Origine de réplication

OriH : Origine du brin lourd H

OriL : Origine du brin léger L

OXPHOS : phosphorylation oxydative

PARL : Presenilin-associated rhomboid-like

PARP1 : Poly (ADP ribose) Polymerase 1

pb ou pdb : Paire de Base

PEO : Progressive Externe Ophtalmoplegia (Ophtalmoplégie externe progressive)

PEV : Potentiels évoqués visuels

PFA : Paraformaldehyde

Pi : Phosphate inorganique

PNKP : Polynucléotide Kinase Phosphatase

POLG : Polymérase gamma

POLRMT : Mitochondrial RNA polymérase

PTP : Permeability Transition Pore

RE : Réticulum Endoplasmique

RITOLS : RNA incorporated Through-out Lagging Strand

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

RPM : Rotation Per Minute

RRF : Fibres "ragged-red" ou fibres rouges déchiquetées

RRM2B : Ribonucleotide reductase M2 B

SCAN1 : Ataxie spinocérébrale avec neuropathie axonale de type 1

SDH: Succinate déshydrogénase

SLA: Sclérose latérale Amyotrophique

SLA-FDT: Sclérose latérale Amyotrophique-Démence Fronto-Temporale

SMAJ : Spinal Muscular Atrophy, Jokela type

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSB : Single-strand break

SSBR : Single-strand break repair

TAS : Conserved termination-associated sequence

TCR : Transcription-Coupled Repair

TFAM : Transcription Factor A Mitochondrial

TIM : Translocase of the Inner Membran ou Transporter Inner Membran

TLS : Translesion Synthesis

TOM : Translocase of the Outer Membran ou Transport Outer Membran

TMRE : TetraMethylRhodamine, Ethyl ester

TP : Thymidine phosphorylase

UNG1 : Uracil-DNA Glycosylase 1

UV : Ultra-violets

YB-1 : Y-Box binding protein 1

$\Delta\Psi_m$: Potentiel de membrane mitochondrial

Table des matières

Liste des abréviations	3
Liste des illustrations.....	9
Résumé	10
INTRODUCTION	12
I. Les mitochondries.....	12
1. Généralités.....	12
2. Origine des mitochondries.....	12
3. Structure des mitochondries.....	15
3.1 Membrane mitochondriale externe.....	17
3.2 Membrane mitochondriale interne.....	19
3.3 Organisation et maintien des crêtes mitochondriales.....	20
3.4 Espace intermembranaire.....	23
3.5 Matrice mitochondriale.....	23
4. Génome mitochondrial : l'ADN mitochondrial (ADNmt).....	23
4.1 Structure et organisation de l'ADNmt humain.....	24
4.2 Réplication de l'ADNmt.....	27
4.2.1 Réplisome mitochondrial minimal.....	28
4.2.2 Les acteurs de la réplication de l'ADN mitochondrial.....	29
4.2.2.1. L'ADN Polymérase mitochondriale : POLG ou POLγ.....	29
4.2.2.2. Hélicases mitochondriales.....	33
4.3 Les modèles de réplication.....	34
4.3.1 Modèle de déplacement asynchrone.....	36
4.3.2 Modèle de déplacement couplé.....	36
4.4. Mécanismes de réparation de l'ADNmt.....	37
4.4.1 BER (Base Excision Repair).....	39
4.4.1.1 Reconnaissance et clivage de la base endommagée.....	40
4.4.1.2 Synthèse <i>de novo</i>	40
4.4.1.3. Ligation.....	41
4.4.2. Mismatch Repair (MMR).....	43
4.4.3. DNA break repair (SSB ou DSB).....	43
4.4.3.1 SSB (Single-Strand Break).....	43
4.4.3.2 DSB (Double-Strand Break).....	44
5. La chaîne respiratoire.....	45
6. Maladies génétiques rares et maladies mitochondriales.....	47
6.1. Maladies mitochondriales.....	48
6.2. Génétique des maladies mitochondriales.....	51
6.3. Anomalies de l'ADNmt et pathologies mitochondriales.....	52

6.3.1. Délétions uniques de l'ADNmt.....	53
6.3.2. Mutations ponctuelles de l'ADNmt.....	54
6.4. Mutations dans des gènes nucléaires et pathologies mitochondriales.....	56
6.4.1. Mutations dans des gènes de structure et d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire.....	56
6.4.2. Mutations dans des gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales. .	56
6.4.3. Mutations dans des gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt.	57
6.4.3.1. Instabilité de l'ADNmt et défaut de fusion mitochondriale.	59
6.4.3.2. Instabilité de l'ADNmt et défaut de maintien des crêtes mitochondriales.	60
7. Dynamique mitochondriale.	61
7.1 Transport et distribution des mitochondries.....	62
7.2. Dynamique mitochondriale.....	64
7.3 Acteurs et régulation de la fission mitochondriale.....	66
7.4. Acteurs et régulation de la fusion mitochondriale.	70
7.4.1. Fusion de la membrane interne : la protéine OPA1.....	72
7.4.2. Fusion de la membrane externe : les mitofusines.	73
8. Mitochondries et neuro-dégénérescence.....	77
8.1 Pathologies de la dynamique mitochondriale.	77
8.2 Maladie de Charcot-Marie-Tooth.....	79
II. Objectifs.....	80
III. Résultats.....	81
Partie 1 : MFN2 et implication dans l'instabilité de l'ADNmt.	81
Partie 2 : L'inactivation du gène PIF1 dans un modèle murin entraîne une myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt.	97
Partie 3 : L'identification du gène CHCHD10 ou la preuve génétique de l'origine mitochondriale de certaines formes de SLA.....	99
IV. DISCUSSION.....	101
Annexes techniques	105
Bibliographie.....	116

Liste des illustrations

Figure 1 : Origine des mitochondries : théories endosymbiotiques.....	14
Figure 2 : Représentation schématique d'une mitochondrie.....	15
Figure 3 : Diversité de la morphologie des mitochondries et du réseau mitochondrial.....	16
Figure 4 : Les complexes d'import mitochondrial.	18
Figure 5 : Représentation schématique de l'import mitochondrial.	18
Figure 6 : Représentation schématique de la composition et de la formation des crêtes mitochondriales.....	22
Figure 7 : Représentation schématique de l'ADNmt (ADN double brin circulaire de 16,5kb).	24
Figure 8 : Représentation schématique de la répartition des molécules d'ADNmt au cours de la division cellulaire et de l'origine maternelle de l'ADNmt au moment de la fécondation.	26
Figure 9 : Représentation schématique de la fourche de réplication de l'ADNmt.	29
Figure 10 : Modélisation de PolG.....	32
Figure 11 : Représentation schématique des 2 modèles de réplication de l'ADNmt : le modèle « asynchrone » à gauche et le modèle « coupled-strand » à droite.	35
Figure 12 : Les systèmes de réparation de l'ADN.	38
Figure 13 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire.....	46
Figure 14 : Représentation schématique des principaux organes atteints et signes cliniques observés au cours des pathologies mitochondriales.	49
Figure 15 : Images des principales anomalies histologiques évocatrices de maladie mitochondriale observées à partir de prélèvement musculaire.....	50
Figure 16 : Représentation schématique de l'origine génétique des protéines de la chaîne respiratoire.....	52
Figure 17 : Représentation schématique des principaux signes cliniques associés à des mutations dans les différents gènes de l'ADNmt.	55
Figure 18 : Adaptation de la morphologie du réseau mitochondrial en fonction du métabolisme.....	62
Figure 19 : Transport mitochondrial dans les cellules neuronales.	63
Figure 20 : Modèles de cycle « de vie » mitochondrial.	65
Figure 21 : Représentation schématique des protéines de la fission et de la fusion mitochondriales.	66
Figure 22 : Protéines de la fission mitochondrial et recrutement de DRP1.....	69
Figure 23 : Mécanisme de fission mitochondriale.....	69
Figure 24 : Mécanismes de fusion des membranes externes et internes mitochondriales.	71
Figure 25 : Schématisation de la structure de MFN2.....	74
Figure 26 : Schématisation de la structure de MFN2 et de la distribution des mutations pathogènes les plus fréquemment retrouvées.	76
Figure 27 : Présentation de la famille avec mutation MFN2D210V (Rouzier et al., 2012).....	82
Figure 28 : Analyse de l'ultrastructure mitochondriale dans les fibroblastes des patients en microscopie électronique.	86
Figure 29 : Analyse des images de microscopie électronique.	87
Figure 30 : Analyse du réseau mitochondrial à partir des fibroblastes des patients.....	89
Figure 31 : Analyse de l'ADNmt.	90
Figure 32 : Analyse de la stabilité de l'ADNmt : étude des nucléoïdes mitochondriaux.	92
Figure 33 : Cinétique de réparation de l'ADNmt après traitement H ₂ O ₂	94
Figure 34 : Analyse de la fusion mitochondriale.	96
Tableau 1 : Représentation schématique des signes cliniques associés aux mutations dans les principaux gènes nucléaires responsables de la stabilité de l'ADNmt.	59
Tableau 2 : Gènes de la dynamique mitochondriale et pathologies associées.	78
Tableau 3 : Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	84

Résumé

Pathologies mitochondriales avec instabilité de l'ADN mitochondrial : « Caractérisation de nouveaux gènes et mécanismes »

Les maladies mitochondriales regroupent un ensemble de pathologies liées à un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Au laboratoire, nous focalisons notre intérêt sur les mitochondriopathies liées à un défaut de stabilité de l'ADN mitochondrial (ADNmt), qui se traduit par des délétions multiples et/ou une déplétion (diminution du nombre de copies). Ces pathologies sont caractérisées par une importante hétérogénéité clinique et génétique et sont secondaires à des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans le maintien de l'ADNmt. De nos jours, la recherche des gènes responsables d'instabilité de l'ADNmt s'avère négative chez plus de 70% des malades, d'où un grand intérêt pour améliorer les techniques d'identification des mutations et la recherche de nouveaux gènes impliqués dans ces pathologies.

Mon travail de thèse est axé sur la compréhension et la caractérisation de certains mécanismes responsables d'une instabilité de l'ADNmt et comporte 3 parties :

1. L'étude et la comparaison de deux mutations du gène *MFN2* et leur implication en pathologie. La Mitofusine 2 (*MFN2*) joue un rôle dans la fusion des membranes mitochondriales. Les mutations du gène *MFN2* entraînent généralement une neuropathie périphérique isolée, sans instabilité de l'ADNmt, appelée maladie de Charcot Marie Tooth de type 2A (CMT2A). Le laboratoire a identifié une mutation faux-sens dans le domaine d'activité GTPase de la protéine (c.629A>T; p.D210V) qui cause un phénotype neurologique complexe plus sévère incluant une neuropathie périphérique et une atrophie optique associées à une myopathie mitochondriale avec délétions multiples de l'ADNmt (Rouzier et al., 2012). Nous avons voulu définir les mécanismes responsables de l'instabilité de l'ADNmt observée chez ces patients en comparant l'impact de la mutation p.D210V à celui d'une autre mutation responsable du phénotype CMT2A "classique" sans instabilité de l'ADNmt (c.496G>A ; p.A166T) dans les fibroblastes de patients porteurs respectivement de l'une ou de l'autre mutation *MFN2*. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative dans les principales fonctions mitochondriales analysées entre les cellules portant les mutations p.D210V ou p.A166T sauf en terme de fusion mitochondriale. De manière intéressante, nous avons mis en évidence un défaut de fusion dans les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} mais pas dans les cellules *MFN2*^{A166T/+}, qui se comportent comme les cellules contrôles. Ces résultats, qui demandent à être confirmés, suggèrent que la gravité du phénotype associé à la mutation p.D210V serait liée à un défaut de fusion mitochondriale qui ne serait pas perturbée dans le cas des mutations responsables de CMT2A « classique ».

2. L'étude de l'inactivation de l'hélicase mitochondriale Pif1 dans un modèle de souris knock out (*Pif1*^{-/-}). Nous nous sommes intéressés à l'une des hélicases mitochondriales qui jouent un rôle important dans le maintien et la stabilité de l'ADNmt : Pif1. Pour étudier le rôle de Pif1, nous avons analysé les effets de son inactivation sur les fonctions mitochondriales dans un modèle murin. Nous avons montré que les animaux *mPif1*^{-/-} (KO) développent une myopathie vers l'âge de un an avec une diminution des capacités physiques par rapport aux souris contrôles. Nous avons retrouvé un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale (déficit du complexe I) et des anomalies de structure et d'organisation des fibres musculaires dans le muscle des souris KO. Mon travail a permis de montrer que ce phénotype de myopathie mitochondriale s'accompagne d'une accumulation de délétions de l'ADNmt au niveau du muscle et d'une diminution de la réparation de l'ADNmt face au stress oxydatif. Nous avons également montré que l'isoforme mitochondriale de mPif1 interagit directement avec l'ADNmt expliquant l'effet sur la stabilité, le maintien et la réparation de ce dernier (Bannwarth et al., 2016).

3. L'identification de *CHCHD10*, un nouveau gène d'instabilité, a permis de montrer pour la première fois l'origine primaire d'un dysfonctionnement mitochondrial dans certaines formes de sclérose latérale amyotrophique (SLA). Nous avons mis en évidence un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et des délétions multiples de l'ADNmt au niveau du muscle de patients porteur d'une mutation faux sens (c.176C>T; p.Ser59Leu) dans le gène *CHCHD10*. Nous avons montré que *CHCHD10* était fortement exprimée dans les tissus humains riches en mitochondries et que la protéine est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial avec un enrichissement au niveau des crêtes mitochondriales. Les fibroblastes des patients présentent un déficit de la chaîne respiratoire, une fragmentation du réseau mitochondrial et une désorganisation des crêtes (Bannwarth et al., 2014a). Certains patients porteurs de la mutation p.Ser59Leu présentaient une atteinte du motoneurone. Notre groupe et plusieurs équipes internationales ont depuis montré que *CHCHD10* est responsable de SLA familiale et sporadique ainsi que d'autres maladies neurodégénératives. Ce travail a permis de montrer : (1) que *CHCHD10* est un nouveau gène responsable de pathologies mitochondriales avec instabilité de l'ADNmt, (2) que certaines formes de SLA et de maladies du motoneurone ont une origine mitochondriale.

INTRODUCTION

I. Les mitochondries.

1. Généralités.

Les mitochondries sont des organelles cytoplasmiques à double membrane présentes dans la plupart des cellules eucaryotes. Chez l'homme, il peut y avoir jusqu'à 1000 mitochondries par cellule ; l'ensemble des mitochondries d'une cellule étant appelé chondriome. Elles jouent de nombreux rôles cellulaires, notamment un rôle central dans le métabolisme énergétique. En effet, elles sont le siège de nombreuses réactions du métabolisme oxydatif dont le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras ou la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) réalisée par la chaîne respiratoire (CR) située au sein de la membrane interne (MI) mitochondriale. Les mitochondries sont impliquées également dans de nombreux processus tels que l'apoptose, la thermogénèse, la signalisation cellulaire, le stockage du calcium, la prolifération de cellules saines et tumorales ou le vieillissement ((Czarnecka et al., 2010) ; (Kujoth et al., 2006) ; (McFarland et al., 2007) ; (Trifunovic et al., 2004) ; (Rizzuto et al., 1998)). Le nombre de mitochondries est proportionnel à la consommation énergétique de la cellule. Plus un organe a besoin d'énergie, plus il aura de mitochondries ; les cellules musculaires, cardiaques, hépatiques et neuronales étant les plus riches en mitochondries.

2. Origine des mitochondries.

Les premières mitochondries furent observées dans le muscle en 1857 par Rudolph Albert Von Kölliker, un médecin anatomiste Suisse qui publia de nombreux ouvrages entre 1850 et 1890 pour décrire les différentes structures cellulaires présentes dans les tissus humains. C'est dans les années 1960 que Lynn Margulis, une microbiologiste américaine, émis l'hypothèse selon laquelle les mitochondries des cellules eucaryotes actuelles proviendraient de l'incorporation par endocytose incomplète d'une alpha-protéo-bactérie par une cellule proto-eucaryote anaérobie primitive (Figure 1). Ce phénomène évolutif de symbiose a permis à la cellule hôte d'utiliser l'oxygène pour produire de l'énergie et ainsi de survivre en condition aérobie. Aujourd'hui, cette théorie est largement acceptée et a été corroborée par certaines caractéristiques bactériennes maintenues chez les mitochondries ((Martin et al., 2015) ; (Archibald et al, 2015) ; (Zimorski et al., 2014) ; (Ku et al., 2015)) :

- elles possèdent leur propre ADN (ADNmt), circulaire, double brin, plus proche d'un génome procaryote que de l'ADN nucléaire, avec un code génétique légèrement différent du code génétique universel qui se trouve dans le noyau des cellules eucaryotes,
- elles sont entourées de deux membranes de composition différente, la membrane interne est proche d'une membrane de type bactérienne (elles ont en commun un phospholipide particulier : la cardiolipine) et la membrane externe mitochondriale qui ressemble beaucoup à la membrane d'une cellule eucaryote,
- les ribosomes des mitochondries (mitoribosomes) ressemblent beaucoup aux ribosomes des bactéries. Dans les deux cas, ils sont petits et vulnérables aux antibiotiques,
- les nouvelles mitochondries se forment uniquement par division. Les mitochondries sont des organites semi-autonomes de la cellule eucaryote, c'est-à-dire disposant d'un patrimoine génétique propre et capables de se diviser indépendamment du cycle cellulaire.

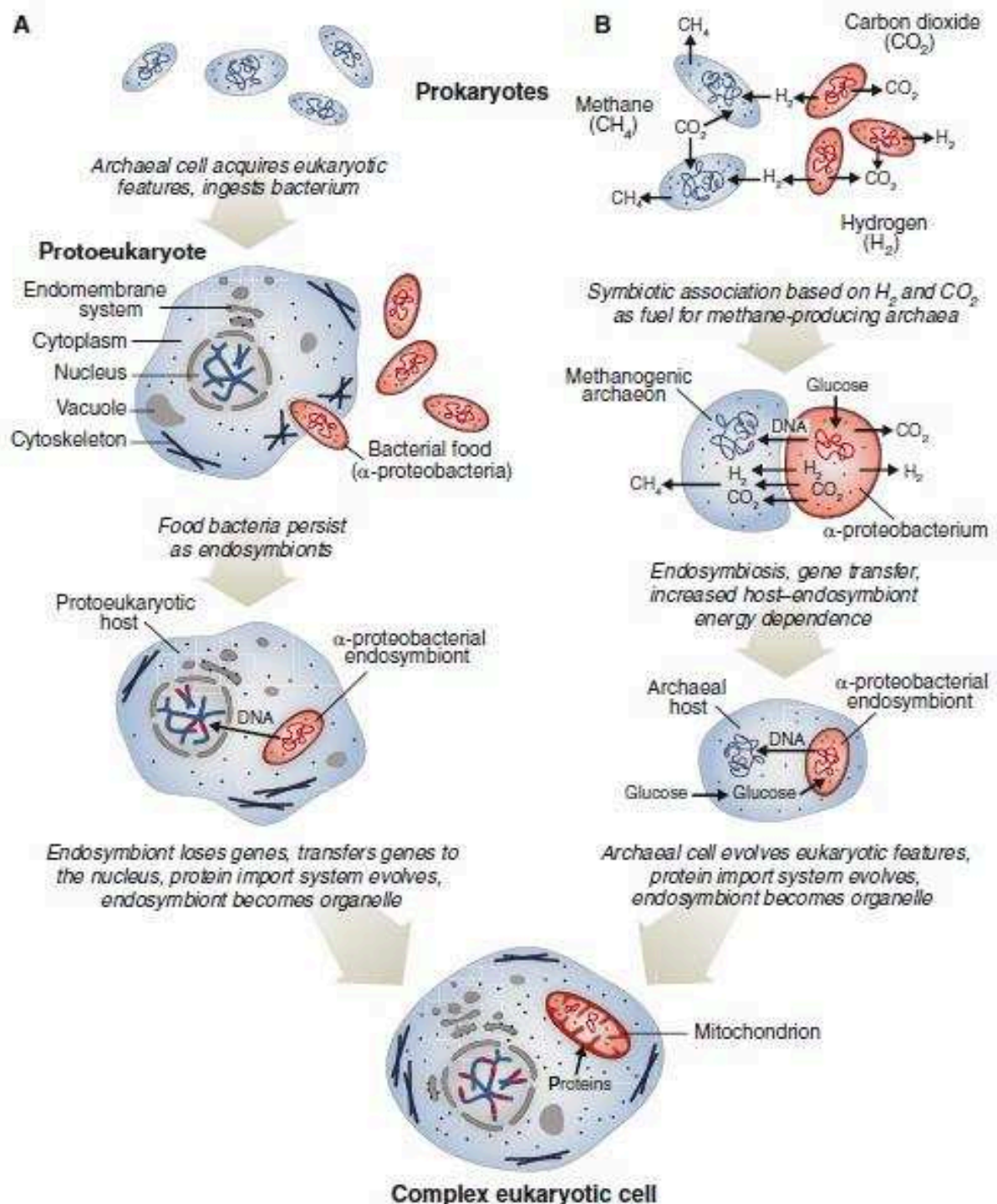


Figure 1 : Origine des mitochondries : théories endosymbiotiques.

Deux modèles sont en compétition pour expliquer la complexité des cellules eucaryotes et l'origine de leurs mitochondries au cours de l'évolution (d'après Archibald et al., 2015) :

- A.** Modèle d'une endosymbiose par phagocytose incomplète d'une alpha-protéobactérie qui est devenue la mitochondrie.
B. Modèle de « l'hydrogène » par symbiose métabolique entre une cellule ancestrale qui produit du méthane et une alpha-protéobactérie. Dans ce cas, la complexité des cellules eucaryotes actuelles est arrivée après l'endosymbiose.
 Les deux modèles impliquent le transfert de gènes (grandes séquences géniques transférées) de l'alpha-protéobactérie à la cellule hôte ancestrale et l'évolution d'un système pour l'import des protéines codées par le génome nucléaire à l'organe (endosymbionte).

3. Structure des mitochondries.

La taille et la forme des mitochondries dépendent et varient en fonction de l'état métabolique et du type cellulaire. En moyenne, elles mesurent 0,5-1 μm de diamètre sur 1-10 μm de long. Elles possèdent une double membrane : une membrane externe (ME) lisse et une membrane interne (MI) qui présente de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales, qui abritent les complexes de la chaîne respiratoire (CR) (Cogliati et al., 2016). Ces deux membranes ont des propriétés et une composition très différentes. Elles délimitent deux compartiments distincts : l'espace intermembranaire (IMS « Inter Membrane Space »), de 6-8 nm d'épaisseur, localisé entre les deux membranes et la matrice mitochondriale, délimitée par la membrane interne dans laquelle on trouve notamment les molécules d'ADNmt (Figure 2).

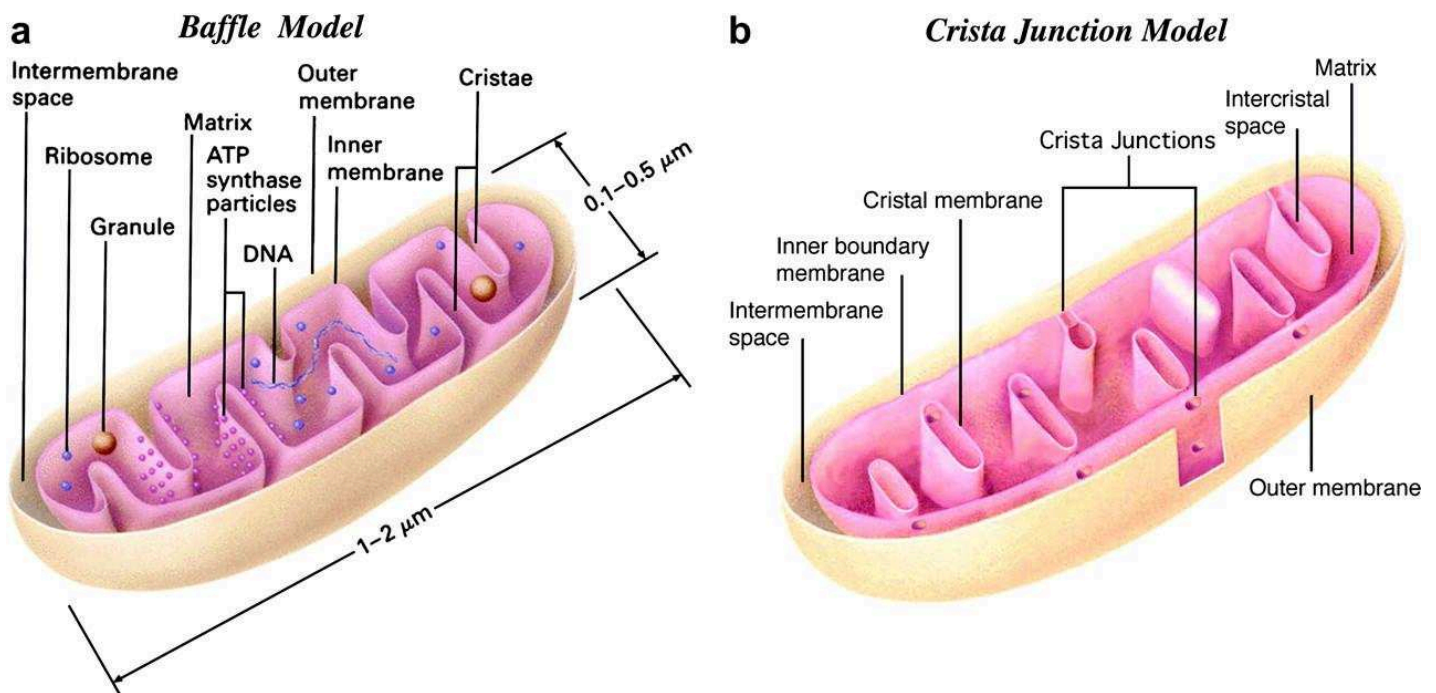
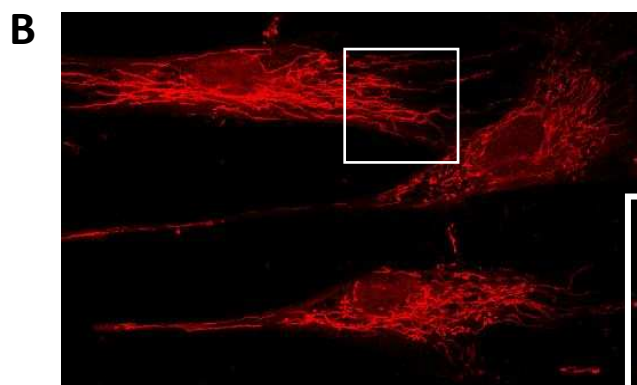
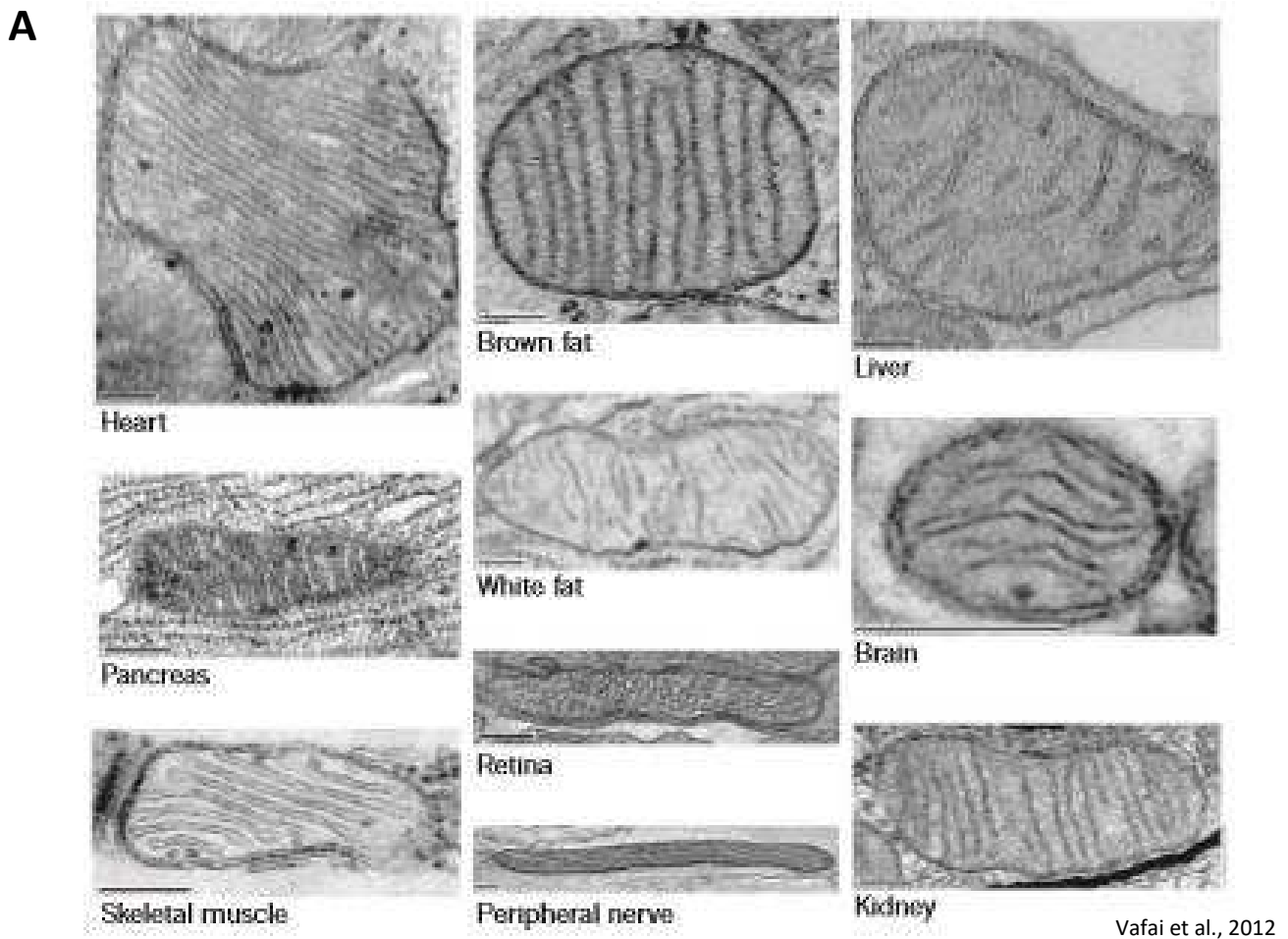


Figure 2 : Représentation schématique d'une mitochondrie.

- Représentation d'une coupe transversale d'une mitochondrie (baffle model) représentant la membrane externe (ME), la membrane interne (MI) qui forme les crêtes mitochondriales. Entre les 2 membranes, l'espace intermembranaire (IMS). À l'intérieur de la MI se trouve la matrice contenant le génome mitochondrial (ADNmt) en plusieurs copies, des granules et les ribosomes (mitoribosomes) (d'après Logan et al., 2006).
- Représentation schématique détaillée de la jonction des crêtes mitochondriales (d'après Logan et al., 2006).

A cause des premières images obtenues en microscopie électronique, on a longtemps considéré les mitochondries comme étant de petits organites isolés, présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. On sait aujourd'hui que les mitochondries constituent en réalité un réseau hautement dynamique, connecté qui fusionne et se fragmente en

permanence pour former ce que l'on appelle le réseau mitochondrial. Cette dynamique du réseau mitochondrial joue d'ailleurs un rôle fondamental dans la biogénèse des mitochondries (Figure 3).



Réseau mitochondrial marquage au mitotracker Red CMXRos[®]

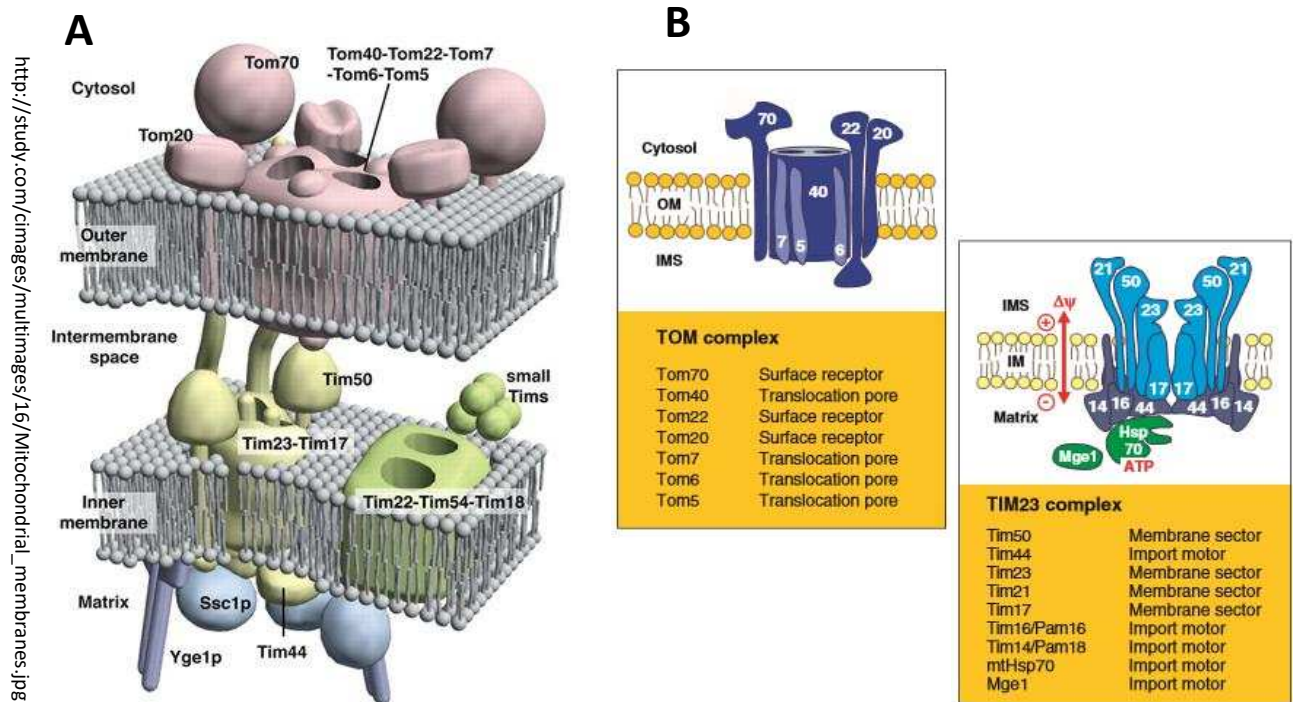
Figure 3 : Diversité de la morphologie des mitochondries et du réseau mitochondrial.

A. Images en microscopie électronique des mitochondries à partir de différents tissus ou cellules (barre d'échelle 200 nm) (d'après Vafai et al., 2012).

B. Image en immunofluorescence du réseau mitochondrial (rouge) après marquage de fibroblastes humains par du Mitotracker Red CMXRos[®] qui marque les mitochondries fonctionnelles en fonction de leur potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$).

3.1 Membrane mitochondriale externe.

La membrane externe est une bicouche lipidique de 5 à 7 μm d'épaisseur dont la composition est proche de celle de la membrane plasmique cellulaire ou de celle du réticulum endoplasmique. Elle est composée de 40% de lipides (principalement des phospholipides insaturés et un peu de cholestérol) et de 60% de protéines (des protéines de transport et d'import dans la mitochondrie, des enzymes et des récepteurs protéiques) et se caractérise par une forte perméabilité. Cette membrane est riche en porine, appelée VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) appartenant à la catégorie des "conductines" ou "protéines tunnel", une protéine membranaire qui forme des canaux aqueux d'environ 2 à 3 nm traversant la bicouche lipidique permettant le passage (transport passif) d'ions et de toutes les petites molécules organiques hydrophiles de masse moléculaire inférieure ou égale à 1000 Daltons (anions, cations, protons, acides gras, pyruvate, nucléotides...) (Logan et al., 2006). Les molécules de taille supérieure peuvent traverser cette membrane par transport actif à l'aide de protéines de transport membranaire mitochondriales ou de complexes protéiques spécialisés, les « translocases » ou autres transporteurs (complexe d'importation du cholestérol, par exemple). Cette membrane comporte également de gros complexes protéiques appelés TOM (« Transporter Outer Membrane ») constitués de plusieurs sous-unités protéiques (récepteurs et canaux aqueux) (Figure 4). Ils reconnaissent les séquences d'adressage mitochondrial (MTS), qui sont constituées de 15-30 acides aminés positionnés le plus souvent en N-terminal des protéines d'origine cytosolique, codées par des gènes nucléaires et destinées aux mitochondries et permettent leur entrée dans la mitochondrie et/ou leur bonne insertion au sein de la ME (Figure 5) ((Habib et al., 2007) ; (Neupert and Herrmann, 2007)).



Neupert and Hermann, 2007

Figure 4 : Les complexes d'import mitochondrial.

A. Représentation schématique des complexes multi-protéiques permettant l'import des protéines dans la mitochondrie. Les principaux complexes responsables de l'import, situés dans les membranes externes et internes sont représentés. B. Détail des protéines constituant les complexes TOM et TIM (OM : Outer Membrane, IMS : InterMembrane Space, IM: Inner Membrane) (D'après Neupert and Hermann, 2007).

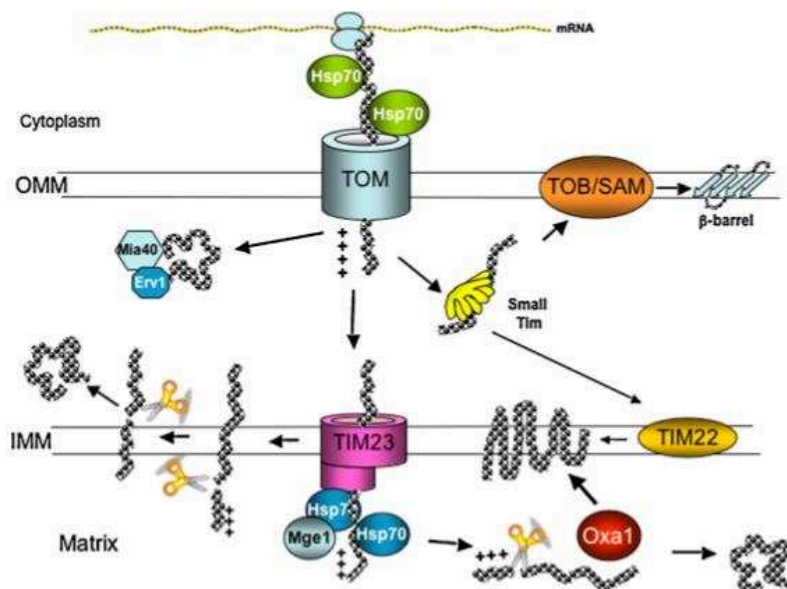


Figure 5 : Représentation schématique de l'import mitochondrial.

Les protéines codées par le génome nucléaire sont importées dans la mitochondrie selon plusieurs voies en fonction de leur destination finale. La plupart des protéines de la matrice sont synthétisées sous forme de précurseurs qui contiennent un peptide signal en N-terminal (MTS) et qui permet leur translocation grâce aux chaperonnes Hsp70/Mge1 via les complexes TOM et TIM23. Une fois dans la matrice ce peptide signal est coupé par une protéase mitochondriale pour donner la forme mature de la protéine. Les protéines de la membrane interne sont transportées par TOM et TIM23 mais sont transférées latéralement dans la membrane. D'autres protéines de la membrane interne sont importées dans la matrice par TOM et TIM23 et insérées dans la membrane interne avec l'aide de Oxa1 (d'après Diaz et al., 2007). Les protéines localisées dans l'espace intermembranaire (IMS) ne possèdent généralement pas de MTS à leurs extrémités N-terminales. La voie Mia40/Erv régule la formation des ponts disulfures des protéines de l'IMS (d'après Diaz et al., 2007).

3.2 Membrane mitochondriale interne.

La membrane interne présente des similitudes de composition lipidique avec les membranes bactériennes. Elle est composée de 75% de protéines (en majorité hydrophobes) pour seulement 25% de lipides, avec un faible taux de cholestérol (moins de 3%) et une forte concentration en cardiolipine (20% des lipides totaux de la MI). La cardiolipine (ou glycérol bisphosphatidyle) est un phospholipide double, particulier qui du fait de sa composition (il renferme 4 acides gras) rend la membrane imperméable aux ions (surtout aux protons). Ce lipide est indispensable au bon fonctionnement de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale). La surface de la membrane interne est 5 à 10 fois supérieure à celle de la membrane externe en formant de nombreux replis dirigés vers l'intérieur de la mitochondrie que l'on appelle les crêtes mitochondriales. Ces crêtes permettent d'augmenter la surface d'échange entre le milieu extérieur et la matrice mitochondriale ainsi que la production d'énergie en augmentant le nombre de complexes de la chaîne respiratoire. La forme et le nombre des crêtes peuvent varier en fonction de l'espèce, du type cellulaire et de l'activité mitochondriale (respiration cellulaire, oxydation des acides gras...). On trouve plusieurs familles de protéines impliquées dans la composition de cette membrane (Figures 4 et 5) :

- les protéines impliquées dans le transport de molécules :

- les complexes protéiques d'importation de la membrane interne TIM (Transporter Inner Membrane) composés de 3 sous-unités TIM22, TIM23 et OXA ayant chacune une fonction définie : TIM22 permet l'insertion des protéines dans la MI, TIM23 permet le passage des protéines de l'espace inter membranaire à la matrice mitochondriale et OXA permet la sortie de la matrice des protéines,
- les perméases, les translocases (ATP et ADP par exemple),
- les canaux ioniques (Na^+ , K^+ , Ca^{++} ...),
- les antiports ADP/ATP et malate/ Pi (qui transfèrent le malate d'origine matricielle vers l'espace inter-membranaire),
- la navette malate/aspartate qui transfère le malate vers la matrice,
- les PTPs (permeability transition pores), mégacanaux formés par le contact transitoire entre ME et MI, qui ont un rôle dans l'apoptose.

- les enzymes et complexes enzymatiques tels que les cytochromes P450, les enzymes de la synthèse des stéroïdes, l'adrenoxine et adrenoxine réductase transportant les électrons entre le NADH et le cytochrome P450 ou les protéines de découplage qui permettent le passage des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice.

- les complexes de la chaîne respiratoire, responsables de la respiration cellulaire et de la production d'énergie *via* la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Voir paragraphe 5).
- le complexe MICOS pour « Mitochondrial Contact Site », complexe multi-protéique qui contrôle le maintien et l'architecture des crêtes mitochondriales (Voir paragraphe 3.3).

3.3 Organisation et maintien des crêtes mitochondriales.

Les crêtes sont des invaginations de la MI qui vont former de larges boucles membranaires dans la matrice mitochondriale. Les crêtes sont maintenues à leur base par de nombreuses protéines qui forment ce que l'on appelle : les jonctions des crêtes (Figure 6). Ces jonctions laissent un espace de 20-50 nm de diamètre à la base des deux membranes qui forment la crête et préviennent ainsi de la diffusion des contenus en protéines, solutés ou métabolites entre l'espace intermembranaire (voir paragraphe 3.4 sur l'espace intermembranaire) et l'espace intra-crêtes (Mannella, 2006). Les jonctions permettent ainsi de séquestrer et de réguler la composition de ces deux compartiments. Ces jonctions sont formées par de gros complexes protéiques : les complexes MICOS (« Mitochondrial contact site and organizing system complex ») ((Hoppins et al., 2007) ; (Harner et al., 2011) ; (von der Malsburg et al., 2011)). Des défauts de l'un des composants de MICOS entraîne une désorganisation des crêtes due à la perte des jonctions ainsi qu'un déficit de la respiration mitochondriale ((Bohnert et al., 2015); (Barbot et al., 2015) ; (Friedman et al., 2015)). En conditions physiologiques, le remodelage des crêtes se fait principalement en réponse aux besoins métaboliques. En présence de substrats non glycolytiques ou en conditions restreintes en nutriments, le nombre des crêtes augmente, ainsi que le nombre de complexes et de super-complexes de la chaîne respiratoire. Il y a aussi une augmentation de l'oligomérisation de l'ATPase pour augmenter l'activité de la chaîne respiratoire et optimiser la production d'ATP ((Gomes et al., 2011) ; (Cogliati et al., 2016) ; (Patten et al., 2014)). Indépendamment du métabolisme, la morphologie des crêtes peut également être modulée au cours de l'apoptose, au cours de laquelle la largeur des crêtes diminue ce qui permet le relargage de molécules apoptotiques ((Frezza et al., 2006); (Cipolat et al., 2006); (Scorrano et al., 2002)). En plus des complexes MICOS, d'autres protéines sont impliquées dans le maintien et la structure des crêtes. On retrouve l'ATP synthase et son inhibiteur endogène IF1 ((Daum et al., 2013) ; (Faccenda et al., 2013a) ; (Faccenda et al., 2013b) ; (Cipolat et al., 2004)). Ainsi que la protéine OPA1 ((Wong et al., 2000) ; (Cipolat et al., 2004)), une protéine qui joue un rôle au niveau de la fusion mitochondriale (voir paragraphe 7.3 de la dynamique mitochondriale). Elle participe au

remodelage des crêtes indépendamment de son activité de fusion (Figure 6B) ((Pernas and Scorrano, 2016); (Cogliati et al., 2016)).

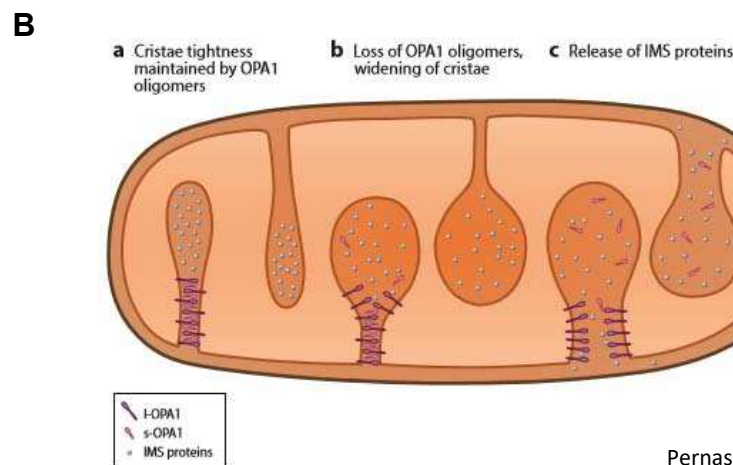
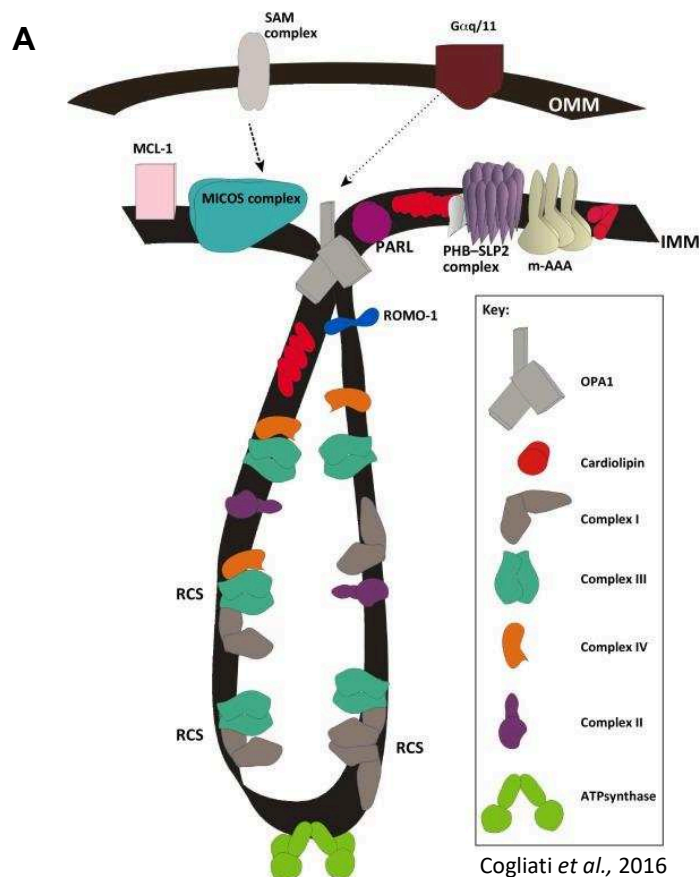


Figure 6 : Représentation schématique de la composition et de la formation des crêtes mitochondriales.

A. Organisation générale des crêtes mitochondriales (d'après Cogliati *et al.*, 2016).

Les membranes externes et internes sont représentées (noir) ainsi que les différents complexes protéiques qui interviennent dans le maintien de l'architecture des crêtes (notamment MICOS, OPA1) et dans la composition des 5 complexes de la chaîne respiratoire.

B. Le remodelage des crêtes est médié par OPA1 (d'après Pernas *et al.*, 2015).

- Organisation et maintenance de la jonction des crêtes par les oligomères L-OPA1 and S-OPA1.
- Perturbation des oligomères OPA1 et élargissement de la membrane qui forme les crêtes.
- Perte de la structure des crêtes, ouverture de la jonction des crêtes, et relargage des protéines séquestrées dans l'IMS et dans les crêtes.

OMM : membrane externe ; IMM : membrane interne ; IMS : espace intermembranaire ; L-OPA1 : isoforme longue d'OPA1 ; S-OPA1 : isoforme courte d'OPA1.

3.4 Espace intermembranaire.

L'espace intermembranaire (IMS) est un compartiment où transitent les molécules de taille inférieure à 10 kDa qui ont traversées la membrane externe. Il est fortement concentré en protons et contient de nombreuses protéines qui peuvent avoir un rôle dans la physiologie cellulaire, en particulier le cytochrome c et des pro-caspases impliqués dans l'apoptose et un important groupe d'enzymes qui métabolisent l'ATP : la créatine kinase, la myokinase et la nucléoside diphosphate kinase (cytidine diphosphate kinase) (Logan et al., 2006). C'est également le siège de réactions d'oxydation qui assurent la formation de ponts disulfures au niveau de certaines protéines qui résident dans l'espace intermembranaire. Les protéines Mia40 et Erv1 jouent un rôle important dans ces réactions.

3.5 Matrice mitochondriale.

La matrice mitochondriale contient de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras, le cycle de l'urée, la cétogenèse...). Elle possède également plusieurs copies d'ADN mitochondrial ainsi que les composants nécessaires à son métabolisme : ARNs ribosomiques et ARNs de transferts, nucléotides phosphates (ADP, ATP), mitoribosomes et toutes les enzymes intervenant dans les étapes de réplication, transcription, traduction et réparation de l'ADNmt. On y trouve aussi des réserves sous formes de granules denses contenant des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} (20 à 50% du calcium cellulaire est stocké dans les mitochondries)(Logan et al., 2006).

4. Génome mitochondrial : l'ADN mitochondrial (ADNmt).

L'origine endosymbiotique des mitochondries explique que ces organites possèdent leur propre génome avec un code génétique différent de celui de l'ADN nucléaire. C'est une molécule qui peut être circulaire (épisode), linéaire, branchée, généralement sans intron. Il existe cependant quelques rares introns autoépissables chez les champignons et les levures. Sa taille et son contenu en gènes varient d'une espèce à l'autre. Chez les animaux supérieurs, la taille varie entre 15 000 et 24 000 paires de bases, mais peut être 10 à 100 fois plus grande chez les champignons et les plantes. Chez l'homme, l'ADN mitochondrial présent dans la matrice représente 1% de l'ADN cellulaire total.

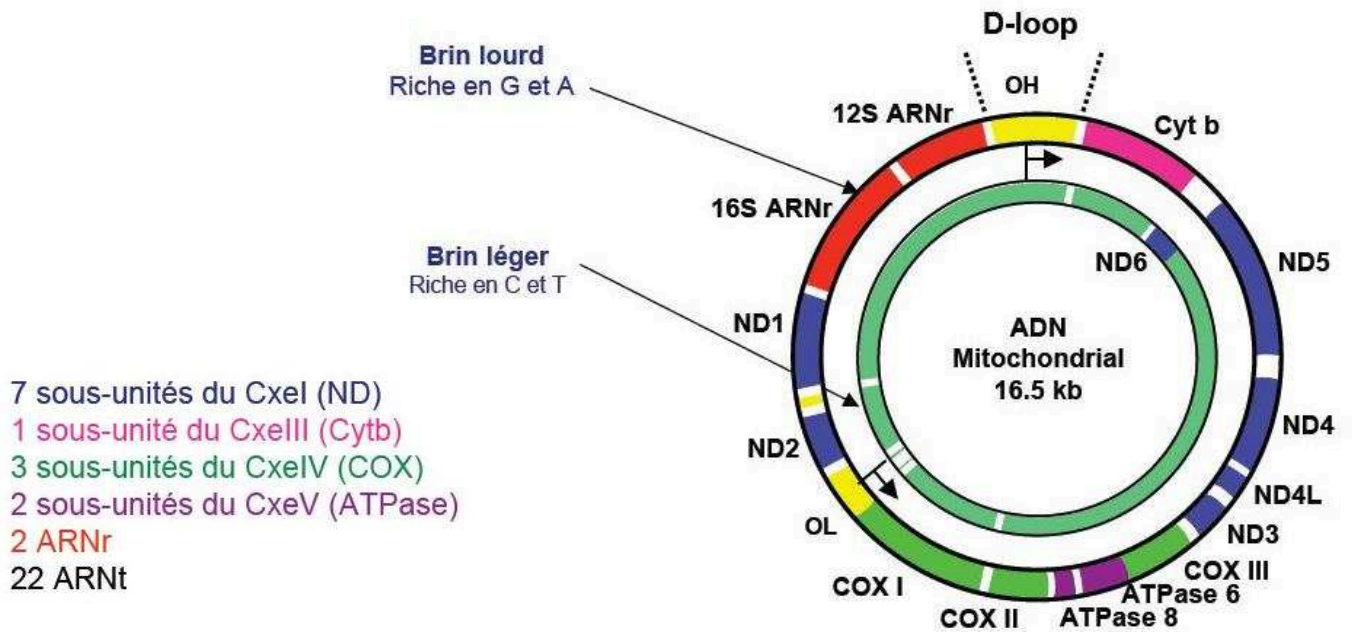


Figure 7 : Représentation schématique de l'ADNmt (ADN double brin circulaire de 16,5kb).

Les 13 gènes codants pour les sous-unités protéiques des différents complexes de la chaîne respiratoire sont représentés. OL et OH : origine de répllication du brin lourd et du brin léger. Le brin léger est représenté à l'intérieur et le brin lourd à l'extérieur. D-loop : région de contrôle de la répllication et de la transcription.

ND : NADH-déshydrogénase, COX : cytochrome c-oxydase, ATPase : ATP-synthase, ARNr : ARN ribosomal.

4.1 Structure et organisation de l'ADNmt humain.

Chez l'homme, le génome mitochondrial est une petite molécule d'ADN bicaténaire, circulaire, de 16569 pb (Figure 7). L'ADNmt ne contient pas d'intron et très peu de séquences intergéniques et intercistroniques. Les deux brins sont codants, historiquement appelés brin lourd (brin H pour « heavy ») et brin léger (brin L pour « light »). Le brin H est riche en guanines qui lui confèrent un poids moléculaire plus élevé que le brin L. L'unique région non codante de l'ADNmt correspond à la boucle de déplacement (D-loop), qui s'étend sur 1,1 kb et qui comporte l'origine de répllication du brin lourd et les promoteurs des 2 brins. Ce génome code pour :

- 22 ARN de transfert (ARNt), indispensables à la traduction mitochondriale,
- 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S), qui composent les mitoribosomes (Mai et al., 2016),
- 13 sous-unités protéiques appartenant à quatre des cinq complexes de la chaîne respiratoire :
 - ND1 à ND6 et ND4L pour le complexe I (CI),
 - cytochrome *b* pour le complexe III (CIII),
 - COX1 à COX3 (cytochrome c oxydase) pour le complexe IV (CIV),

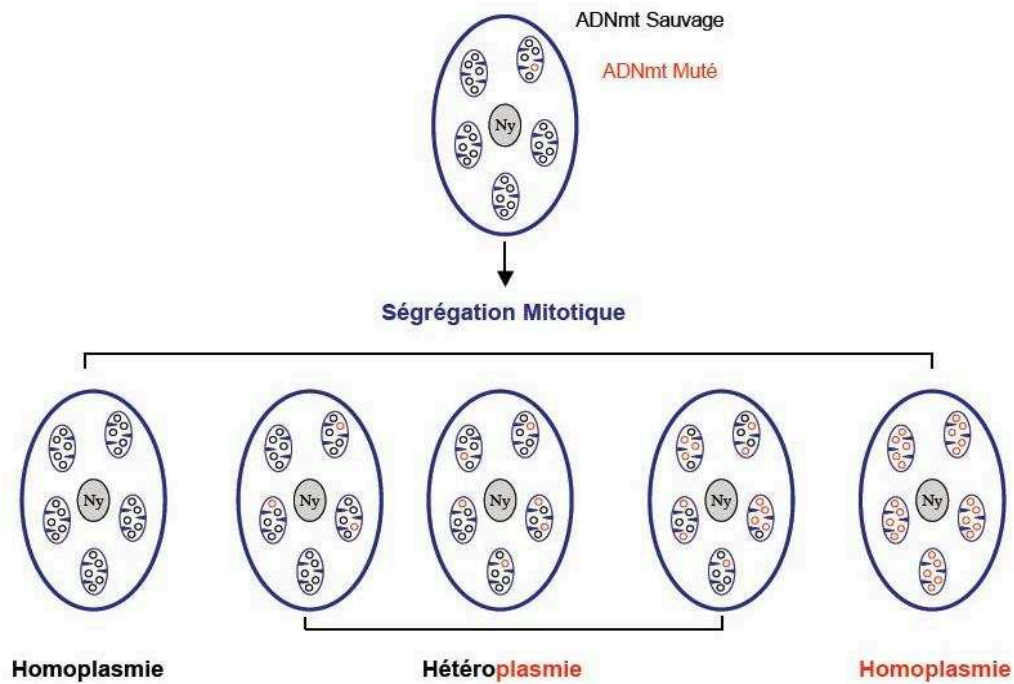
- ATPase 6 et 8 pour le complexe V (CV).

Seules toutes les sous-unités qui composent le complexe II (CII) sont entièrement codées par des gènes nucléaires et sont importées dans la mitochondrie, après traduction cytosolique, grâce à un signal d'adressage spécifique ((Neupert and Herrmann, 2007) ; (Habib et al., 2007) ; (Mokranjac and Neupert, 2007) ; (Chacinska et al., 2009) ; (Acin-Perez and Enriquez, 2014) ; (Dudkina et al., 2010) ; (Genova and Lenaz, 2015) ; (Genova and Lenaz, 2014) ; (Vartak et al., 2013)).

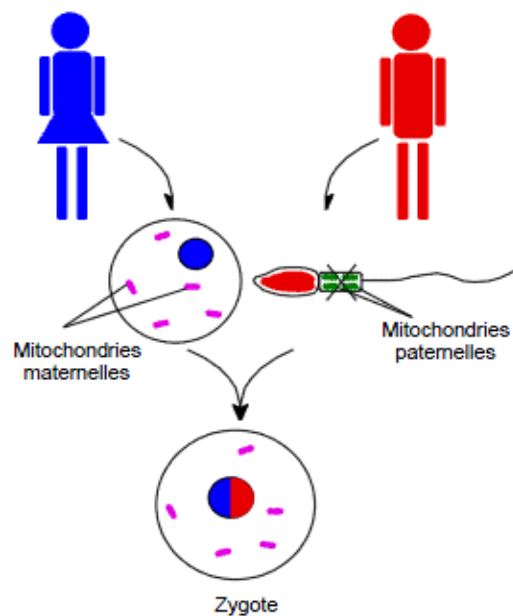
Le nombre de copies d'ADNmt est variable. Chez l'homme, il y a de 1 à 10 copies d'ADNmt dans la matrice par mitochondrie. Les cellules peuvent contenir plusieurs milliers de copies d'ADNmt réparties dans plusieurs centaines de mitochondries (environ 5000 copies par cellule). L'ADNmt est localisé à la MI et fait partie de structures nucléoprotéiques associées à la MI, appelées nucléoïdes ((Spelbrink et al., 2010) ; (Prachar et al., 2016)). Le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) est un composant majeur des nucléoïdes et joue un rôle dans leur organisation. Il recouvre complètement l'ADNmt et contribue directement à la régulation du nombre de copies de ce dernier ((Kaufman et al., 2007) ; (Pohjoismäki et al., 2006) ; (Prachar et al., 2016)). D'autres protéines ont été décrites comme des composants des nucléoïdes, notamment des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'ADNmt. On retrouve des enzymes qui s'associent pour la réplication, la transcription ou la réparation de l'ADNmt, comme la polymérase γ , l'hélicase Twinkle, la protéine mtSSB (mitochondrial Single-Stranded DNA Binding protein), l'ARN polymérase (POLRMT) ou le facteur de terminaison de la transcription mTERF. L'association des nucléoïdes à la MI est essentielle au maintien de l'intégrité et à la stabilité de l'ADNmt ((Spelbrink et al., 2010) ; (Gilkerson et al., 2013)).

Les molécules d'ADNmt sont porteuses de polymorphismes mais également de mutations délétères chez certains individus pouvant être à l'origine de maladies mitochondriales. Lorsqu'on ne retrouve, au sein d'une même mitochondrie, que des copies d'ADNmt sauvage ou muté : on parle d'homoplasmie. En cas de cohabitation des deux types de molécules (sauvages et mutées) au sein d'une même mitochondrie : on parle d'hétéroplasmie, dont la proportion relative conditionne l'apparition de nombreuses pathologies (Taylor and Turnbull, 2005)(Figure 8A).

A



B



<http://actscienceprepa.blogspot.fr/2015/02/le-narlement-analais-autrisme-les-bebes.html>

Figure 8 : Représentation schématique de la répartition des molécules d'ADNmt au cours de la division cellulaire et de l'origine maternelle de l'ADNmt au moment de la fécondation.

A. Ségrégation mitotique : Au cours de la division cellulaire les mitochondries se répartissent aléatoirement dans le cytoplasme des cellules filles. Les mitochondries contiennent plusieurs copies d'ADNmt sauvage (bleu) ou muté (rouge). Différents cas sont représentés en fonction de la proportion d'ADNmt sauvage ou muté dans la cellule : 100% ADNmt sauvage ou muté = homoplasmie, mélange ADNmt sauvage et muté = hétéroplasmie. Ny : noyau de la cellule.

B. Transmission maternelle des mitochondries et de l'ADNmt.

Lors de la fécondation, seul le patrimoine génétique nucléaire du spermatozoïde pénètre dans l'ovule. L'ADNmt de l'œuf est celui de la mère (rose). On parle de transmission maternelle du génome mitochondrial.

Les mitochondries sont transmises uniquement par la mère. Lors de la fécondation, seul le patrimoine génétique nucléaire du spermatozoïde pénètre dans l'ovule. Les mitochondries du flagelle ne pénètrent pas dans l'ovocyte. C'est ce dernier qui fournit le « pool de mitochondries » nécessaires au développement de l'œuf fécondé. L'ADNmt de l'œuf est celui de la mère. On parle de transmission maternelle du génome mitochondrial (Figure 8B).

La majorité des protéines mitochondriales étant d'origine nucléaire, le fonctionnement des mitochondries est tributaire d'une étroite communication entre le génome nucléaire et l'ADNmt. La double origine génétique des protéines mitochondriales présuppose que les dysfonctionnements mitochondriaux à l'origine des maladies mitochondriales ont pour cause des mutations au niveau de gènes mitochondriaux (mutations ponctuelles, délétions) ou des mutations dans des gènes nucléaires (dans la majorité des cas).

4.2 Réplication de l'ADNmt.

La réplication est le processus au cours duquel une molécule d'ADN mère est dupliquée pour donner deux molécules d'ADN filles, identiques à la molécule d'ADN mère initiale. Le processus est semi-conservatif car les deux molécules formées sont composées à la fois d'un brin d'ADN parental et d'un brin néo-synthétisé. La réplication commence à des endroits précis : les origines de réplication (ORI), reconnues par des protéines spécifiques de l'initiation de la réplication, et où sont recrutées toutes les protéines nécessaires (primases, topoisomérases, hélicases, polymérases...). Les hélicases permettent l'ouverture des deux brins de l'ADN et la mise en place des fourches de réplication libérant deux brins complémentaires pour que la synthèse de la moitié manquante soit réalisée par l'ADN polymérase à partir du brin matrice, selon la règle de complémentarité des bases. Ainsi chaque nouvelle molécule est identique à la molécule d'ADN initiale. L'élongation de l'ADN se fait toujours de façon orientée dans le sens 5' vers 3' (ajout possible des désoxyribonucléotides en 3' OH uniquement). Les deux brins parentaux étant orientés de manière antiparallèle, les mécanismes de réplication sont différents selon le brin parental utilisé comme matrice. La synthèse est réalisée directement pour le brin matrice orienté dans le sens 3'-5' et le brin néo-synthétisé 5'-3' est appelé brin direct pour « leading strand ». Pour l'autre brin matrice, orienté dans le sens 5'-3', la synthèse du brin complémentaire est faite de façon discontinue sous forme de fragments d'Okasaki (synthèse de plusieurs petits fragments à partir de plusieurs amorces d'initiation de réplication). Ce brin est dit indirect ou retardé pour « lagging strand » (Wanrooij and Falkenberg, 2010)). Un grand nombre de protéines interviennent dans la réplication de

l'ADN pour former le complexe enzymatique de réplication, appelé réplisome. Au niveau fonctionnel comme au niveau structural, on retrouve des homologies frappantes entre les protéines bactériennes et les protéines eucaryotes, ce qui indique une grande conservation des mécanismes de réplication au cours de l'évolution.

La réplication de l'ADNmt fait appel à une machinerie de réplication similaire mais simplifiée par rapport à celle que l'on peut trouver dans le noyau. Elle ressemble davantage à celle trouvée chez les procaryotes pour la réplication d'un génome circulaire. Le nombre de copies d'ADNmt est dépendant de la demande énergétique. C'est pour cette raison que la réplication de l'ADNmt s'effectue de façon tissu-spécifique et indépendamment du cycle cellulaire. Une réplication hautement fidèle de l'ADNmt est indispensable pour une production d'ATP efficace et pour le maintien du potentiel de membrane mitochondrial. Chez les mammifères, deux modèles de réplication sont actuellement proposés et toujours discutés : un modèle de « déplacement asynchrone » sur les deux brins de l'ADNmt et un modèle « couplé bidirectionnel » (voir paragraphe 4.3 les modèles de réplication) (Figure 11)((Brown et al., 2005) ; (Falkenberg et al., 2007a) ; (Wanrooij and Falkenberg et al., 2010) ; (Holt and Reyes, 2012)).

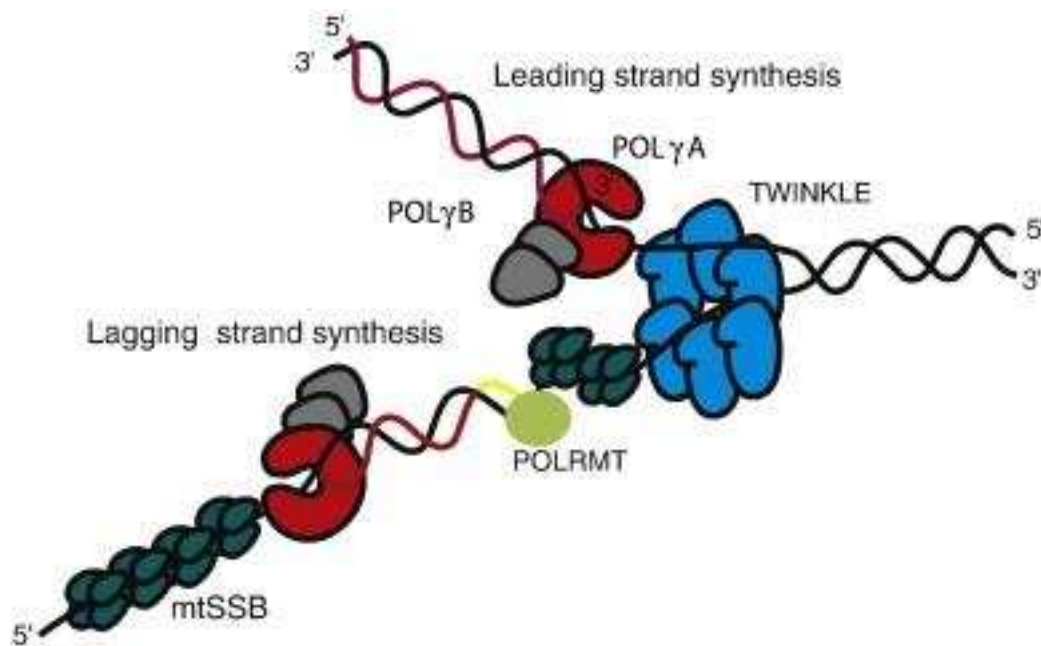
4.2.1 Réplisome mitochondrial minimal.

Des expériences *in vitro* ont permis d'identifier un « réplisome minimal » suffisant pour permettre la synthèse d'une molécule d'ADN circulaire d'une taille de 16 Kb, identique à celle de l'ADNmt humain ((Korhonen et al., 2004) ; (Falkenberg et al., 2007a) ; (Wanrooij and Falkenberg, 2010)). Ce réplisome minimal est composé de 3 types de protéines nécessaires et indispensables à la réplication d'une molécule d'ADNmt dans son intégralité (Figure 9) :

- 1) l'ADN polymérase mitochondriale (POL γ) qui catalyse la réaction de synthèse de l'ADNmt,
- 2) l'hélicase mitochondriale Twinkle qui effectue le «désenroulement» de l'ADN double brin dans le sens 5'-3',
- 3) les protéines mtSSB (Mitochondrial Single Strand DNA Binding proteins) qui stabilisent et protègent l'ADNmt et augmentent l'efficacité des deux autres enzymes (polymérase et hélicase).

In vivo, la réplication de l'ADNmt nécessite l'intervention d'autres enzymes, une primase, deux topoisomérases et une RNase H1. Toutes les protéines nécessaires à la réplication de l'ADNmt sont codées par le génome nucléaire, traduites dans le cytosol et importées dans la mitochondrie.

A



B

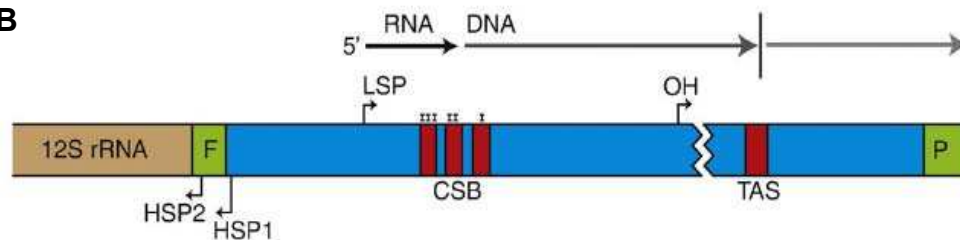


Figure 9 : Représentation schématique de la fourche de réplication de l'ADNmt.

A. L'hélicase Twinkle (bleu) se déplace de 5' en 3' en déroulant l'ADNmt double brin. La protéine mtSSB (vert foncé) stabilise l'ADNmt simple brin et active la synthèse de l'ADNmt par la polymérase γ (en rouge la sous unité A et en gris les sous unités B). POLRMT (vert clair) synthétise le primer ARN (jaune) nécessaire à l'initiation de la réplication.

B. Représentation schématique de la D-loop (Wanrooij et al, 2010).

LSP : Promoteur du brin léger, HSP : Promoteur du brin lourd, CSB : conserved sequence blocks, TAS : conserved termination-associated sequence, F : ARNt phenylalanine, P : ARNt proline.

4.2.2 Les acteurs de la réplication de l'ADN mitochondrial.

4.2.2.1. L'ADN Polymérase mitochondriale : POLG ou POLγ.

Les polymérases sont des enzymes capables de synthétiser des brins de polynucléotides (ARN ou ADN), le plus souvent en utilisant un brin complémentaire comme matrice et des nucléotides triphosphates (NTP ou dNTP) comme monomères. Généralement, la synthèse se fait dans le sens 5'-3' par la formation de liaisons

phosphodiester entre le 3' OH du brin allongé et le 5' phosphate du nucléotide triphosphate ajouté. Il existe 7 familles de polymérases : A, B, C, D, X, Y et RT qui diffèrent selon leurs séquences et leurs propriétés catalytiques. Une seule polymérase a été identifiée et localisée dans la mitochondrie, la polymérase mitochondriale POLG aussi appelée POLy (Garg and Burgers et al., 2005) ; (Kaguni et al., 2004) . Sa structure varie selon les espèces. L'holoenzyme humaine est un hétéro-trimère (Figure 10) composé :

- d'une sous-unité catalytique (5'-3') POLyA ou POLG1, de 140 kDa, codée par le gène *POLG1* ou *POLG* localisé en 5q25, qui possède également une activité de correction sur épreuve ou « proof reading » (exonucléase 3'-5') et une activité 5' dRP lyase, requise pour la réparation,
- de deux sous-unités accessoires dimériques POLyB ou POLG2, de 55 kDa, codées par le gène *POLG2* situé en 17q24.1 qui permet la liaison de l'enzyme à l'ADN et augmente son efficacité et sa processivité ((Yakubovskaya et al., 2006) ; (Carrodeguas et al., 1999) ; (Lee et al., 2010)).

POLy appartient à la famille A des polymérases. POLyA contient deux domaines majeurs d'activité : le domaine polymérase en C-terminal qui catalyse la synthèse d'ADN et le domaine exonucléase 3'-5' en N-terminal avec une activité de relecture qui permet l'élimination des bases mésappariées. Entre ces deux domaines, il y a un domaine « linker » ou « spacer » qui permet la liaison à l'ADN et l'interaction avec la sous-unité accessoire B proximale (Graziewicz et al., 2006). La liaison entre la sous-unité catalytique A et l'homo-dimère accessoire B est asymétrique. En effet, POLyA se lie d'abord avec la sous-unité proximale B qui augmente l'affinité avec l'ADN alors que la sous-unité distale B active la polymérisation. Les sous-unités accessoires potentialisent ainsi les activités polymérase et exonucléase de la sous-unité A et permettent d'augmenter la processivité de l'enzyme (Graziewicz et al., 2006). L'activité de correction sur épreuve permet une réplication fidèle de l'ADNmt (2.10^{-6} erreurs par nucléotide) ((Kunkel and Wilson, 1998) ; (Graziewicz et al., 2006)).

Toute erreur de séquence de l'ADNmt induite lors de la réplication peut avoir des effets délétères pour la mitochondrie, les cellules et les tissus. Plus de 160 mutations dans le gène humain *POLG* ont été identifiées et associées à des maladies mitochondriales (atteintes neuromusculaires, ophtalmoplégie externe progressive (PEO), syndrome d'Alpers, ataxie...) ((Chan and Copeland, 2009a) ; (Chan et al., 2009) ; (Kasiviswanathan et al., 2009) ; (Chan and Copeland, 2009b)). Ces variants pathogènes sont répartis sur toute la séquence exonique du gène et une liste de toutes les mutations identifiées dans *POLG* ainsi que les maladies associées peuvent être trouvées dans la base de données : [Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database](#). Ces mutations ont des répercussions sur la

stabilité de l'ADNmt et se traduisent soit par des anomalies qualitatives (accumulation de mutations ponctuelles et/ou de délétions multiples de l'ADNmt), soit par des anomalies quantitatives (diminution du nombre de copies de l'ADNmt ou déplétion). Les anomalies de l'ADNmt liées à des mutations de *POLG* se traduisent par un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale et par un dysfonctionnement des tissus et des organes.

➤ **Apport des modèles murins.**

Le rôle de *POLG* sur le maintien et la stabilité de l'ADNmt est important à définir pour mieux comprendre les relations entre l'instabilité de l'ADNmt et des processus physiologiques tel que le vieillissement ou des processus pathologiques à l'origine de maladies mitochondriales. La confirmation du rôle de *POLG* dans la réplication de l'ADNmt a été obtenue par l'étude d'un modèle murin knock-out (KO) (Hance et al., 2005). Les embryons homozygotes de ces souris arrêtent de se développer assez rapidement (entre 7-9 jours) et présentent une déplétion sévère de l'ADNmt. Les groupes de Larsson et Jacobs ont construit une souris knock-in (KI) appelée souris « mutator » ou « *POLGA* mutator » qui exprime une forme de *POLG* dont la sous unité A catalytique est déficiente pour l'activité exonucléase mais pas pour l'activité polymérase. Chez ces animaux, seule l'activité de relecture de *POLG* est déficiente (Trifunovic et al., 2004). Le phénotype clinique de ces souris est normal jusqu'à l'âge de 25 semaines (jeunes adultes). Puis, elles présentent des signes de vieillissement précoce (cyphose majeure, alopecie, ostéoporose, anémie, problèmes cardiaques ...) et une espérance de vie réduite avec une durée de vie moyenne de 48 semaines. D'un point de vue biochimique et moléculaire, ces souris ont des déficits multiples de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du muscle squelettique, du cœur et du cerveau avec des délétions multiples ainsi qu'une accumulation de mutations somatiques de l'ADNmt (de l'ordre de 9 à 15 mutations par kilobase d'ADNmt).

L'activité polymérase de *POLG* représente 1-5% des activités polymérases totales dans la cellule, et son activité de correction sur épreuve est essentielle. L'accumulation de mutations ponctuelles ou de délétions de l'ADNmt au cours du vieillissement chez l'homme est connue depuis longtemps. Cependant, ces mutations ne touchent qu'une très faible proportion de l'ADNmt total (de 0.1 à 1%) et leur implication dans les processus du vieillissement a longtemps été controversée (Kujoth et al., 2006). Ces souris ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, qu'une accumulation massive de mutations de l'ADNmt induisait un vieillissement précoce avec apparition des mêmes signes cliniques que ceux observés chez l'homme (Trifunovic et al., 2004). Ce modèle a également permis de montrer qu'un vieillissement prématuré pouvait survenir indépendamment d'une

augmentation des radicaux libres dont le taux était normal chez ces animaux. De nombreuses mutations des gènes *POLG1* et *POLG 2* ont été retrouvées chez des patients présentant des pathologies mitochondriales ((Tyynismaa and Suomalainen, 2010) ; (Kasahara et al., 2006) ; (Kasiviswanathan et al., 2009) ; (Chan and Copeland, 2009b) (Chan and Copeland, 2009a) ; (Young et al., 2011) ; (Longley et al., 2006) ; (Chan et al., 2009) ; (Young and Copeland, 2016)).

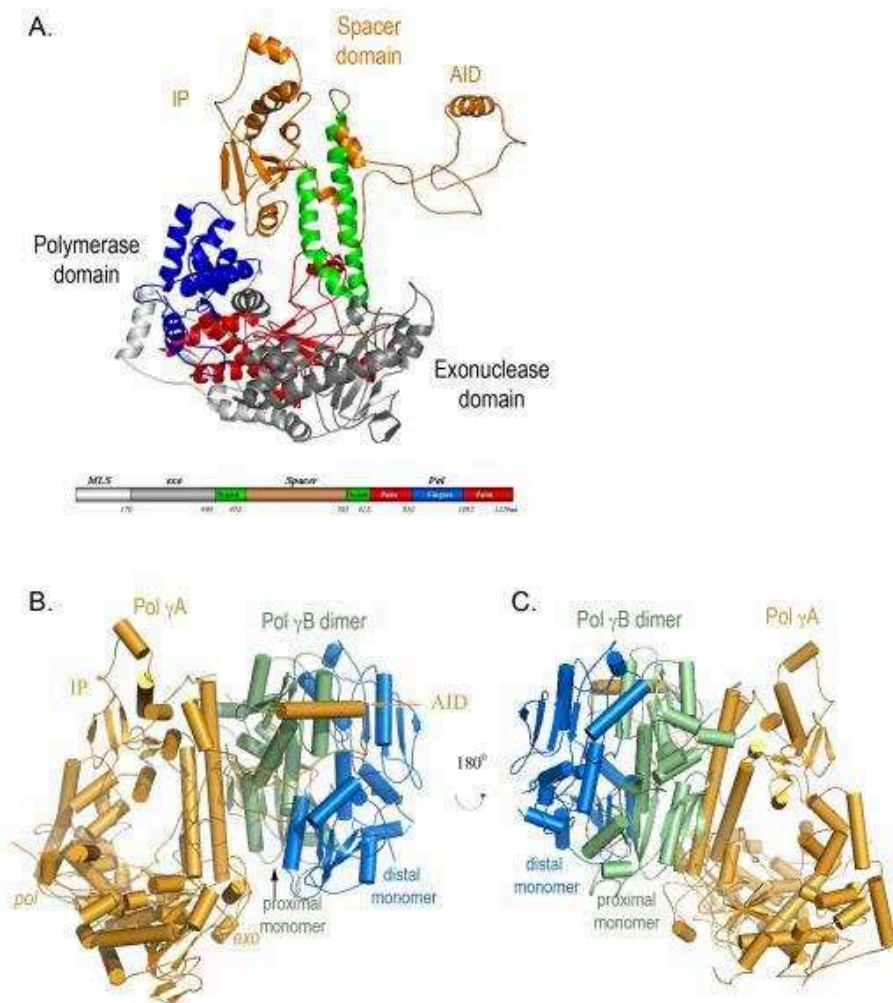


Figure 10 : Modélisation de PolG.

A. Structure de POLG-α. Le domaine *pol* a une forme en « main droite » avec le pouce en vert, la paume en rouge et les doigts en bleu. Le domaine *exo* est en gris. Le domaine « spacer » en orange est divisé en deux sous-domaines. Domaine N-terminal : 1-170; *exo*: 171-440; *spacer*: 476-785; *pol*: 441-475 and 786-1239.
 B-C. Structure de l'hétérotrimère POLG avec POLG-α en orange et les monomères POLG-β en vert pour le proximal et en bleu pour le distal (Lee et al., 2009).

4.2.2.2. Hélicases mitochondriales.

Les hélicases hydrolysent l'ATP ou le GTP pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques appariés sous forme double brin. Le déplacement des hélicases est orienté et leur activité translocase permet de décrocher les protéines qui y sont fixées. On retrouve 5 hélicases impliquées dans le métabolisme de l'ADNmt : Twinkle, Dna2, Pif1, Suv-3 et YB-1.

- L'hélicase du réplisome minimal : Twinkle.

Twinkle a été la première hélicase identifiée et localisée dans la mitochondrie chez les mammifères grâce à son homologie de séquence avec la primase-hélicase du phage T7 (Spelbrink et al., 2001). Le gène codant pour Twinkle (*c10orf2* ou *POE1*) a été localisé chez l'homme sur le chromosome 10 en position q24. Des études réalisées *in vitro* ont montré que cette hélicase utilise l'ATP pour dérouler l'ADNmt dans le sens 5'-3' grâce à 5 motifs hélicase en C-terminal de la protéine ((Korhonen et al., 2004); (Holt and Reyes, 2012)). Cette hélicase possède également une activité primase (motif primase en N-terminal) qui pourrait participer à l'amorçage de la réplication de l'ADNmt (Shutt and Gray, 2006). C'est une protéine de 77 kDa (684 AA) active sous forme d'hexamères en « anneau » qui s'oligomérisent grâce au domaine « linker » situé entre les parties N- et C- terminales de la protéine, et qui constituent un canal dans lequel passe l'ADN pour être déroulé. Chez l'homme, la distribution de Twinkle est ubiquitaire, et son expression est élevée dans les tissus à forte activité métabolique, en particulier le muscle squelettique (Spelbrink et al., 2001). Twinkle est localisée au niveau des nucléoïdes mitochondriaux et son inactivation dans des cellules humaines induit une disparition rapide et totale de l'ADNmt (Tynismaa et al., 2005).

➤ Apport des modèles murins.

Le rôle majeur de Twinkle dans le maintien de l'ADNmt a été confirmé *in vivo* grâce à l'obtention de souris transgéniques. La surexpression de la forme sauvage de la protéine chez la souris induit une augmentation du nombre de copies d'ADNmt, notamment dans le muscle cardiaque et squelettique de ces souris (augmentation d'un facteur 3). Cette augmentation est due à une augmentation du taux de réplication de l'ADNmt (Tynismaa et al., 2005). Plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant différentes mutations du gène *Twinkle* ont été construites ((Tynismaa and Suomalainen, 2009) ; (Tynismaa and Suomalainen, 2010)). Elles sont appelées « deletor » car elles accumulent progressivement des délétions multiples de l'ADNmt dans les tissus post-mitotiques tel que le cerveau, le muscle squelettique et le cœur. Des fibres COX négatives sont présentes dans le muscle

des animaux, signe d'une myopathie mitochondriale. Les phénotypes observés rappellent ceux qui ont été décrits chez les patients porteurs de mutations dans le gène codant pour Twinkle ((Goffart et al., 2008) ; (Wanrooij and Falkenberg, 2010) ; (Tyynismaa et al., 2005) ; (Spelbrink et al., 2001) ; (Young and Copeland, 2016)). Ces mutations sont responsables en majorité d'une ophtalmoplégie externe progressive (PEO) chez l'adulte, souvent accompagnée d'une myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt. Ces souris ont également permis de comprendre les mécanismes de délétion de l'ADNmt. Les formes mutantes de Twinkle entraînent un blocage des fourches de réplication de l'ADNmt, ce qui conduit à des cassures de l'ADN engendrant des délétions qui s'accumulent au sein des tissus post-mitotiques (Goffart et al., 2008).

Parmi les autres hélicases mitochondriales, PiF1 m'intéresse plus particulièrement car j'ai été amenée à participer à l'étude d'un modèle murin dans lequel cette hélicase était inactivée. Ces résultats seront présentés dans le chapitre page 37.

4.3 Les modèles de réplication.

Chez les mammifères, les mécanismes de réplication de l'ADNmt ont été initialement étudiés dans les années 60-70 à partir de mitochondries isolées de cellules de rongeurs (Kasamatsu and Vinograd, 1973). Il y a deux origines de réplication sur l'ADNmt humain, une origine pour le brin lourd (OH) située dans la D-LOOP et une origine de réplication pour le brin léger (OL). La D-LOOP contient également les origines de transcription des deux brins (HSP pour Heavy Strand Promotor et LSP pour Light Strand Promotor). Une amorce ARN d'environ 100 nucléotides, synthétisée par POLRMT, à partir du promoteur LSP est nécessaire à l'ADN polymérase avec formation d'un duplex ARN/ADN. L'amorce ARN sert à la réplication et à la transcription liant intimement ces deux processus fondamentaux pour le métabolisme de l'ADNmt. Pour la réplication, l'amorce doit être maturée au niveau d'un site spécifique, permettant la libération d'une extrémité 3'OH qui sera utilisée par POLG pour l'initiation de la synthèse de l'ADNmt.

Deux modèles sont discutés pour la réplication de l'ADNmt (Figure 11) :

- Un modèle de déplacement « asynchrone » des deux brins de l'ADNmt,
- Un modèle de réplication « couplée » des deux brins de l'ADNmt.

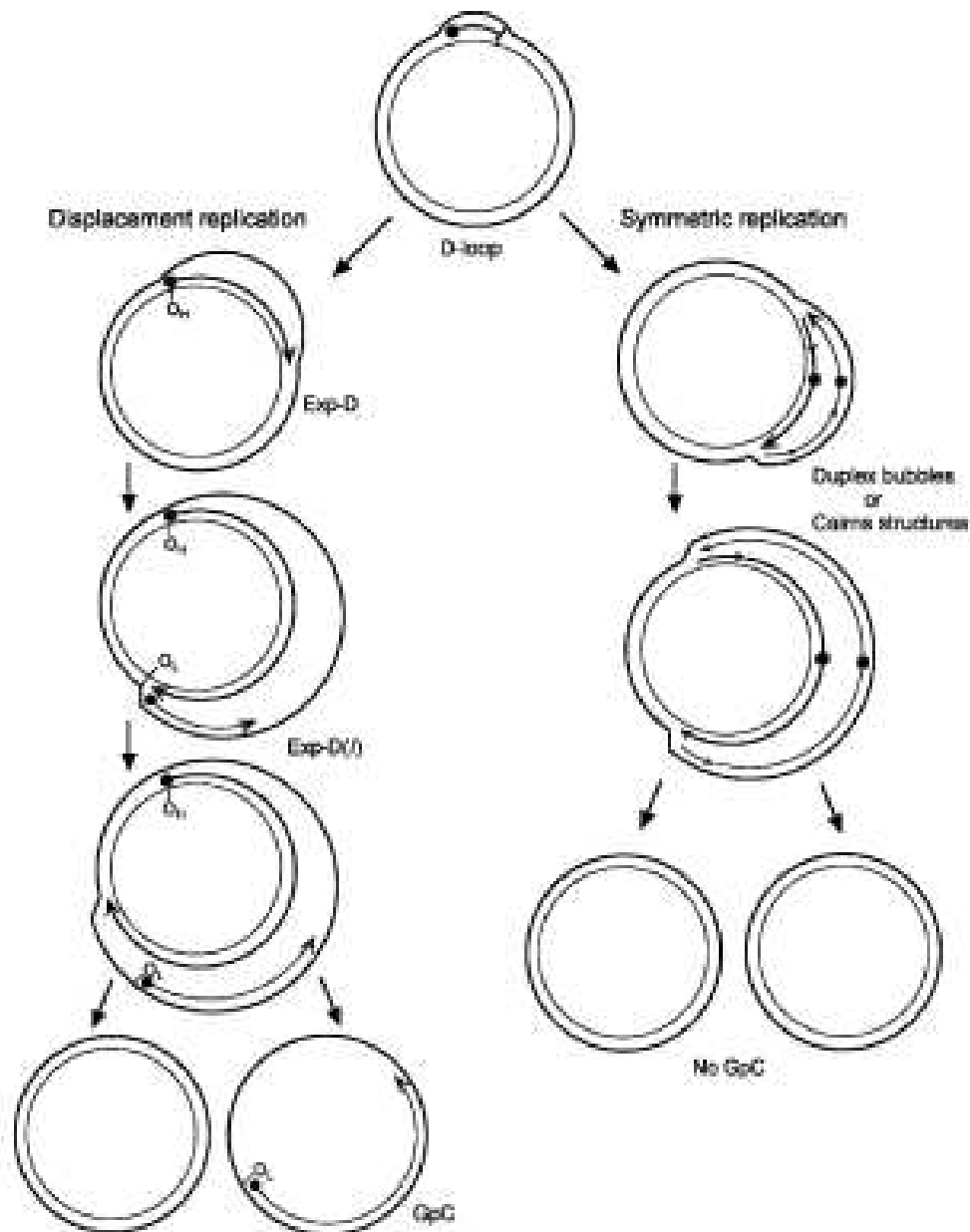


Figure 11 : Représentation schématique des 2 modèles de réplication de l'ADNmt : le modèle « asynchrone » à gauche et le modèle « coupled-strand » à droite.

Dans le modèle de déplacement asynchrone la réplication du brin H se déroule seule jusqu'à ce que l'origine de réplication du brin L (OriL) soit exposée, entraînant la formation d'intermédiaires appelés « expanded D-loops » (Exp-D). La synthèse du brin L commence alors en direction opposée créant la formation d'intermédiaires appelés (Exp-D(I)). Ce modèle aboutit à la formation de deux molécules filles, une complète et une avec un brin L incomplet appelé « gapped circle » (GpC). Dans le modèle « coupled-strand », la réplication débute au niveau d'une région proche de la D-loop. A ce niveau-là les deux brins sont synthétisés en même temps en direction opposée. Les formes Exp-D, Exp-D(I) et GpC n'existent pas dans ce modèle (d'après Brown et al, 2005)..

4.3.1 Modèle de déplacement asynchrone.

Le premier modèle de réplication de l'ADNmt décrit est le modèle de « déplacement asynchrone ». L'initiation de la réplication des 2 brins se fait de façon asymétrique et asynchrone en deux endroits distincts de l'ADNmt. Elle débute à l'origine de réplication du brin lourd (OH) grâce à l'amorce ARN d'environ 100 nucléotides synthétisée par POLRMT (Wanrooij and Falkenberg, 2010). Les protéines nécessaires à la réplication sont alors recrutées et la synthèse d'ADN réalisée par POLG se déroule unidirectionnellement dans le sens des aiguilles d'une montre. Lorsque la fourche de réplication a parcouru 2/3 de la distance génomique, elle atteint l'origine de réplication du brin léger (OL). Celle-ci est alors exposée, permettant d'initier la réplication du brin léger dans le sens opposé à celui du brin lourd (Figure 11). ((Brown et al., 2005) ; (Clayton et al., 1982); (Clayton et al, 2003) ;(Holt et al., 2000)). L'initiation de la réplication du brin léger est peu connue mais il semble que sa structure soit reconnue par une des sous-unités de POLG qui présente des homologies de séquences avec des sites actifs des aminoacyl-ARNt synthétase de classe II (Seligmann et al., 2010). La synthèse du brin léger est initiée plus tardivement que celle du brin lourd. C'est pour cela qu'on parle de réplication asymétrique. L'élimination des amorces est réalisée par la RNase H1 et les séquences manquantes sont remplacées par POLG. La synthèse s'arrête lorsque les deux fourches de réplication se rencontrent et les deux molécules filles, contenant chacune l'un des deux brins parental de l'ADNmt, se séparent ((Falkenberg et al., 2007b) ; (Wanrooij and Falkenberg, 2010) ; (Holt and Reyes, 2012)).

4.3.2 Modèle de déplacement couplé.

Le modèle « asynchrone » de réplication de l'ADNmt est toutefois remis en cause par des expériences *in vitro* de migration par électrophorèse sur gel d'agarose en 2 dimensions et reste encore aujourd'hui discuté. Ces expériences suggèrent l'existence d'intermédiaires formés pendant la réplication mettant en évidence de multiples origines de réplication sur le brin léger. C'est le modèle dit « couplé » de la réplication mitochondriale (Figure 11) ((Holt et al., 2000) ; (Yang et al., 2002) ; (Holt et al., 2010) ; (Brown et al., 2005) ; (Holt and Reyes, 2012). Dans ce modèle, la réplication de l'ADNmt se fait à partir d'une région proche de l'origine de réplication du brin lourd, et les deux fourches de réplication progressent alors en sens opposé, de façon directe pour le brin lourd et à partir de plusieurs origines pour le brin léger. Une alternative au modèle couplé a également été proposée suite à des expériences mettant en évidence des sites sensibles à la RNase H dans les intermédiaires de réplication formés : c'est le modèle RITOLS (RNA Incorporated

Through-out Lagging Strand). L'initiation de la réplication est similaire au modèle asynchrone mais le brin lourd est d'abord transcrit en ARN avant d'être répliqué en ADN (Yang et al., 2002). Tous ces modèles utilisent les mêmes protéines pour l'initiation, l'élongation et la synthèse de l'ADNmt.

L'ADN polymérase POLG joue un rôle central et doit répliquer l'ADNmt rapidement et le plus fidèlement possible. Cependant des erreurs peuvent apparaître au cours de la réplication ou indépendamment suite à des agents mutagènes. Pour corriger ces erreurs et maintenir l'information génétique intacte, les cellules possèdent différents systèmes de réparation de l'ADNmt.

4.4. Mécanismes de réparation de l'ADNmt.

Les systèmes de réparation de l'ADN sont essentiels pour le maintien de l'intégrité de l'information génétique. Durant la vie d'un individu, des lésions ou dommages à l'ADN, correspondant à des modifications non physiologiques, peuvent apparaître. Ainsi des altérations de séquence et de structure de l'ADN peuvent être induites par des facteurs exogènes chimiques ou physiques tels que des stress environnementaux, des radiations ionisantes ou solaires (ultra-violets ou UV), des substances chimiques.... Mais des dommages de l'ADN peuvent aussi être causés par des facteurs endogènes tels que des intermédiaires produits au cours des différents processus métaboliques. L'ADN subit également des réactions d'hydrolyse, d'oxydation et de méthylation ((Barnes et al., 1993) ; (Lindahl et al., 1993)) et des erreurs lors des cycles de réplication. Ces processus délétères induisent des modifications (mutations, délétions, réarrangements ou modifications de la structure, cassures...) pouvant modifier l'expression des gènes. Pour corriger ces dommages, il existe chez les mammifères différents systèmes de réparation de l'ADN, spécifiques des lésions à corriger.

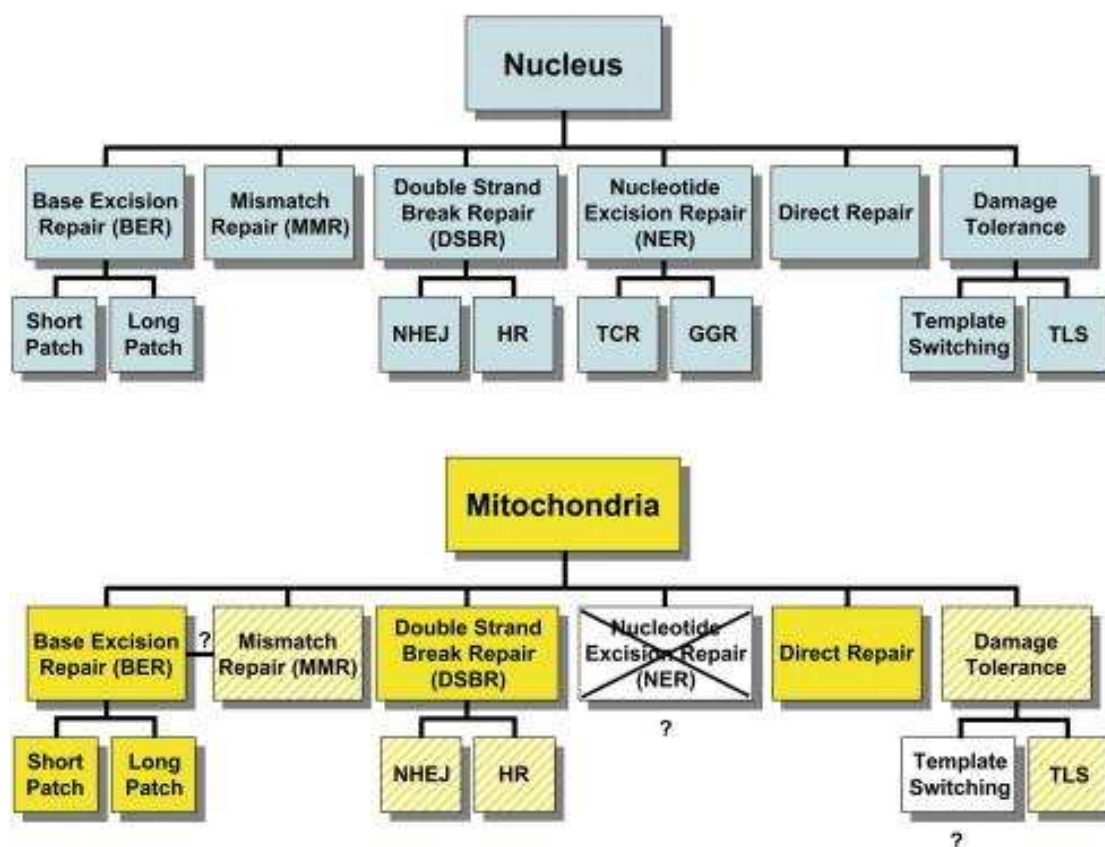


Figure 12 : Les systèmes de réparation de l'ADN.

Voies de réparation de l'ADN dans le noyau et dans la mitochondrie. Les voies qui sont bien établies sont représentées par des couleurs pleines et celles qui ont besoin de confirmation sont hachurées. Le système NER n'est pas retrouvé dans les mitochondries (d'après de Boesch et al., 2011).

Abréviations : NHEJ, non-homologous end joining ; HR, homologous recombination ; TCR, transcription-coupled repair ; GGR, global genome repair ; TLS, translesion synthesis.

Dans la mitochondrie, le maintien de l'ADNmt est primordial pour le bon fonctionnement de l'organite et de la CR. Cela nécessite une régulation fine des processus qui permettent sa réplication, sa transmission et le maintien de son intégrité et de sa stabilité. L'ADNmt subit 1000 fois plus de cycles de réplication que l'ADN nucléaire et son taux de mutation est 10 fois supérieur ((Wallace et al., 1987) ; (Kazak et al., 2012)). Comme l'ADN nucléaire, l'ADNmt subit des lésions suite aux UV, aux radiations ionisantes ainsi que des dommages entraînés par des produits chimiques et par les intermédiaires et produits du métabolisme énergétique. *In vivo*, l'ADN mitochondrial présent dans la matrice est associé à la MI par l'intermédiaire des nucléoïdes (structures nucléoprotéiques composées de 2 à 10 copies d'ADNmt et de protéines, incluant TFAM ou facteur A de transcription mitochondrial) ((Gilkerson et al., 2013) ; (Prachař et al., 2016) ; (Pohjoismäki et al., 2006)). A la différence de l'ADN nucléaire, l'ADNmt n'est pas protégé par des protéines

de type « histones » et est donc plus sujet aux agressions intrinsèques ou extrinsèques. Sa localisation à la MI proche de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui produit par la phosphorylation oxydative des électrons libres et des espèces réactives de l'oxygène (ROS), est un autre facteur mutagène. Une exposition prolongée à ces radicaux libres entraîne une augmentation du taux de mutations (Richter et al., 1988). Il existe des agents mitochondriaux qui permettent de neutraliser les ROS produits par la CR tels que les catalases ou le glutathion mais lorsque ces mécanismes antioxydants sont insuffisants, les dommages à l'ADNmt doivent être corrigés. Les principales conséquences des ROS sur l'ADN mitochondrial peuvent être l'apparition de bases oxydées, des sites abasiques ou des sites abasiques oxydés qui vont entraîner des cassures de la molécule. (Evans et al., 2004). Initialement, il avait été supposé qu'il n'y avait pas de mécanisme de réparation dans la mitochondrie. C'est au cours des 40 dernières années que plusieurs mécanismes de réparation ont été successivement identifiés au sein des mitochondries, qui sont médiés par des enzymes similaires à celles qui agissent dans le noyau (Figure 12). Ces enzymes sont toutes codées par le génome nucléaire. Parmi les systèmes identifiés dans les mitochondries de mammifères, on retrouve les systèmes BER (Base Excision Repair), SSBR (Single-Strand Break Repair) et DSB (Double-Strand break Repair) appartenant au « DNA break repair » et le MMR (MisMatch Repair). Le système NER n'a pas été identifié dans les mitochondries à ce jour.

4.4.1 BER (Base Excision Repair).

Les bases alkylées, désaminées ou oxydées sont réparées par le mécanisme de BER qui est le mécanisme le plus efficace de la mitochondrie (Kazak et al., 2012).

Les étapes du BER sont les suivantes :

- Reconnaissance et excision de la base endommagée par des ADN glycosylases spécifiques du type de dommage (clivage de la liaison N-glycosidique) puis élimination du nucléotide par des lyases et des AP endonucléases (site AP pour APurique ou APyrimidique).
- Insertion *de novo* d'un seul nucléotide (« short-patch » BER, SP-BER) ou de plusieurs nucléotides (2-6 nucléotides, « long-patch » BER, LP-BER) par une ADN polymérase. Le LP-BER fait également intervenir des exonucléases et des hélicases.
- Ligation des nucléotides nouvellement synthétisés au reste de la molécule d'ADN.

4.4.1.1 Reconnaissance et clivage de la base endommagée.

Il existe 4 ADN glycosylases bifonctionnelles : OGG1 (8-oxoguanine-DNA glycosylase 1), NTH1, NEIL1 et NEIL2 (respectivement l'homologue de l'endonucléase III, Fpg et Nei d'*E. Coli*). OGG1 et NTH1 reconnaissent et clivent les bases oxydées. Les lésions de type 8-oxoG (8-hydroxyguanine), reconnues par OGG1 sont les lésions oxydatives les plus fréquemment retrouvées au niveau de l'ADNmt (Valavanidis et al., 2009). NEIL1 et NEIL2 reconnaissent préférentiellement les dommages présents dans des structures d'ADN simple brin. Une PNKP (polynucléotide kinase/phosphatase) génère l'extrémité 3'-OH.

Les ADN glycosylases monofonctionnelles reconnaissent la base endommagée. Parmi ces enzymes on trouve : UNG1 (Uracil-DNA glycosylase 1) et MYH (MutY homologue d'*Escherichia Coli*). Ces enzymes ne clivant que la liaison N-glycosidique de la base, l'endonucléase APE1 intervient ensuite pour rompre la liaison phosphodiester entre la base endommagée et le reste de l'ADN double brin, libérant une extrémité 3'hydroxyl et 5'désoxyribosephosphate (5'dRP). APE1, possède également une activité 3'-phosphodiesterase, elle intervient donc ensuite pour préparer les extrémités de l'ADN avant la synthèse par l'ADN polymérase.

4.4.1.2 Synthèse *de novo*.

L'insertion *de novo* des nucléotides est réalisée par PolG. Lors du LP-BER, PolG synthétise un nouveau brin par déplacement de brin ce qui génère une extrémité 5' (« 5' flap ») qui est reconnue et clivée par EXOG, FEN-1 et DNA2. EXOG est une 5'exo/endonucléase exclusivement mitochondriale, cruciale dans les mécanismes de réparation de l'ADNmt. Elle est également impliquée dans la réparation de l'ADNmt par SSB (Tann et al., 2011). La nucléase/hélicase DNA2 et l'endonucléase FEN1 favorisent l'action de l'ADN polymérase au cours de la réparation de l'ADNmt. Elles interviennent également au moment de la réplication de l'ADN nucléaire dans la maturation des fragments d'Okazaki. Des mutations dans *DNA2* ont récemment été décrites chez des patients présentant une ophtalmoplégie externe progressive (PEO) et/ou une myopathie avec présence de délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle (Ronchi et al., 2013a).

4.4.1.3. Ligation.

La dernière étape, qui consiste à refermer le brin d'ADN, est réalisée par l'ADN ligase III (LIG3), seule ADN ligase connue dans la mitochondrie. Cette protéine est exprimée dans les 2 compartiments cellulaires : nucléaire et mitochondrial. De ce fait, il est difficile d'évaluer le rôle de LIG3 dans chacun des 2 compartiments. Cependant, l'équipe de Jasin a utilisé un modèle cellulaire « Knock-out » LIG3 dans lequel l'expression de LIG3 est réintroduite, ciblée spécifiquement au compartiment mitochondrial (Simsek et al., 2011). Il montre que la forme mitochondriale de LIG3 est nécessaire à la survie cellulaire mais pas la forme nucléaire.

D'autres protéines sont également impliquées dans le BER mitochondrial :

- La protéine suppresseur de tumeur p53 intervient à différentes étapes dans le maintien de l'ADNmt (Park et al., 2016). Elle régule la transcription des ARNm codant pour RRM2B et TFAM mais également des protéines régulant la réparation de l'ADNmt (FEN-1 et OGG1). p53 peut également transloquer dans la mitochondrie en réponse à un stress oxydatif et avoir un rôle dans le maintien de l'ADNmt. p53 interagit avec l'ADNmt, POLG et TFAM et pourrait également hydrolyser des bases oxydées telles que les 8-oxoG grâce à son activité 3'-5' exonucléase.

- **TFAM** : le facteur de transcription TFAM se fixe préférentiellement à l'ADN endommagé par des lésions oxydatives. *In vitro*, sa fixation inhibe l'action de OGG1, UNG1 et APE1. TFAM pourrait ainsi réduire les taux de réparation de l'ADNmt (Kazak et al., 2012).

- **PIF1** : l'hélicase Pif1 a été identifiée, chez *S. cerevisiae*, par criblage génétique qui visait à identifier des gènes affectant la fréquence de recombinaison de l'ADNmt entre des souches sauvages et des souches dites « petites » (souches qui présentent des délétions de l'ADNmt) (Foury and Kolodynski, 1983). Il existe 2 isoformes de Pif1, l'une est localisée dans le noyau et l'autre dans la mitochondrie. Chez l'homme et la levure, PIF1 nucléaire se fixe à l'ADN au niveau des structures de type G-quadruplex et joue un rôle majeur dans le maintien des télomères (Geronimo and Zakian, 2016). PIF1 est un inhibiteur de la télomérase. Des données montrent que les 2 hélicases PIF1 et DNA2 coopèrent pour réguler la réplication et la réparation de l'ADN nucléaire. Pif1 générerait des structures simple brins, « 5' flap », qui seraient dégradées par DNA2 (Budd et al., 2006).

L'isoforme mitochondriale provient du même transcrit que la forme nucléaire mais les séquences de démarrage de traduction sont différentes avec utilisation d'un

ATI (Alternative Translation Initiation). La séquence d'adressage mitochondrial (MTS) est localisée après le 2^{ème} « start » de traduction, exposant ainsi le signal MTS à l'extrémité N-terminale de la protéine.

Le groupe de Léa Harrington a réalisé des souris knock-out dans lesquelles le gène *mPif1* est inactivé (Snow et al., 2007). Bien que mPif1 interagisse avec la télomérase, les souris *mPif1*^{-/-} ne présentent ni de modification de la taille de leurs télomères, ni d'anomalies chromosomiques. Ce résultat suggère que la fonction télomérique de mPif1 pourrait être redondante avec celle d'une autre hélicase. Concernant les conséquences de l'inactivation de mPif1 sur sa possible fonction mitochondriale, rien n'avait été étudié lorsque nous avons récupéré les souris. A partir de ces souris, nous avons pu démontrer que mPif1 joue un rôle dans le maintien de l'ADNmt. En effet, nous avons confirmé la localisation mitochondriale de Pif1 et montré son interaction avec l'ADNmt. Nous avons également mis en évidence la présence de quelques délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle des souris *mPif1*^{-/-} et avons montré que ces animaux, à l'âge adulte, développent une myopathie mitochondriale avec diminution de leur activité physique, et présentent un déficit de la chaîne respiratoire dans le muscle et le cœur. Les analyses histologiques réalisées sur le muscle et le cœur de ces animaux montrent la présence de fibres anormales qui présentent des accumulations de mitochondries et des fibres désorganisées. Ces anomalies histologiques ont été confirmées en microscopie électronique qui a révélé la présence de mitochondries anormales, avec perte des crêtes mitochondriales.

D'autre part, nous avons étudié le rôle de Pif1 dans la réparation de l'ADNmt. Après stress oxydatif, sur des MEFs ("Mouse Embryonic Fibroblasts") *mPif1*^{-/-}, nous avons montré que l'absence d'expression de mPif1 entraîne un défaut de réparation de l'ADNmt. Par contre, ce défaut est corrigé après complémentation des MEFs avec l'isoforme mitochondriale de mPif1 (Bannwarth et al., 2016). Comme DNA2, PIF1 serait impliquée dans les mécanismes de réplication et/ou réparation de l'ADNmt. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle des différentes hélicases mitochondriales (TWINKLE, DNA2, PIF1) dans les mécanismes de réplication et/ou réparation de l'ADNmt. Nos résultats sont donc en faveur d'un rôle de PIF1 dans la réparation de l'ADNmt par la voie BER et font de ces souris *mPif1*^{-/-} un nouveau modèle murin de myopathie mitochondriale débutant à l'âge adulte. Ils montrent également l'intérêt de séquencer le gène *Pif1* chez nos patients.

4.4.2. Mismatch Repair (MMR).

Le mécanisme de « Mismatch Repair » (MMR) permet de corriger les mésappariements ou les petites délétions / insertions qui se produisent au cours de la réplication. Les protéines responsables du MMR, reconnaissent le mésappariement sur le brin nouvellement synthétisé et le remplacent par un mécanisme d'excision / resynthèse suivi d'une étape de ligation.

Dans le noyau, chez les mammifères, deux hétérodimères MutS α (MSH2 et MSH6) et MutS β (MSH2 et MSH3) reconnaissent respectivement les mésappariements de bases, les petites insertion-délétions de 1 à 2 nucléotides ou les larges insertions-délétions de plus de 2 nucléotides. Dans la mitochondrie, les protéines impliquées semblent être différentes (Boesch et al., 2011). YB-1 (Y-box binding protein 1) jouerait le rôle des protéines MutS. Il reconnaît le mésappariement, se fixe sur la lésion pour initier la réparation en recrutant les protéines du complexe MMR. Au niveau nucléaire, YB-1 est un facteur de transcription également impliqué dans le mécanisme de BER (de Souza-Pinto et al., 2009). Le complexe MMR mitochondrial comprendrait également les protéines EXOG, SSBP1, POLG, FEN1, DNA2 dont les activités ont été décrites précédemment.

4.4.3. DNA break repair (SSB ou DSB).

4.4.3.1 SSB (Single-Strand Break).

La réparation des cassures simple brin se fait en 4 étapes dont certaines sont communes avec celles décrites précédemment dans le BER :

- Détection de la cassure,
- Préparation des extrémités de l'ADN,
- Insertion de nouveaux nucléotides,
- Ligation.

Les 2 dernières étapes font intervenir les mêmes protéines que celles du BER, en particulier : APE1, PNKP, PolG. La protéine PARP-1 (poly (ADP ribose) polymérase) présente dans le noyau a également été décrite dans la mitochondrie. Elle reconnaît les cassures de type SSB et DSB. Une diminution d'expression de la forme mitochondriale de PARP-1 induit une accumulation des dommages de l'ADNmt. Elle formerait un complexe avec LIG3 et l'ADNmt pour maintenir l'intégrité de l'ADNmt.

Deux autres protéines seraient également impliquées dans ces mécanismes de réparation : l'Aprataxin (APTX) et TDP1. Des mutations dans les gènes *APTX* et *TDP1* sont

respectivement responsables d'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1) ou d'ataxie spinocérébrale avec neuropathie axonale de type 1 (SCAN1). APTX et TDP1 sont exprimées sous 2 isoformes différentes (nucléaire ou mitochondriale) par épissage alternatif ou utilisation d'un codon start alternatif (ATI) (Meagher and Lightowlers, 2014). L'absence d'expression d'APTX dans la mitochondrie induit une diminution du nombre de copies de l'ADNmt et une augmentation des dommages à l'ADNmt ((Sykora et al., 2011) ; (Akbari et al., 2015)).

4.4.3.2 DSB (Double-Strand Break).

Les cassures doubles brins de l'ADN sont des dommages extrêmement graves pour le maintien de l'intégrité de l'ADN. De ce fait, dans le noyau, 3 mécanismes de réparation permettent de les réparer : le NHEJ (Non-Homologous End-Joining), le MMEJ (Microhomology-Mediated End-Joining) et la recombinaison homologue. Une absence de réparation aboutit à des réarrangements chromosomiques ou à la mort cellulaire.

Dans la mitochondrie, la présence de l'ADNmt en multi copies minimise l'importance de ces dommages. D'ailleurs la présence de délétions de l'ADNmt est associée à de nombreuses pathologies mitochondriales. Il semble qu'au-delà d'un certain seuil de dommage de type DSB, la mitophagie permette d'éliminer les molécules endommagées plutôt que de les réparer (Van Houten et al., 2016).

Une étude récente montre que dans la mitochondrie, chez l'homme, le mécanisme qui prédomine pour la réparation de ce type de dommage est le MMEJ (Tadi et al., 2016). Il ferait intervenir les protéines Ligase III, PARP-1, CtIP, MRE11 et RAD50. Rad51, protéine responsable du DSB au niveau nucléaire, est également recrutée dans la mitochondrie après un stress oxydatif pour augmenter la réplication de l'ADNmt (Sage and Knight, 2013).

Dans les mitochondries, à l'instar du noyau, toutes les lésions ne sont pas réparées. Il faut donc que les mécanismes qui régulent le maintien d'un ADNmt non endommagé soient efficaces pour éviter l'accumulation de délétions et/ou mutations qui entraînerait un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. De ce fait, lorsque les mécanismes de réparation de l'ADNmt n'ont pas fonctionné, l'élimination de l'ADN endommagé peut se faire par mitophagie ou mort cellulaire par apoptose.

5. La chaîne respiratoire.

Les cellules obtiennent l'énergie nécessaire à leur bon fonctionnement en hydrolysant l'adénosine triphosphate (ATP), un métabolite hautement énergétique, en adénosine diphosphate (ADP). Les mitochondries jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire. Elles sont considérées comme de véritables « usines ou centrales énergétiques ». En effet, elles produisent la majorité de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules eucaryotes en étant le siège de nombreuses réactions du métabolisme énergétique (catabolismes des sucres et acides gras qui fourniront les substrats et cofacteurs nécessaires à la chaîne respiratoire). Elles participent également à la biosynthèse des nucléotides, des acides aminés, des phospholipides, des hèmes et noyaux Fer/Soufre.

En condition physiologique aérobie, les mitochondries produisent la majorité de l'ATP nécessaire aux cellules grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS). La CR est composée de 5 complexes enzymatiques de grande taille. Les 4 premiers (CI, CII, CIII, CIV) permettent le transport d'électrons et sont couplés à un dernier complexe enzymatique (ATP synthétase ou CV), qui catalyse la production d'ATP (Figure 13). Des électrons capturés à partir de molécules donneuses vont circuler au travers des 4 premiers complexes grâce à des réactions d'oxydo-réduction en générant une force « électro-motrice ». Cette énergie va activer la libération de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV, créant ainsi une force « proto-motrice » qui va fournir l'énergie nécessaire à l'ATP synthétase pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) (Figure 13).

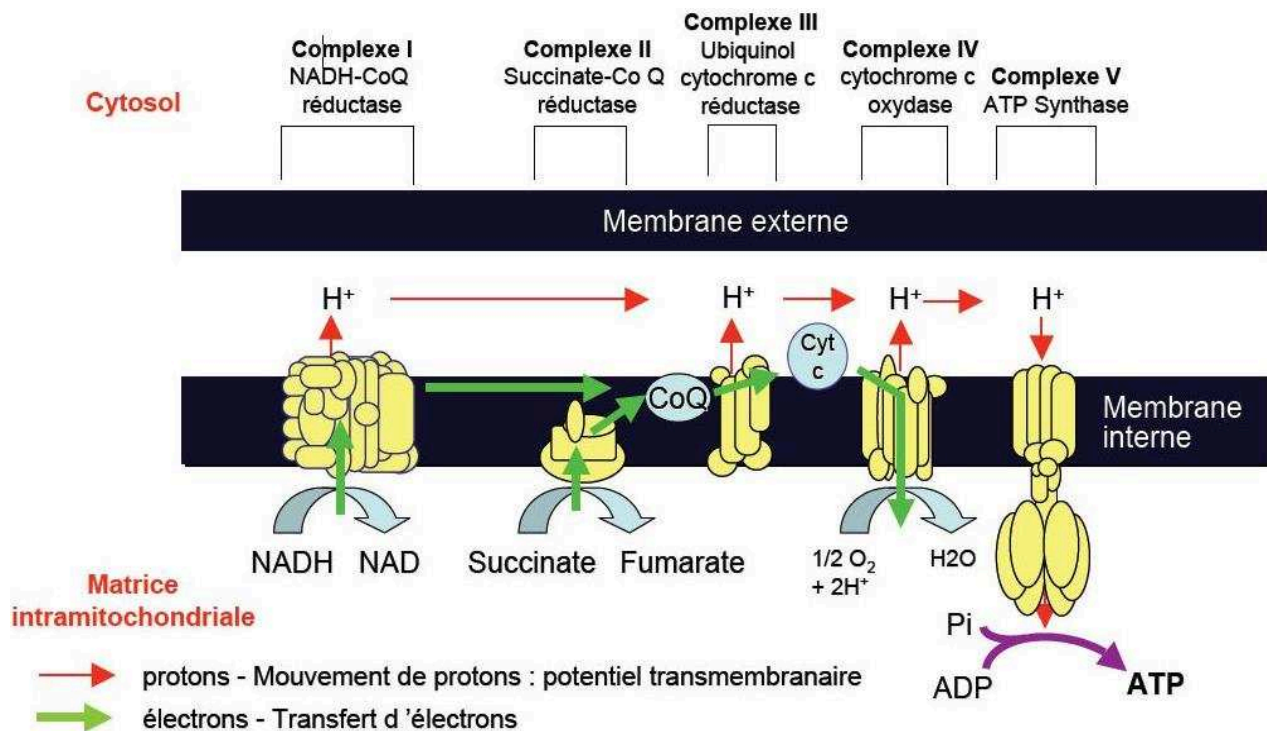


Figure 13 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire.

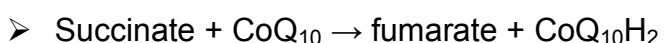
Les cinq complexes multi-protéiques situés dans la membrane interne sont représentés en jaune. Le flux de protons généré par la phosphorylation oxydative est représenté en rouge. Le transfert des électrons entre les complexes I, II, III et IV est représenté en vert.

Les complexes de la chaîne respiratoire:

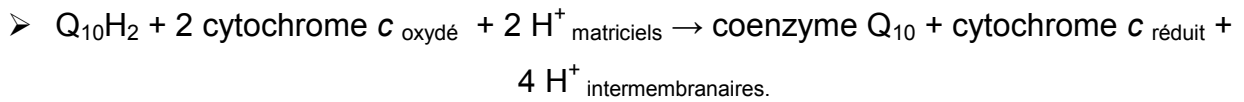
- **le complexe I (CI) = NADH déshydrogénase** (ou **NADH coenzyme Q réductase**), première enzyme de la chaîne respiratoire, est un complexe protéique de très grande taille (environ 1000 kDa) composé de 45 sous-unités dont 7 codées par l'ADNmt (ND1 à ND6 et ND4L). Il oxyde le NADH en NAD⁺ tout en réduisant le coenzyme Q₁₀ (molécule liposoluble mobile présente dans la MI appelée également CoQ₁₀ ou ubiquinone) en CoQ₁₀H₂ (ubiquinol). En parallèle, il permet le passage de protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire



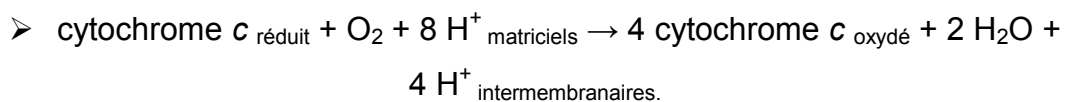
- **le complexe II (CII) = succinate déshydrogénase** (ou **succinate-Co-enzymeQ réductase**) dont toutes les sous-unités sont codées par le noyau est le deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne. Il est constitué de quatre sous-unités dont une impliquée dans le cycle de Krebs et de plusieurs cofacteurs : FAD, centres fer-soufre, et un groupe hémunique. Il oxyde le succinate en fumarate tout en réduisant le CoQ₁₀ en coenzyme CoQ₁₀H₂. Cette réaction libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH, ce qui fait que le complexe II ne contribue pas à la génération du gradient de protons.



- **le complexe III (CIII) = complexe b-c1 (ou cytochrome C réductase)** est composé de 10 sous-unités environ. Il transfère des électrons du $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ aux molécules de cytochrome *c* (cyt *c*) localisées dans l'espace intermembranaire entraînant ainsi la réoxydation du $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ en CoQ_{10} et la réduction du cyt *c*. Il transfère également des protons à travers la membrane.



- **le complexe IV (CIV) = cytochrome oxydase** est un complexe protéique de 200 kDa composé de 13 sous-unités dont COXI, II et III qui forment le cœur du complexe. Grâce à son site de liaison avec l'oxygène, il transfère des électrons du cyt *c* à l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau tout en oxydant le cyt *c*. Il transfère également des protons à travers la membrane.



- **le complexe V (CV) = l'ATP Synthétase** est composé de 2 sous-unités principales : F₀ une protéine polaire intégrale de la MI et F₁ une sous-unité globulaire associée à F₀ du côté de la matrice mitochondriale. Le complexe F₀ F₁ ATP synthétase utilise le gradient électrique pour synthétiser des molécules d'ATP via la phosphorylation oxydative. La composante F₀ joue le rôle d'un canal ionique permettant le retour des protons dans la matrice mitochondriale. Pendant ce retour des protons, l'énergie libérée par les électrons lors de la régénération de NAD⁺ et FAD est utilisé pour la synthèse d'ATP. La composante F₁ joue le rôle d'un catalyseur.

6. Maladies génétiques rares et maladies mitochondriales.

Une maladie est dite « rare » lorsqu'elle touche un individu sur 2000 au plus. Aujourd'hui 8000 maladies rares sont décrites, 80% de ces maladies sont d'origine génétique mais le gène impliqué n'est connu que dans 1 cas sur 2. Ces maladies sont difficiles à diagnostiquer et le développement de thérapies est difficile avec pas ou peu de traitements actuellement disponibles (moins de 200 traitements spécifiques). Ces pathologies, ainsi que les symptômes qui y sont associés sont référencés sur le site : www.orphanet.fr. Au sein des maladies rares, on distingue les maladies mitochondriales ou mitochondriopathies, également appelées cytopathies mitochondriales.

6.1. Maladies mitochondriales.

Les maladies mitochondriales (MM) englobent un ensemble de pathologies disparates en rapport avec des dysfonctionnements de la mitochondrie qui se traduisent par un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et une production insuffisante d'ATP. Ce sont des pathologies génétiques qui touchent 2,5 personnes sur 10000, ce qui les classe au premier rang des maladies métaboliques. Les mitochondries étant présentes dans toutes les cellules de l'organisme, une atteinte de la chaîne respiratoire peut s'exprimer de manière multi-systémique. Ainsi, un déficit de la chaîne respiratoire peut toucher tous les tissus et les organes et entraîner un spectre très variable de symptômes ; les organes les plus touchés étant ceux qui ont une forte demande énergétique comme le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur ou le foie. Les symptômes engendrés peuvent s'aggraver dans les situations d'hypercatabolisme et de besoins énergétiques accrus. L'expression clinique de ces pathologies est très hétérogène et très variable en raison du caractère ubiquitaire de la chaîne respiratoire. On observe une multitude de symptômes, les plus fréquents étant : une encéphalopathie, une cardiomyopathie, une myopathie, une atrophie optique, un retard mental, une épilepsie, un diabète, une surdité, une cécité, une insuffisance hépatique... Les mitochondriopathies peuvent se manifester à tout âge, allant de formes létales en période néonatale jusqu'à des formes modérées chez l'adulte. De manière générale, plus elles apparaissent tôt plus leur phénotype est sévère et ce phénotype s'aggrave généralement avec le temps avec une évolution des symptômes déjà présents et/ou l'apparition de nouveaux symptômes. Une maladie mitochondriale est évoquée chez des patients présentant une « association illégitime » de symptômes, impliquant des organes sans relation apparente, avec un caractère rapidement évolutif (Figure 14).

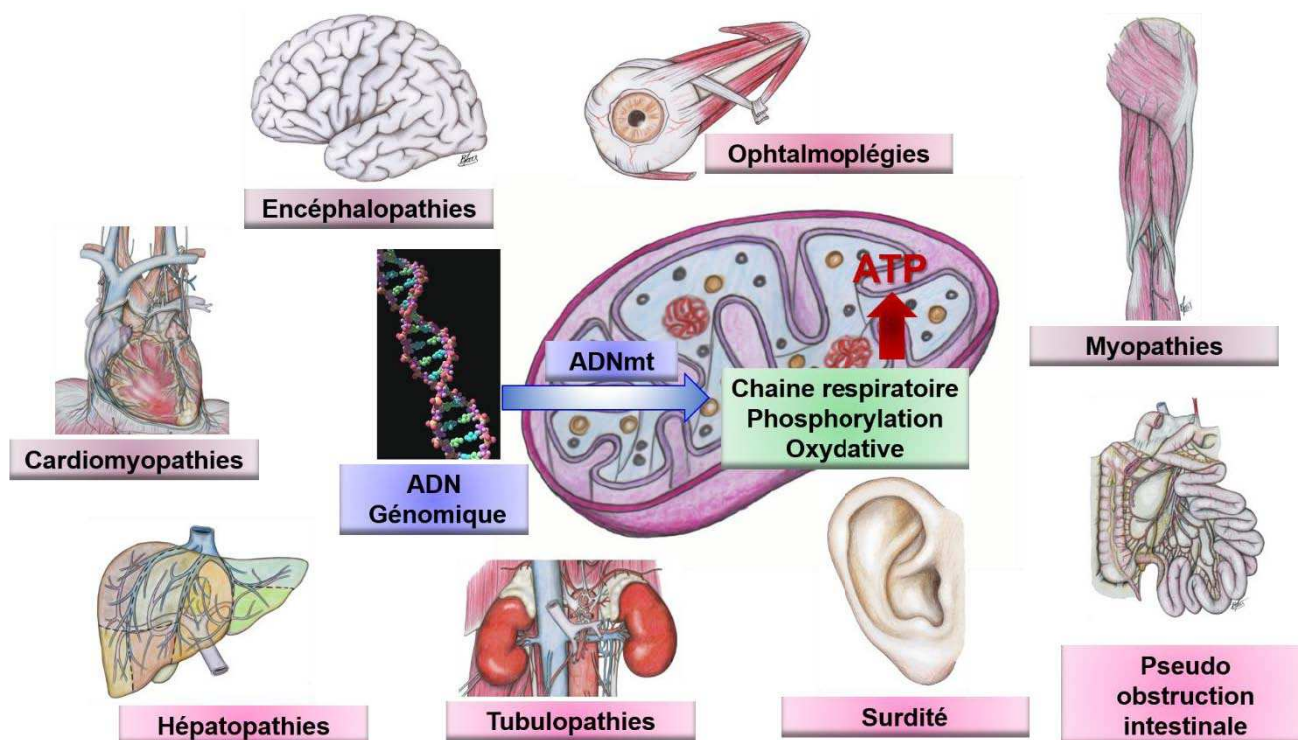


Figure 14 : Représentation schématique des principaux organes atteints et signes cliniques observés au cours des pathologies mitochondriales.

Les organes les plus touchés par les maladies mitochondriales sont représentés, ainsi que les atteintes cliniques les plus fréquentes qui y sont associées en cas de déficits de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale (double origine génétique des complexes de la chaîne respiratoire).

Au niveau des cellules, lorsque la production d'ATP est insuffisante ou insuffisamment compensée, on observe une modification profonde des équilibres d'oxydo-réduction du cytoplasme et de la mitochondrie avec une accumulation de composés réduits de type NADH ou FADH, une augmentation de la formation de radicaux libres et une accumulation de substrats en amont du blocage métabolique (augmentation des lactates, par exemple). En cas de suspicion de MM, le bilan métabolique peut être évocateur mais la mise en évidence d'un déficit de la chaîne respiratoire doit se faire à partir de prélèvements tissulaires, si possible dans le tissu qui exprime le déficit (biopsies de muscle, de foie, de rein, ou d'autres tissus en fonction des symptômes). Le dosage de l'activité des cinq complexes de la chaîne respiratoire est réalisé par spectrophotométrie. L'activité enzymatique de chaque complexe est dosée de façon indépendante ou couplée grâce à l'ajout d'inhibiteurs et de substrats spécifiques. La consommation d'oxygène est mesurée par polarographie dans des fractions cellulaires enrichies de mitochondries isolées à partir de tissus frais ou le plus souvent de fibroblastes en culture.

L'analyse histologique réalisée sur le muscle des patients peut mettre en évidence des signes évocateurs de maladie mitochondriale (Figure 15). Les anomalies histologiques les plus évocatrices et les plus fréquemment observées sont :

- une accumulation de lipides dans les fibres musculaires (myopathie lipidique),
- la présence d'une prolifération mitochondriale objectivée par coloration au trichrome de Gomori, qui peut également mettre en évidence des fibres rouges déchiquetées dites RRF pour « ragged-red fibers »,
- la présence de fibres musculaires déficientes pour l'activité de la cytochrome c oxydase (fibres COX négatives), également révélée par un double marquage pour la SDH (complexe II).

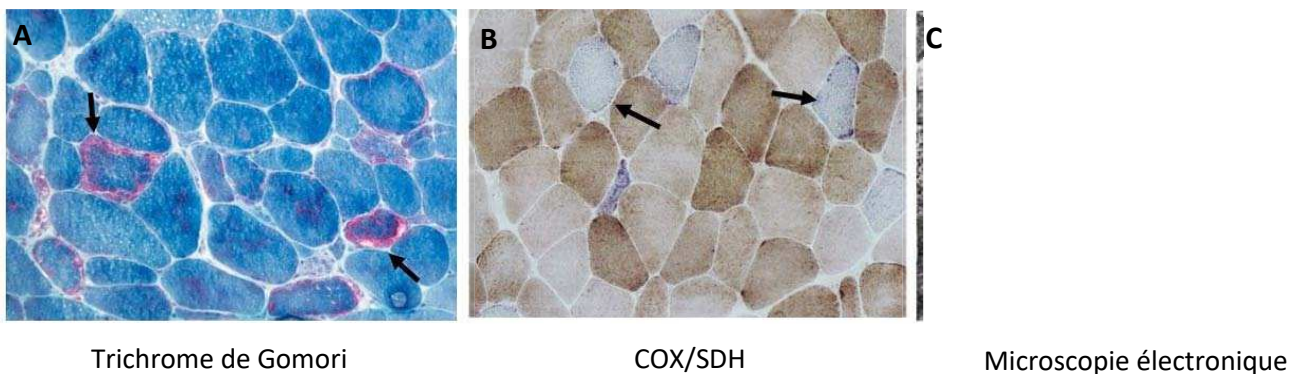


Figure 15 : Images des principales anomalies histologiques évocatrices de maladie mitochondriale observées à partir de prélèvement musculaire.

A. Coloration au trichrome de Gomori montrant la présence de fibres Ragged-Red (flèches).
 B. Double coloration COX (coloration marron) / SDH (coloration bleue). Les fibres de type II plus riches en mitochondries apparaissent (coloration marron foncé). Les fibres COX négatives apparaissent en bleues (flèches).
 C. Image de microscopie électronique montrant des inclusions paracristallines dans les mitochondries.
 (D'après Rouzier et al, 2012).

La présence de RRF est caractéristique des pathologies mitochondriales mais peut s'observer dans d'autres pathologies, notamment inflammatoires et au cours du vieillissement. Inversement, les RRF sont rares chez l'enfant. Les fibres COX négatives sont absentes dans certaines pathologies mitochondriales, par exemple en cas de syndrome de Leigh par mutation m.8993T>G qui n'entraîne pas de déficit en complexe IV. Une analyse ultrastructurale peut également apporter des informations importantes en objectivant des inclusions paracristallines, des mitochondries de forme anormale ou des anomalies des crêtes mitochondriales.

La grande variabilité clinique liée au caractère évolutif de ces maladies rend leur diagnostic difficile. Un déficit de la chaîne respiratoire peut être primitif ou secondaire à d'autres pathologies notamment métaboliques. Le diagnostic de certitude de ces maladies repose donc sur l'identification du gène et des mutations causales. Il est compliqué par la double origine génétique des protéines de la chaîne respiratoire, le grand nombre de gènes

nucléaires impliqués (plus de 200 décrits à ce jour) et l'absence de corrélation phénotype/génotype.

6.2. Génétique des maladies mitochondriales.

Le protéome mitochondrial est composé de protéines codées par l'ADNmt (13 sous-unités de la chaîne respiratoire) et de protéines codées par le génome nucléaire (Figure 16). Le nombre de protéines codées par le génome nucléaire à destination des mitochondries est estimé à 1500 et représente plus de 99% du protéome mitochondrial total (Calvo et al., 2006). Ces protéines sont impliquées dans les différentes voies, fonctions et structures mitochondriales (Lopez et al., 2000). La double origine génétique de ces protéines fait qu'une maladie mitochondriale peut résulter d'anomalies génétiques qui touchent soit directement l'ADNmt, soit dans environ 80% des cas des gènes nucléaires. Tous les modes d'hérédité ont été observés dans ces pathologies en fonction du gène impliqué : autosomique dominant, autosomique récessif et lié à l'X pour les gènes nucléaires, hérédité maternelle pour les gènes mitochondriaux. Les mutations responsables peuvent également survenir *de novo*. A ce jour, plus de 200 gènes nucléaires ont été clairement impliqués dans les pathologies mitochondriales mais ce nombre est largement sous-estimé en raison des difficultés de diagnostic évoquées ci-dessus. Il est en constante augmentation grâce aux progrès technologiques basés sur le séquençage haut débit (NGS pour Next Generation Sequencing).

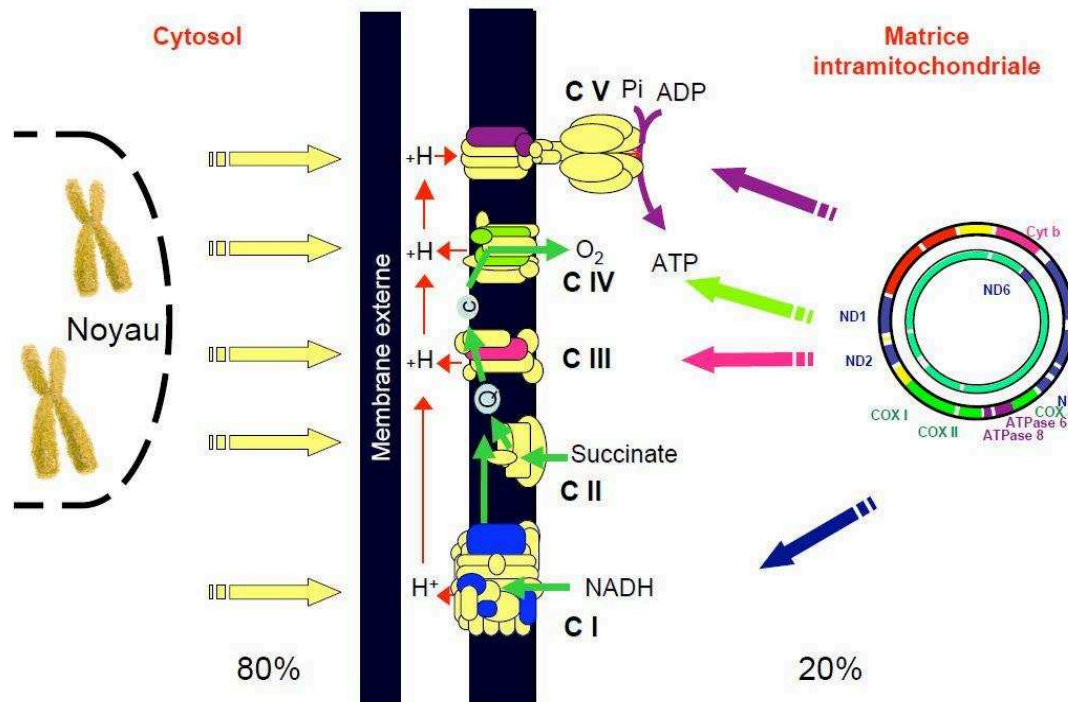


Figure 16 : Représentation schématique de l'origine génétique des protéines de la chaîne respiratoire.

Les 5 complexes de la chaîne respiratoire sont représentés (CI : complexe I, CII: complexe II, CIII: complexe III, CIV: complexe IV, CV: complexe V). Les sous-unités protéiques codées par le génome nucléaire sont représentées en jaune ; celles codées par l'ADNmt sont représentées en bleu (CI), rose (CIII), vert (CIV) et violet (CV).

6.3. Anomalies de l'ADNmt et pathologies mitochondriales.

Les anomalies de l'ADNmt sont à l'origine d'environ 20% des maladies mitochondriales. Bien qu'il code pour un petit nombre de gènes, les mutations de cet ADN sont fréquentes (Kogelnik et al., 1996). Ces anomalies de l'ADNmt sont dans la plupart des cas hétéroplasmiques et sont transmises selon un mode maternel mais peuvent être *de novo*. ((Ruiz-Pesini et al., 2007) ; (Mao and Holt, 2009)). Les principales altérations de l'ADNmt responsables de maladies mitochondriales correspondent à :

- des délétions uniques,
- des mutations ponctuelles,
- des anomalies qualitatives (délétions multiples de l'ADNmt) ou quantitatives (dues à une diminution du nombre de copie de l'ADNmt, appelées déplétions) liées à des mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans le maintien de l'ADNmt. Elles seront développées dans le paragraphe consacré aux gènes nucléaires.

6.3.1. Délétions uniques de l'ADNmt.

Les délétions uniques de l'ADNmt sont de grands réarrangements qui entraînent la perte d'une partie de l'ADNmt et de l'information génétique qu'il contient. La taille du fragment délété varie de 1 à 10 kb et se situe le plus souvent entre les deux origines de réplication de l'ADNmt (OH et OL), impliquant des gènes codant des sous-unités de la chaîne respiratoire et des ARNt mitochondriaux ((Kogelnik et al., 1996) ; (Krishnan et al., 2008)). Les bornes de la délétion correspondent dans 85 % des cas à des séquences répétées ((Bua et al., 2006) ; (Samuels et al., 2004) ; (Krishnan et al., 2008)). Contrairement aux délétions multiples, les délétions uniques sont généralement sporadiques et apparaissent de façon accidentelle dans la lignée germinale suite à des erreurs de réparation ou de réplication du génome mitochondrial (Krishnan et al., 2008). Elles sont toujours hétéroplasmiques. Les mères atteintes transmettent rarement ce type d'anomalie (1 cas sur 24) et la récurrence dans les fratries est faible. Les délétions uniques entraînent un spectre de symptômes cliniques qui regroupe essentiellement trois pathologies : le syndrome de Kearns-Sayre, le syndrome de Pearson et l'ophtalmoplégie externe progressive (PEO) avec parfois des atteintes chevauchantes (Schon et al., 2012). L'expression clinique des pathologies due à ces réarrangements dépend notamment de la répartition des molécules d'ADNmt délétées au sein des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) au cours du développement précoce. Le syndrome de Kearns-Sayre est une pathologie multi-systémique, d'apparition précoce chez l'enfant et l'adolescent ((Kearns and Sayre, 1958) ; (Grady et al., 2014)). Il se définit par une rétinite pigmentaire, une CPEO, des troubles de la conduction cardiaque plus ou moins associés à un retard staturopondéral, une ataxie cérébelleuse, une surdité neurosensorielle, un diabète, un déficit cognitif plus ou moins sévère... Sur le plan moléculaire, plus de 150 délétions différentes ont été rapportées dans ce syndrome dont la délétion dite « commune » qui est particulièrement fréquente (m.8470_13446del4977) (Phadke et al., 2012). Le syndrome de Pearson, décrit pour la première fois en 1979, est caractérisé par une anémie sidéroblastique réfractaire, une vacuolisation des précurseurs de la moelle et une insuffisance pancréatique externe (Pearson et al., 1979). Les manifestations hématologiques débutent généralement dans la petite enfance et d'autres atteintes d'organes sont également possibles, notamment rénale avec une tubulopathie et une amino-acidurie. Les enfants qui ne décèdent pas dans les premières années de vie évoluent généralement vers un syndrome de Kearns-Sayre. Enfin, certains patients porteurs d'une délétion de l'ADNmt présentent une myopathie oculaire de type CPEO, isolée ou pouvant être associée à une atteinte musculaire périphérique ((Moraes et al.,

1989) ; (Holt et al., 1988a) ; (Holt et al., 1988b) ; (Larsson et al., 1992) ; (Krishnan et al., 2008)). Dans les CPEO et le syndrome de Kearns-Sayre, la délétion est retrouvée généralement uniquement dans le muscle alors qu'elle est présente dans tous les tissus chez les enfants atteints d'un syndrome de Pearson. Des études récentes montrent que la taille de la délétion et le pourcentage d'hétéroplasmie influencent la sévérité et la progression des symptômes dans ces pathologies (Grady et al., 2014).

6.3.2. Mutations ponctuelles de l'ADNmt.

On peut diviser cette catégorie en deux groupes : les pathologies liées à des mutations dans des gènes de structure (codant pour les ARNt et plus rarement pour les ARNr mitochondriaux) et celles liées à des mutations dans les gènes codant pour les 13 sous-unités de la chaîne respiratoire. Aujourd'hui des mutations pathogènes sont identifiées dans plus de 30 gènes sur les 37 gènes mitochondriaux. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt sont parfois associées à des syndromes caractéristiques dont les atteintes dépendent du taux d'hétéroplasmie dans un tissu donné. Le phénotype clinique s'exprime généralement à partir de 80% de molécules mutantes. Certaines de ces mutations sont récurrentes et correspondent à des tableaux cliniques spécifiques. Elles constituent de véritables « hot spots » mutationnels et sont souvent recherchées en première intention quand on suspecte une pathologie mitochondriale. Par exemple, les syndromes MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) et MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) sont respectivement dus à des mutations qui touchent les ARNt^{leu} (m.3243A>G) et ARNt^{lys} (m.8344A>G) mitochondriaux (Figure 17). L'atrophie optique de Leber est due à des mutations homoplasmiques dans des gènes codant pour des sous-unités du complexe I de la CR (m.11778G>A, m.3460G>A ou m.14484T>C).

6.4. Mutations dans des gènes nucléaires et pathologies mitochondriales

Dans 80% des cas, les pathologies mitochondriales sont causées par des mutations de gènes nucléaires codant pour des protéines à destination des mitochondries. A ce jour, des mutations ont été identifiées dans plus de 200 gènes. On estime à plus de 1000 le nombre de gènes responsables et chez plus de 60% des patients, le gène impliqué est inconnu.

On distingue principalement :

- les gènes de structure et d'assemblage des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale,
- les gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales,
- les gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt.

6.4.1. Mutations dans des gènes de structure et d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire.

Tous les gènes nucléaires codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire ont été identifiés. Les sous-unités des complexes I, III, IV et V sont codées par des gènes nucléaires et mitochondriaux. Seul le complexe II est entièrement constitué de sous-unités d'origine nucléaire (Mai et al., 2016). La plupart des mutations identifiées sont rencontrées dans des gènes codant pour le complexe I tandis que très peu de mutations ont été trouvées dans des gènes codant pour les autres complexes (Tranchant and Anheim, 2016). Les facteurs d'assemblage des cinq complexes peuvent également être impliqués dans les cytopathies mitochondriales. Leurs défauts ont été décrits en premier lieu pour les complexes I, III, IV puis V et plus récemment pour le complexe II avec le gène *SDHAF1* (Ghezzi et al., 2009). Les mutations ont été initialement rapportées dans des présentations neurologiques isolées puis dans des atteintes multisystémiques (cardiaques, hépatiques et rénales).

6.4.2. Mutations dans des gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales.

La traduction des protéines codées par l'ADNmt se fait exclusivement par la machinerie mitochondriale. Ce processus est spécifique de la mitochondrie. Il implique 22 ARNt et 2 ARNr codés par l'ADNmt. La centaine de protéines impliquée est codée par le génome nucléaire (protéines ribosomales mitochondriales, enzymes de modification des

ARNt et ARNr, aminoacyl-ARNt synthétases, facteurs d'élongation de la traduction...). Des mutations dans plusieurs de ces facteurs ont un impact direct sur la chaîne respiratoire et entraînent généralement des tableaux cliniques sévères avec une atteinte multi-systémique (McFarland et al., 2004).

6.4.3. Mutations dans des gènes impliqués dans la stabilité de l'ADNmt.

Tous les facteurs responsables du maintien et de la stabilité de l'ADNmt sont codés par le génome nucléaire et des mutations dans plusieurs de ces gènes sont responsables de maladies mitochondriales avec instabilité de l'ADNmt. Cette instabilité va entraîner à plus ou moins long terme un déficit multiple de la chaîne respiratoire et une carence en ATP. L'instabilité se manifeste par des anomalies quantitatives ou qualitatives de l'ADNmt transmises selon un mode mendélien. Les déplétions (diminution du nombre de copies de l'ADNmt) surviennent en période néonatale ou dans l'enfance. Elles correspondent à des atteintes sévères se transmettant selon un mode autosomique récessif. Les formes hépato-cérébrales, associant une atteinte hépatique précoce (cytolyse, insuffisance hépatocellulaire, cholestase) et une hypotonie axiale, sont dues à des mutations dans les gènes *DGUOK* codant pour la désoxyguanosine kinase, *POLG* codant pour l'ADN polymérase gamma mitochondriale ou *MPV17* de fonction inconnue. On trouve également des mutations dans le gène *TK2* codant pour la thymidine kinase 2, qui entraînent une myopathie précoce et très sévère avec déplétion dans le muscle squelettique. A l'inverse, les pathologies mitochondriales causées par des délétions multiples de l'ADNmt présentent majoritairement une transmission mendélienne autosomique dominante et apparaissent chez le sujet adulte. Elles sont caractérisées par une CPEO, un ptosis et une faiblesse progressive des muscles extra-oculaires et squelettiques à des degrés variables. Elles peuvent également associer d'autres signes cliniques, principalement neurologiques. Là encore, l'hétérogénéité génétique est grande puisqu'elles sont causées par des mutations dans les gènes *POLG* et *POLG2* codant respectivement pour les sous-unités POLG- α et POLG- β de la polymérase mitochondriale, *ANT1* codant pour l'isoforme musculaire du translocateur des adénylates, *PEO1* codant pour l'hélicase mitochondriale TWINKLE ou *OPA1* codant pour une GTPase de la membrane interne mitochondriale.

Les gènes à l'origine de cette instabilité se classent en différents groupes (Tableau1) :

- Ceux responsables du maintien et de la biogénèse de l'ADNmt :

- Gènes de la réplication : *POLG*, *POLG2* et *Twinkle* (Kasiviswanathan et al., 2009) ; (Longley et al., 2006) ; (Spelbrink et al., 2001) ; (Van Goethem et al., 2001).
- Gènes de la réparation : *DNA2*, *MGME1*
- Ceux impliqués dans la régulation du pool de nucléotides mitochondriaux : *TP*, *TK2*, *DGUOK*, *SLC25A4*, *RRM2B*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *ABAT* ((Ronchi et al., 2013a) ; (Kornblum et al., 2013)).
- Ceux impliqués dans la dynamique mitochondriale (fission et fusion des mitochondries) et le remodelage du réseau mitochondrial : *OPA1*, *MFN2*, *FBXL4*.
- Ceux impliqués dans le maintien des crêtes mitochondriales ; cette dernière catégorie ayant été mise en évidence par les travaux de l'équipe sur le gène *CHCHD10* ((Bannwarth et al., 2014a) ; (Genin et al., 2016)).

Chez la majorité des patients, les gènes responsables de ces pathologies sont inconnus. Un des objectifs de l'équipe est d'identifier de nouveaux gènes et mécanismes responsables de ces maladies. Mon travail a essentiellement porté sur *MFN2*, impliqué dans la fusion mitochondriale, et sur *CHCHD10*. C'est la raison pour laquelle, je développerai les données concernant les gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale et le maintien des crêtes dans les 2 paragraphes suivants.

Gène	Conséquences sur l'ADNmt	Phénotype clinique	Transmission
Gènes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADmt			
POLG1	Déplétion	Alpers, myocérébrohépatopathie	AR
	Délétions multiples	PEO	AR
	Délétions multiples	PEO +/- autres signes : épilepsie, neuropathie, ataxie, syndrome parkinsonien	AD
POLG2	Délétions multiples	PEO	AD
TWINKLE	Délétions multiples	PEO, ataxie	AD
	Déplétion	Ataxie, encéphalopathie	AR
Gènes impliqués dans la régulation du pool de nucléotides mitochondriaux			
TP	Déplétion, délétions multiples	MNGIE	AR

TK2	Déplétion, délétions multiples	Myopathie, encéphalomyopathie	AR
		PEO	AR
DGUOK	Déplétion	Encéphalohépatopathie	AR
	Délétions multiples	Myopathie	AR
RRM2B	Déplétion	Encéphalomyopathie, MNGIE	AR
	Délétions multiples	PEO	AD
ANT1	Délétions multiples	PEO	AD
		Cardiomyopathie hypertrophique	AR
SUCLA2	Déplétion	Encéphalomyopathie avec acidurie méthylmalonique	AR
SUCLG1	Déplétion	Encéphalomyopathie avec acidurie méthylmalonique	AR
Gènes impliqués dans la fusion mitochondriale			
OPA1	Délétions multiples	Atrophie optique +/- signes neuromusculaires	AD
MPV17	Déplétion	Leucopathie, neuropathie, hépatopathie	AR
	Délétions multiples	PEO+/- neuropathie, hépatopathie, myopathie, syndrome parkinsonien, diabète, atteinte digestive	AR

Tableau 1 : Représentation schématique des signes cliniques associés aux mutations dans les principaux gènes nucléaires responsables de la stabilité de l'ADNmt.

PEO : Ophtalmoplégie Externe Progressive ; MNGIE : Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalopathy
AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif.

6.4.3.1. Instabilité de l'ADNmt et défaut de fusion mitochondriale.

Dans les cellules saines, les mitochondries se divisent et fusionnent en permanence pour former un réseau d'interconnexion dynamique. L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) est principalement liée à des mutations dans le gène *OPA1* qui code pour une GTPase de la famille des dynamines, impliquée dans la fusion de la membrane mitochondriale interne (Delettre et al., 2000).

La mitofusine 2 (MFN2) est l'une des deux mitofusines nécessaires à la fusion de la membrane mitochondriale externe ((Koshiba et al., 2004) ; (Meeusen et al., 2004) ; (Song et al., 2007)). Les mutations du gène *MFN2* sont une cause majeure de maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A), une neuropathie axonale autosomique

dominante. Dans l'équipe, nous avons étudié une grande famille présentant un phénotype associant une atrophie optique, une neuropathie axonale et une myopathie mitochondriale à l'âge adulte. Les patients présentaient une accumulation de délétions multiples dans le muscle squelettique caractéristique d'une instabilité de l'ADNmt. La présentation clinique dans cette famille ressemblait à celle décrite dans les tableaux ADOA "plus", liée à des mutations dans *OPA1* ((Amati-Bonneau et al., 2009) ; (Skidd et al., 2013)). Nous n'avons pas retrouvé de mutation dans *OPA1* mais nous avons identifié une mutation faux-sens (c.629A> T, p.D210V) dans *MFN2*, responsable du phénotype observé dans cette famille. Ce travail a permis de montrer que *MFN2* est un gène associé à des maladies avec instabilité de l'ADNmt. Contrairement aux études précédentes chez les patients présentant une forme « classique » de CMT2A, les fibroblastes portant la mutation p.D210V présentent un déficit de la chaîne respiratoire, une fragmentation du réseau mitochondrial et une réduction significative de l'expression de *MFN2*. En outre, nous avons montré que cette mutation est responsable d'un déficit de réparation des lésions de l'ADNmt induites par un stress oxydatif. Il est probable que ce défaut de réparation soit dû à un déséquilibre de la répartition des protéines de réparation entre les mitochondries induit par un défaut de fusion. Ce défaut de réparation de l'ADNmt explique au moins en partie l'accumulation de délétions dans les muscles des patients porteurs de la mutation p.D210V (Rouzier et al., 2012).

6.4.3.2. Instabilité de l'ADNmt et défaut de maintien des crêtes mitochondriales.

En 2014, l'étude d'une grande famille avec une pathologie neurologique complexe associée à des délétions de l'ADNmt nous a conduit à identifier une autre catégorie de gènes impliqués dans les maladies avec instabilité de l'ADNmt. Dans cette famille, les patients présentaient un phénotype d'apparition tardive incluant une atteinte du motoneurone, un déclin cognitif ressemblant à une démence fronto-temporale (DFT), une ataxie cérébelleuse et une myopathie mitochondriale. Chez tous les patients, la biopsie musculaire retrouvait un grand nombre de fibres COX négatives, un déficit de la chaîne respiratoire et une accumulation de délétions de l'ADNmt. Dans les fibroblastes des patients, nous avons également retrouvé un déficit de la chaîne respiratoire, des altérations ultrastructurales mitochondriales et une fragmentation du réseau mitochondrial. De manière intéressante, l'expression d'une protéine GFP photoactivable dans la matrice mitochondriale a montré que la fusion mitochondriale n'est pas inhibée dans les cellules des patients. Par séquençage d'exome, nous avons identifié une mutation faux-sens

(c.176C> T; p.Ser59Leu) dans le gène *CHCHD10* qui code pour une protéine dont la fonction était inconnue. Nous avons montré que CHCHD10 est une protéine mitochondriale située dans l'espace intermembranaire avec une concentration au niveau des jonctions des crêtes mitochondriales (Bannwarth et al., 2014a).

L'existence d'un phénotype évoquant une démence fronto-temporale et une sclérose latérale amyotrophique (DFT-SLA) dans une maladie mitochondriale nous a conduit à analyser *CHCHD10* dans une cohorte de 115 patients présentant une DFT-SLA. Nous avons identifié la même mutation faux-sens (p.Ser59Leu) dans une famille et un deuxième variant (p.Pro34Ser) chez 2 patients non apparentés (Chausseu et al., 2014a). Suite à l'implication de *CHCHD10* dans la DFT-SLA, d'autres études ont rapporté des mutations de *CHCHD10* dans des cohortes de SLA familiale et sporadique pure, conduisant ainsi secondairement à l'identification d'un nouveau gène associé au spectre clinique de la DFT-SLA (pour revue, voir Cozzolino et al., 2015). En outre, Penttilä et ses collègues ont identifié une mutation fondatrice dans *CHCHD10* (c.197G>T; p.Gly66Val) dans 17 familles finlandaises avec apparition tardive d'une neuropathie motrice spinale (SMAJ) (Penttilä et al., 2015a) et ce variant a également été montré comme responsable de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (CMT2) (Auranen et al., 2015).

7. Dynamique mitochondriale.

La dynamique mitochondriale, composée de la fusion et de la fission, regroupe tous les phénomènes qui participent aux mouvements des mitochondries et ceux qui régulent leur architecture (morphologie et structure). Les mitochondries forment un réseau hétérogène, très dynamique, en perpétuel mouvement dans tout le cytoplasme des cellules (Figure 18). La morphologie du réseau mitochondrial et son activité sont étroitement liées. En effet, le réseau varie extrêmement vite pour adapter sa structure en réponse aux besoins physiologiques ou à différents stress. La forme des mitochondries s'adapte donc constamment en fonction de l'environnement, des besoins énergétiques, du stade de développement des cellules et des conditions physiologiques ou physiopathologiques. Ces modifications sont régulées par des protéines impliquées dans la fusion et la fission ainsi que dans la distribution mitochondriale. La morphologie du réseau influence directement toutes les fonctions mitochondriales. Et inversement, toutes les fonctions mitochondriales régulent directement la morphologie des mitochondries. La production énergétique, la mort cellulaire programmée ou l'homéostasie calcique sont des exemples des principales fonctions mitochondriales liées à la structure et à la morphologie du réseau ((Vafai and

Mootha, 2012) ; (Liesa and Shirihai, 2013) ; (Hackenbrock et al., 1966)). La morphologie des mitochondries dépend d'un équilibre entre fusion et fission mitochondriales, qui varie entre deux états extrêmes de mitochondries fusionnées à totalement fragmentées (Bereiter-Hahn and Vöth, 1994) qui doit être finement régulé (Sesaki and Jensen, 1999).

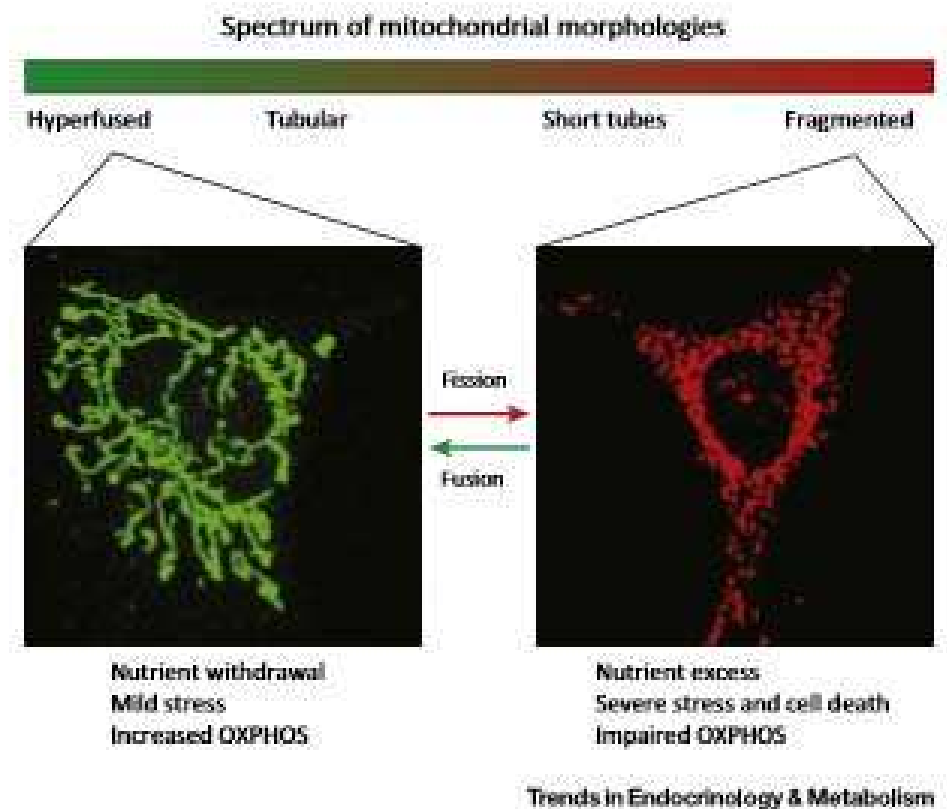


Figure 18 : Adaptation de la morphologie du réseau mitochondrial en fonction du métabolisme.

Le réseau mitochondrial peut adapter sa morphologie et passer d'un état hyper fusionné (vert) à fragmenté (rouge) en fonction des conditions métaboliques dans les cellules en culture (fibroblastes embryonnaires de souris).
Abréviation : OXPHOS = phosphorylation oxydative (d'après Wai 2016).

7.1 Transport et distribution des mitochondries.

Pendant longtemps, les chercheurs ont pensé que les mitochondries étaient immobiles dans le cytoplasme. A l'époque, il n'était pas possible de visualiser leurs mouvements. Elles apparaissaient donc figées dans les cellules. Les avancées technologiques des trente dernières années ont permis dans un premier temps de les visualiser puis de les observer

en mouvement au sein de cellules vivantes. Les mitochondries se divisent et fusionnent continuellement, et sont également mobiles dans les cellules. Le mouvement des mitochondries nécessite l'intervention des protéines motrices qui utilisent l'ATP pour se déplacer sur le cytosquelette. Chez la levure, les mitochondries sont mobiles sur les filaments d'actine grâce aux myosines ((Förtisch et al., 2011) ; (Altmann et al., 2008)). Et chez les mammifères, elles utilisent les microtubules sur lesquels elles se déplacent grâce à la kinésine pour le transport antérograde (vers l'extrémité + du microtubule) et la dynéine pour le transport rétrograde (vers l'extrémité – du microtubule). La distribution et le transport des mitochondries dans les cellules sont très importants pour une répartition homogène de l'énergie. C'est notamment le cas pour les neurones qui ont une structure particulière. Les mitochondries doivent se répartir dans le corps cellulaire et le long de l'axone (Figure 19). La forme particulière des cellules neuronales limite la vitesse de propagation, le déplacement des organelles, la diffusion énergétique et la diffusion de petites molécules. Des défauts de la dynamique mitochondriale sont fréquemment observés dans des pathologies neurodégénératives, ou peuvent être à l'origine de ces pathologies (Tableau 2) ((Knott et al., 2008) ; (Schwarz et al., 2013) ; (Bose and Beal, 2016) ; (Züchner et al., 2004)).

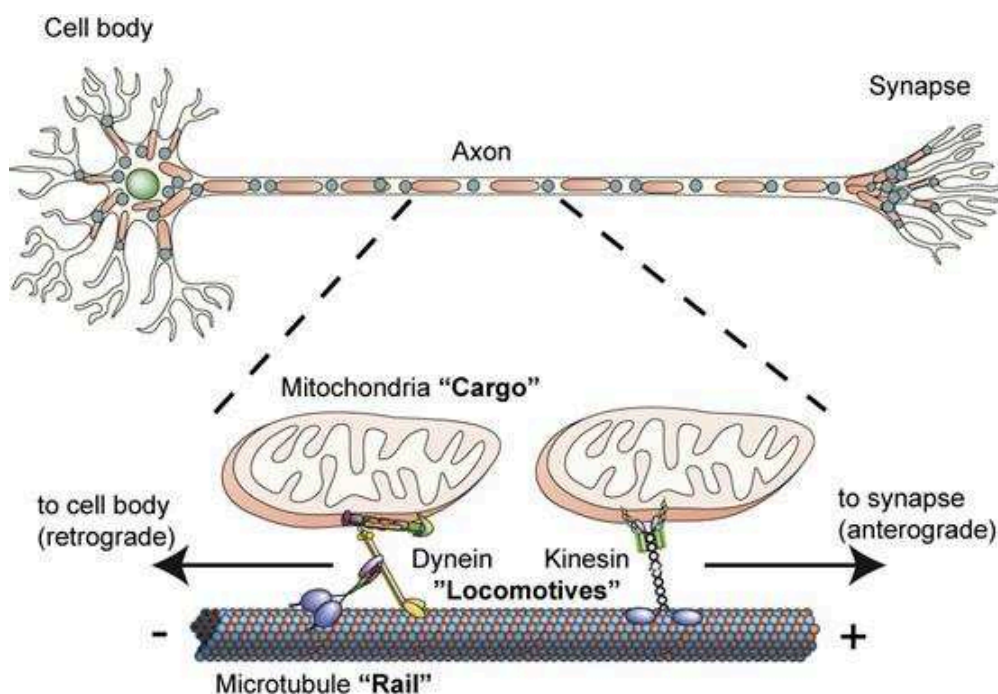
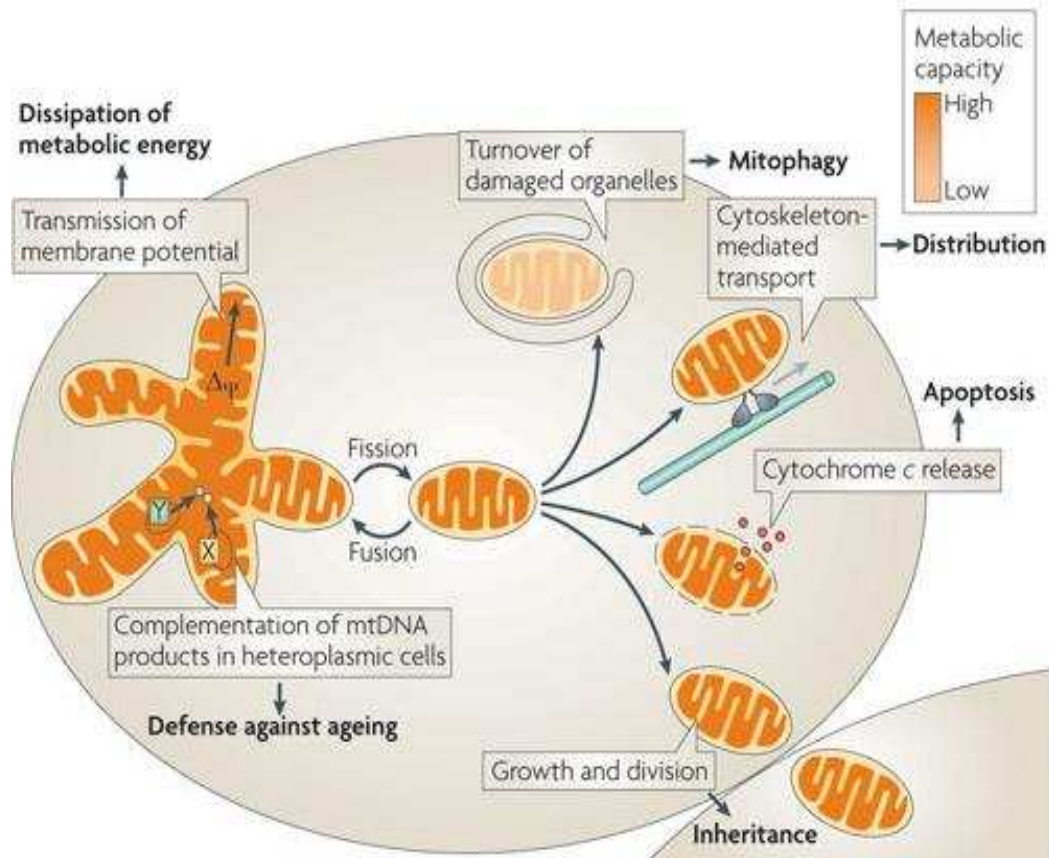


Figure 19 : Transport mitochondrial dans les cellules neuronales.

Le transport axonal des mitochondries est médié par des moteurs moléculaires (« Locomotives ») qui s'exécutent sur les microtubules (« Rails »). Les kinésines se déplacent vers l'extrémité plus des microtubules vers la synapse. Les dynéine se déplace vers l'extrémité moins des microtubules et interviennent dans le transport vers le corps cellulaire (d'après De Vos et al., 2008).

7.2. Dynamique mitochondriale

La forme et la structure du réseau mitochondrial sont régulées en grande partie par un équilibre entre la fission et la fusion mitochondriales (Figure 20). Cet équilibre correspond à un flux entre deux états de mitochondries fusionnées ou fragmentées. Les premières études de la dynamique mitochondriale, en partie réalisées chez la levure, ont permis de déterminer les acteurs impliqués dans cet équilibre et de comprendre comment se déroulent les deux processus de fission et de fusion mitochondriales. On associe généralement la fusion à quelque chose de bénéfique pour les mitochondries et pour les cellules alors que la fission apparaît plutôt comme néfaste. La fusion et la fission mitochondriales permettent de maintenir une bonne homéostasie mitochondriale ((Chen and Chan, 2005) ; (Chen and Chan, 2009)). En effet, lorsque deux mitochondries adjacentes fusionnent leurs membranes (ME et MI), elles échangent et mélangent des composants de leurs matrices avant de se séparer de nouveau ((Okamoto and Shaw, 2005) ; (Hoppins et al., 2007)). Cela permet d'homogénéiser et de répartir les molécules fonctionnelles (protéines et molécules d'ADNmt) dans les deux mitochondries qui vont se séparer. Ainsi s'il y a un défaut protéique ou une perte d'ADNmt, la fusion peut corriger ces problèmes. Elle permet également d'adapter le réseau mitochondrial aux fortes demandes énergétiques, notamment au niveau des neurones, et ainsi d'optimiser la production d'ATP. La fission quant à elle réduit la production énergétique en séparant les mitochondries et permet la segmentation d'une mitochondrie qui contient trop de molécules anormales, afin qu'elle puisse être éliminée par autophagie spécifique : la mitophagie ((Chen and Chan, 2009) ; (Youle and van der Bliek, 2012)). Un excès de fission entraîne une fragmentation du réseau, une libération du cytochrome c qui conduit généralement à l'apoptose. La fragmentation mitochondriale survient en réponse à des stress ou suite à des dysfonctionnements cellulaires et a été observée dans des désordres neuromusculaires ou cardiaques, dans des cancers ou dans des cas d'obésité. Il existe un lien entre la morphologie du réseau mitochondrial et la production d'ATP par la chaîne respiratoire (Hackenbrock et al., 1966). La haute plasticité de la forme des mitochondries permet d'adapter l'activité OXPHOS en fonction des nutriments présents. Lorsque le milieu est riche en nutriments, le réseau se fragmente afin de diminuer la production d'ATP. Inversement en absence de nutriments, le réseau s'allonge pour maintenir une production énergétique suffisante permettant ainsi d'optimiser la production d'ATP malgré la faible quantité de nutriment ((Pernas and Scorrano, 2016) ; (Gomes and Scorrano, 2011) ; (Schrepfer and Scorrano, 2016) ; (Cogliati et al., 2013)).

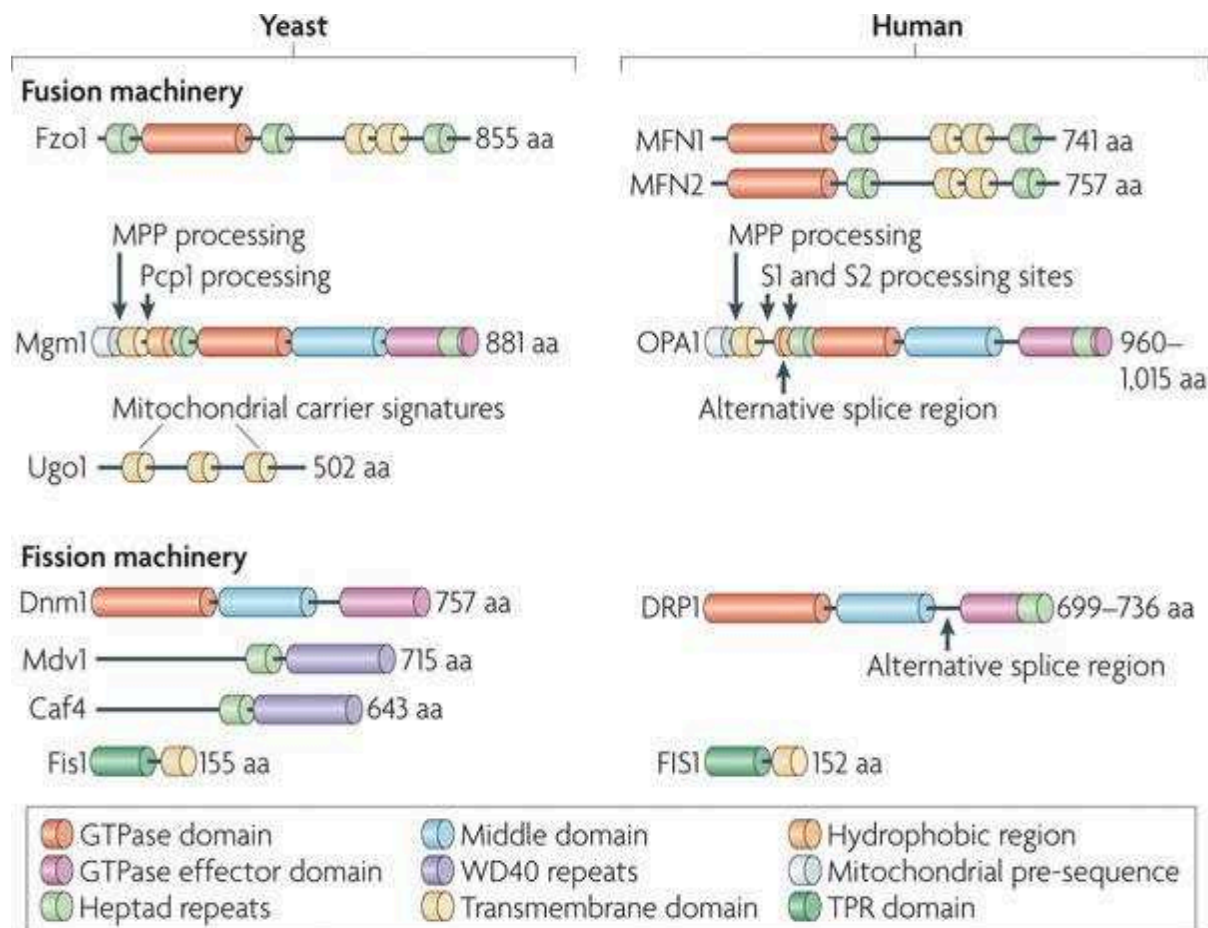


Westermann et al., 2010

Figure 20 : Modèles de cycle « de vie » mitochondrial.

Ces modèles reflètent la dynamique et le « turnover » mitochondrial. Dans une mitochondrie saine, les événements antagonistes de fusion et fission dépendent du potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$). Après une fission mitochondriale, les mitochondries fragmentées peuvent soit maintenir un potentiel de membrane intact soit se dépolariiser. La dépolariisation entraîne la production de ROS, l'augmentation du calcium cytosolique, le relargage du cytochrome c ou la perte d'ATP aboutissant à la mort cellulaire et/ou des anomalies du transport, du réseau mitochondrial. (Westermann *et al.*, 2010).

De nombreuses études réalisées chez la levure ont permis d'identifier les acteurs qui jouent un rôle dans la dynamique mitochondriale. Des études plus poussées de ces processus sur des cellules isolées de patients, présentant des mutations de gènes identifiés chez la levure, ont permis d'étendre la compréhension des mécanismes de la dynamique mitochondriale chez l'homme. Les protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale appartiennent à la famille des GTPases, des enzymes qui hydrolysent le GTP en GDP + Pi pour avoir l'énergie nécessaire à leur fonctionnement (Figure 21). Les défauts de fusion ou de fission sont généralement létaux ou pathologiques. Ils entraînent par exemple, chez l'homme des neuropathies périphériques, une cécité ou une atrophie optique ((Westermann et al., 2010a); (Chan et al., 2012) ; (Nunnari and Suomalainen, 2012) ; (Youle and van der Bliek, 2012)). Des défauts de la dynamique mitochondriale peuvent également induire une instabilité de l'ADNmt ((Jones and Fangman, 1992) ; (Wong et al., 2000)).



Westermann et al., 2010

Figure 21 : Représentation schématique des protéines de la fission et de la fusion mitochondriales.

Illustrations des différentes protéines de la dynamique mitochondriale retrouvées chez la levure (à gauche) ou chez l'homme (à droite). Représentation des Dynamines impliquées dans la dynamique mitochondriale des cellules de mammifères : DRP1, MFN1, MFN2 et OPA1 avec les différents domaines qui composent leur structure : un domaine GTPase, un domaine intermédiaire (middle domain), et un domaine effecteur ou GED. Chez les mitofusines ce domaine GED n'est pas conservé (d'après Westermann et al., 2010).

7.3 Acteurs et régulation de la fission mitochondriale.

La fission mitochondriale joue de nombreux rôles physiologiques, notamment dans le développement du tube neural. D'un point de vue cellulaire, la fission est indispensable à la prolifération cellulaire et mitochondriale, ainsi qu'à l'élimination des mitochondries altérées. Elle facilite aussi l'apoptose. Chez les mammifères, plusieurs protéines sont nécessaires pour la réalisation de ce processus : DRP1, FIS1, Mff, Mid49 et Mid51. Celle qui joue un rôle majeur dans la fission est une GTPase : la « dynamin-related protein 1 » ou DRP1 dont

l'orthologue chez la levure est Dnm1. Cette protéine est ubiquitaire et est fortement exprimée dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques. Elle joue un rôle dans la fission et la distribution mitochondriale (répartition dans les axones, les dendrites et les synapses, par exemple). Elle joue aussi un rôle dans la fragmentation des peroxysomes. C'est une GTPase cytosolique qui doit être recrutée à la membrane de l'organelle par l'intermédiaire de Fis1 pour réaliser la fission. Son recrutement se fait au niveau de sites putatifs de fission spécifiques dépendants du réticulum endoplasmique (RE) et du cytosquelette d'actine. Ces sites facilitent l'auto-assemblage de DRP1 en structure multimérique nécessaire à la réalisation de la fission ((Friedman et al., 2011) ; (Rowland and Voeltz, 2012)). D'un point de vue structural DRP1 possède les caractéristiques des GTPase de la famille des dynamines, elle est composée en N-terminal d'un domaine GTPase très conservé, d'un domaine en hélice en son centre et d'un domaine GED (domaine effecteur de la GTPase) en C-terminal (Praefcke and McMahon, 2004) (Figures 22 et 23). L'oligomérisation de plusieurs protéines DRP1 va former une structure en forme de spirale ou d'anneau autour de la membrane externe qui va entraîner la constriction et la scission des mitochondries ((van der Bliek and Payne, 2010) ; (Mears et al., 2011) ; (Chappie et al., 2010) ; (Gao et al., 2010)).

La fission régule la sortie des protéines de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Ainsi au cours de l'apoptose, elle facilite le relargage du cytochrome *c* de la mitochondrie. Elle permet aussi l'élimination des mitochondries altérées par un processus d'autophagie spécifique appelé mitophagie ((Youle and van der Bliek, 2012) ; (Okamoto and Shaw, 2005) ; (McBride et al., 2006) ; (Chan et al., 2012) ; (Westermann et al., 2010); (Kim et al., 2007); (Palmer et al., 2011a)). Un déficit en DRP1 entraîne la formation de mitochondries hautement connectées et allongées (augmentation de la fusion) et une diminution de la mitophagie qui entraîne l'accumulation de mitochondries défectueuses ((Bleazard et al., 1999) ; (Sesaki and Jensen, 1999) ; (Narendra et al., 2008); (Kageyama et al., 2014) ; (Ikeda et al., 2015)). L'inhibition de la fission mitochondriale par inactivation de Drp1 entraîne une déplétion de l'ADNmt, une diminution de la respiration mitochondriale, de la production d'ATP et une inhibition de la prolifération cellulaire (Parone et al., 2008). L'activité de Drp1 au niveau de la ME est régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, Sumoylation...), des interactions avec des récepteurs mitochondriaux et des protéines accessoires. Sur la membrane externe mitochondriale, on trouve tous les autres facteurs impliqués dans la fission : FIS1 (FISSION 1), Mff (Mitochondrial Fission Receptor), Mid49 et Mid51 (Mitochondrial dynamic protein qui font respectivement 49 et 51 kDa). Ces protéines permettent de recruter et d'assembler

DRP1 à la membrane externe ((Palmer et al., 2011b) ; (Labbé et al., 2014) ; (DuBoff et al., 2013)). Ces récepteurs sont également retrouvés sur la membrane des peroxysomes. Les souris *DRP1* ^{-/-} meurent pendant la période embryonnaire avec des défauts de développement du cœur, du foie et du tube neural ((Wakabayashi et al., 2009) ; (Ikeda et al., 2015)). Chez l'homme, les mutations *DRP1* sont responsables de phénotypes sévères (forme néonatale) dûs à un défaut de fission des mitochondries et des peroxysomes (Waterham et al., 2007).

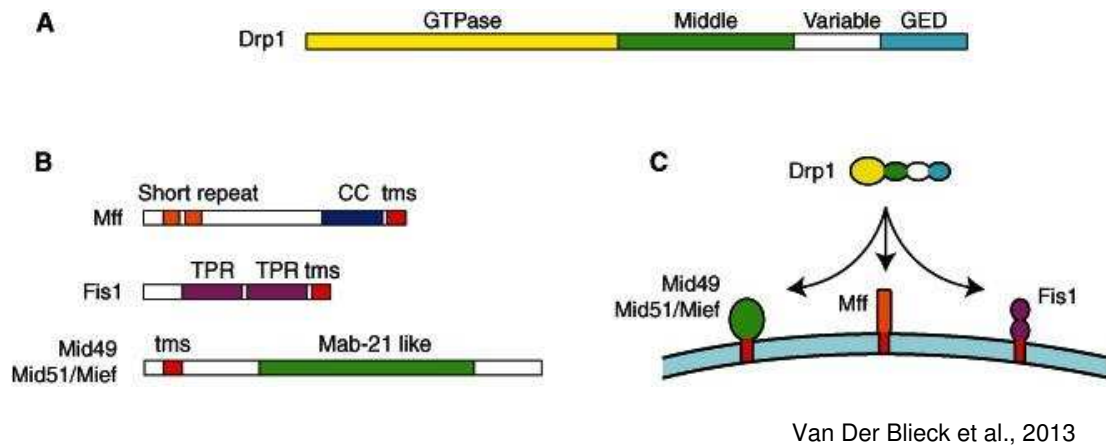


Figure 22 : Protéines de la fission mitochondriale et recrutement de DRP1.

Représentation des protéines adaptatrices pouvant lier et recruter DRP1 aux membranes mitochondriales : FIS1, Mff, Mid49 et 51. Elles possèdent toutes un domaine tms qui permet la liaison à la membrane, mais elles possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine différents suggérant des fonctions distinctes. Illustration des différentes protéines adaptatrice de DRP1 se trouvant à la surface des mitochondries de cellules de mammifères (d'après Van Der Blieck et al., 2013).

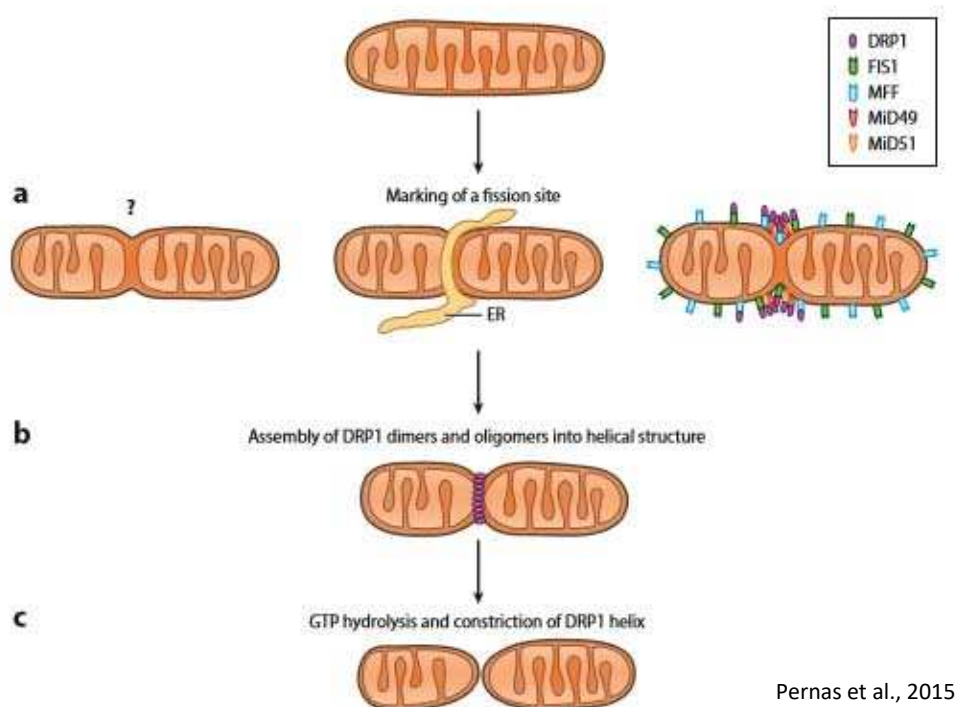


Figure 23 : Mécanisme de fission mitochondriale.

La fission mitochondriale est médiée par DRP1, des protéines adaptatrices et des éléments cytoplasmiques.

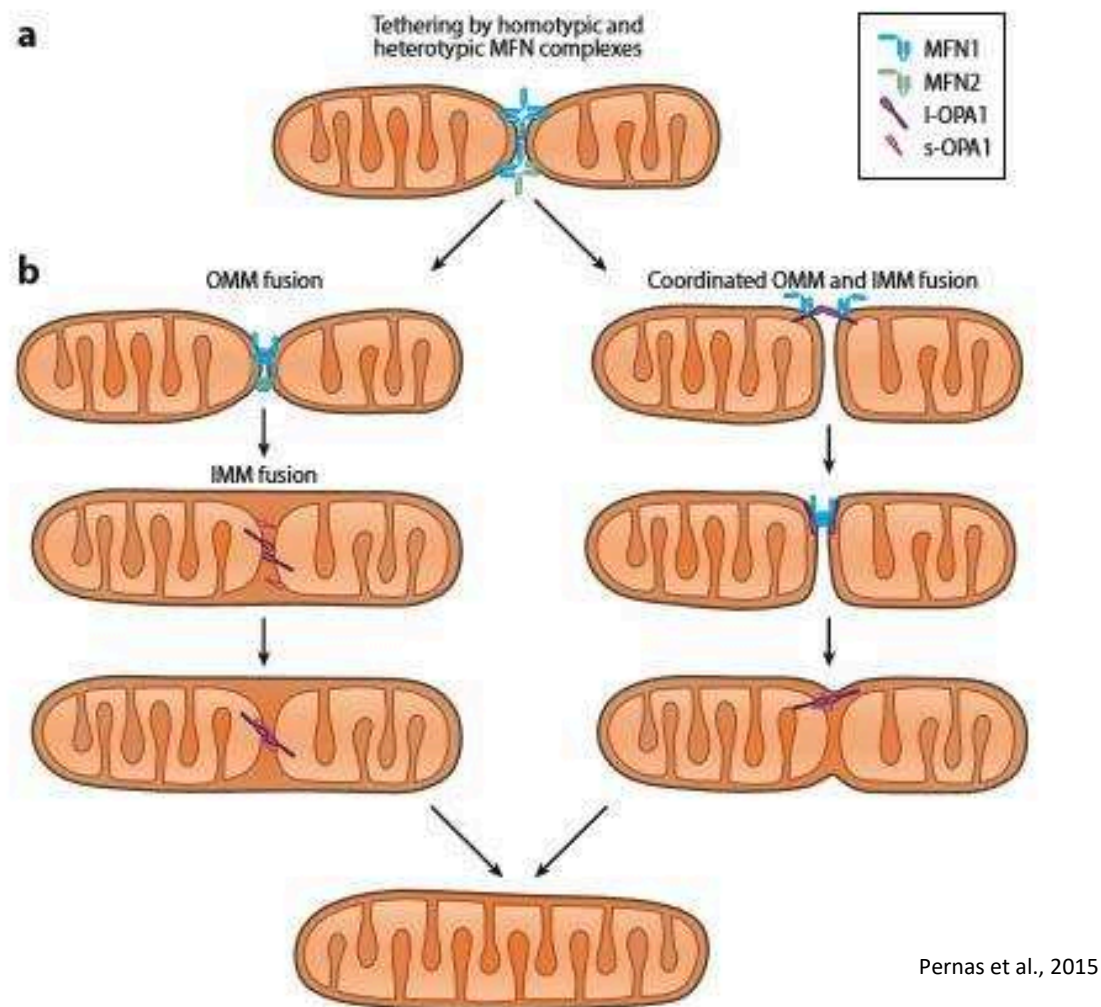
(a) Le recrutement de DRP1 au site spécifique de fission, grâce à la machinerie protéique de fission et à la présence de protéines adaptatrices FIS1, MFF, MiD49, and MiD51 (panel de droite), et en association avec le réticulum endoplasmique (panel de gauche).

(b) Assemblage de DRP1 : oligomérisation en hélice autour de la membrane externe mitochondriale.

(c) Hydrolyse du GTP par DRP1 qui entraîne la constriction de l'hélice et donc des membranes externes et internes et la scission des mitochondries. DRP1 : dynamin-related protein 1; ER : endoplasmic reticulum; FIS1 : fission 1; GTP : guanosine triphosphate; MFF : « mitochondrial fission factor »; MiD49 and MiD51 : « mitochondrial dynamics proteins » de 49 kDa et 51 kDa (d'après Pernas et al., 2015).

7.4. Acteurs et régulation de la fusion mitochondriale.

La fusion est un processus qui requiert une coordination parfaite et synchronisée de la fusion des deux membranes mitochondriales (ME et MI) et qui permet le respect de la compartimentation mitochondriale ((Meeusen et al., 2004) ; (Song et al., 2009)). Chez les mammifères, 3 GTPases de la famille des Dynamines (Dynamin-like proteins) sont impliquées dans le processus de fusion (Figure 22). Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) sont responsables de la fusion des ME et OPA1 se charge de celle de la MI (Figure 24) (Palmer et al., 2011a). Ces trois GTPases comprennent des domaines « coiled-coil » et un domaine GTPase, essentiel à leur fonction. Les premiers tests de fusion avec marquage des mitochondries par des fluorophores différents ont permis de montrer que la fusion des membranes mitochondriales permet le mélange des contenus mitochondriaux. L'arrivée de nouvelles protéines fluorescentes photoconvertibles ou photoactivables, partiellement irradiées ou activées par un laser, a permis le marquage de mitochondries dont on peut suivre l'évolution. Ces études ont permis de mettre en évidence deux types de fusion (Liu et al., 2009). Dans la majorité des cas, la fusion est instable (de type « kiss and run ») : les mitochondries fusionnent leurs membranes, échangent des composants et se séparent presque immédiatement. Dans une minorité de cas, la fusion est stable et aboutit à la formation d'une mitochondrie allongée. L'inhibition de la fusion induit une fragmentation du réseau par augmentation de la division des mitochondries (augmentation de la fission) ((Bleazard et al., 1999) ; (Sesaki and Jensen, 1999)).



Pernas et al., 2015

Figure 24 : Mécanismes de fusion des membranes externes et internes mitochondriales.

(a) Représentation schématique des sites de contact entre deux mitochondries grâce à l'interaction homotypique (MFN1-MFN1 et MFN2-MFN2) ou hétérotypique (MFN1-MFN2) des mitofusines 1 et 2.
 Deux modèles pour les événements de fusion des membranes externes (ME) et internes (MI).
 (b) A gauche, la fusion des ME et des MI se fait selon des processus distincts, il y a d'abord fusion des ME puis dans un deuxième temps celle des MI. A droite, les processus de fusion des ME et MI se font de façon coordonnée grâce aux isoformes courts S-OPA1 qui forment des liaisons avec les complexes des mitofusines et la fusion coordonnée de la MI se fait par l'isoforme long L-OPA1.
 Les mitochondries fusionnées peuvent échanger leurs contenus (ADNmt, protéines, solutés...)
 Abréviations : IMM : membrane interne mitochondriale ; l-OPA1 : isoforme long d'OPA1 ; MFN : mitofusines ; OMM : membrane externe mitochondriale ; s-OPA1 : isoforme court d'OPA1 (d'après Pernas et al., 2015).

7.4.1. Fusion de la membrane interne : la protéine OPA1.

La fusion des membranes internes de la mitochondrie est prise en charge par la protéine OPA1 (Optic Atrophy 1) qui joue également un rôle dans le maintien et l'organisation des crêtes mitochondriales, dans le métabolisme énergétique et dans l'apoptose. OPA1 est une GTPase ubiquitaire codée chez l'homme par le gène *OPA1*, localisé sur le chromosome 3. Ce gène est composé de 30 exons dont 3 alternatifs qui donneront par épissage 8 transcrits différents (Delettre et al., 2001). Les ARN messagers sont traduits sous forme de précurseurs protéiques qui donneront une forme longue L-OPA1 et une forme courte S-OPA1. A son entrée dans la mitochondrie, le précurseur subit un premier clivage du signal d'import mitochondrial ((Olichon et al., 2007a) ; (Olichon et al., 2002)). La forme longue L-OPA1 est ancrée à la MI coté IMS. L-OPA1 peut aussi être clivée pour donner une forme courte (S-OPA1), localisée dans l'IMS proche de la ME (Song et al., 2007). L'équilibre entre les formes longues et courtes contrôle la dynamique mitochondriale (Ishihara et al., 2006). Les protéines OPA1 sont responsables de la fusion des MI mais elles jouent également un rôle dans l'organisation des crêtes mitochondriales. L'expression des différentes isoformes est variable selon les tissus avec une expression préférentielle au niveau de la rétine, du cerveau, du cœur et du muscle ((Delettre et al., 2001) ; (Olichon et al., 2007b)). Les isoformes incluant l'exon 4 seraient impliquées dans le contrôle du potentiel de membrane qui a un rôle essentiel dans la fusion (Song et al., 2007). Les exons 4b et 5b seraient impliqués dans le relargage du cytochrome c au cours de l'apoptose (Olichon et al., 2007a). Une inactivation de OPA1 par RNAi dans les cellules HeLa entraîne une fragmentation anormale du réseau mitochondrial, une perte du potentiel de membrane et une désorganisation de la structure des crêtes mitochondriales. De plus, un relargage du cytochrome c et une activation de l'apoptose caspase-dépendante sont observés dans ce modèle (Olichon et al., 2003). Les mutations du gène *OPA1* sont connues pour être responsable d'une atrophie optique dominante (AOD), une pathologie caractérisée par une perte de la vision entraînée par la destruction des cellules du nerf optique et des cellules du ganglion rétinale ((Alexander et al., 2000) ; (Delettre et al., 2000)). Les mutations du gène *OPA1* identifiées chez l'homme sont hétérozygotes à l'exception d'une seule, décrite à l'état homozygote et qui est responsable d'un phénotype sévère, qui entraîne une mort précoce chez l'enfant (Spiegel et al., 2016). Des mutations *OPA1* peuvent également être responsables d'un phénotype « AOD plus » qui associe à l'atrophie optique une atteinte multisystémiques associée à l'accumulation de délétions multiples de

l'ADNmt dans le muscle des patients ((Carelli et al., 2009) ; (Amati-Bonneau et al., 2009) ; (Skidd et al., 2013)).

7.4.2. Fusion de la membrane externe : les mitofusines.

Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) sont impliquées dans les événements précoces de fusion mitochondriale. Les deux protéines sont localisées sur la membrane externe des mitochondries. Elles sont très conservées au cours de l'évolution et sont retrouvées chez tous les eucaryotes de la levure à l'homme. Chez la levure et chez la drosophile, il n'y a qu'une mitofusine : Fuzzy (Fzo) dont l'étude a permis de déterminer la structure et la localisation de la protéine à la ME ((Rojo et al., 2002) ; (Fritz et al., 2001) ; (Okamoto and Shaw, 2005)). Les protéines MFN1 et MFN2 humaines présentent respectivement 64% et 95% d'homologie avec les formes murines. Chez l'homme, les deux mitofusines contiennent dans leur partie N-terminale orientée vers le cytosol un domaine de fixation au GTP, qui correspond à leur domaine d'activité composé de 5 motifs GTPase nécessaires à la liaison et à l'hydrolyse du GTP (Bourne et al., 1991). On trouve ensuite un domaine super enroulé en spirale, appelé HR1 pour « Heptad repeat » ou « coiled-coil » domaine. Les mitofusines possèdent également deux domaines transmembranaires qui permettent leur ancrage à la ME ((Koshiba et al., 2004) ; (Chen et al., 2003) ; (Cipolat et al., 2004)). Puis en C-terminal, se trouve un deuxième domaine coiled-coil appelé HR2, orienté vers le cytosol, et qui permet une interaction protéine-protéine *via* la formation d'une structure super enroulée antiparallèle entre deux mitofusines ((Koshiba et al., 2004) ; (Santel et al., 2003) ; (Santel and Fuller, 2001) ; (Rojo et al., 2002)). MFN1 et MFN2 forment ainsi des complexes homo-dimériques et/ou hétéro-dimériques grâce à ce domaine d'interaction « coiled coil » HR2. La formation de ces dimères entre deux mitofusines situées respectivement sur deux mitochondries adjacentes permettra le rapprochement des membranes externes (Figures 25 et 26) ((Hoppins et al., 2007) ; (Chen and Chan, 2005) ; (Chan et al., 2012)). La fusion est ensuite réalisée grâce au domaine GTPase qui fournit l'énergie nécessaire au changement de conformation des mitofusines et permet le rapprochement physique suffisant des ME des deux mitochondries adjacentes, entraînant leur fusion ($\text{GTP} + \text{H}_2\text{O} = \text{GDP} + \text{phosphate}$) ((Chen et al., 2005) ; (Detmer and Chan, 2007a)). De façon intéressante, MFN1 s'intègre mieux à la ME que MFN2 et elle présente une affinité supérieure pour le GTP avec une activité GTPase plus efficace que l'activité GTPase de MFN2 (Ishihara et al., 2004). Les deux protéines sont ubiquitaires. Cependant, MFN2 est majoritairement exprimée dans le cerveau et les muscles squelettiques alors que MFN1 est principalement retrouvée dans le cœur et les testicules. L'inactivation des

mitofusines dans les cellules entraîne une diminution de la fusion, une fragmentation du réseau mitochondrial, et de graves désordres cellulaires ((Chen et al., 2003) ; (Chen et al., 2005)). Les fibroblastes déficients pour MFN1 sont plus fragmentés que ceux déficients pour MFN2 (Chen et al., 2005). Les souris knock-out (KO) homozygotes pour *MFN1* ou *MFN2* meurent pendant la période embryonnaire suite à des problèmes placentaires (Chen et al., 2010). Des études réalisées sur des fibroblastes embryonnaires fœtaux de souris (MEF) KO MFN1^{-/-}, MFN2^{-/-} ou double KO MFN1^{-/-} MFN2^{-/-} ont permis de déterminer l'importance des mitofusines dans la dynamique ainsi que dans la physiologie mitochondriale ((Chen et al., 2003) ; (Chen et al., 2005) ; (Cipolat et al., 2004) ; (Ishihara et al., 2004)).

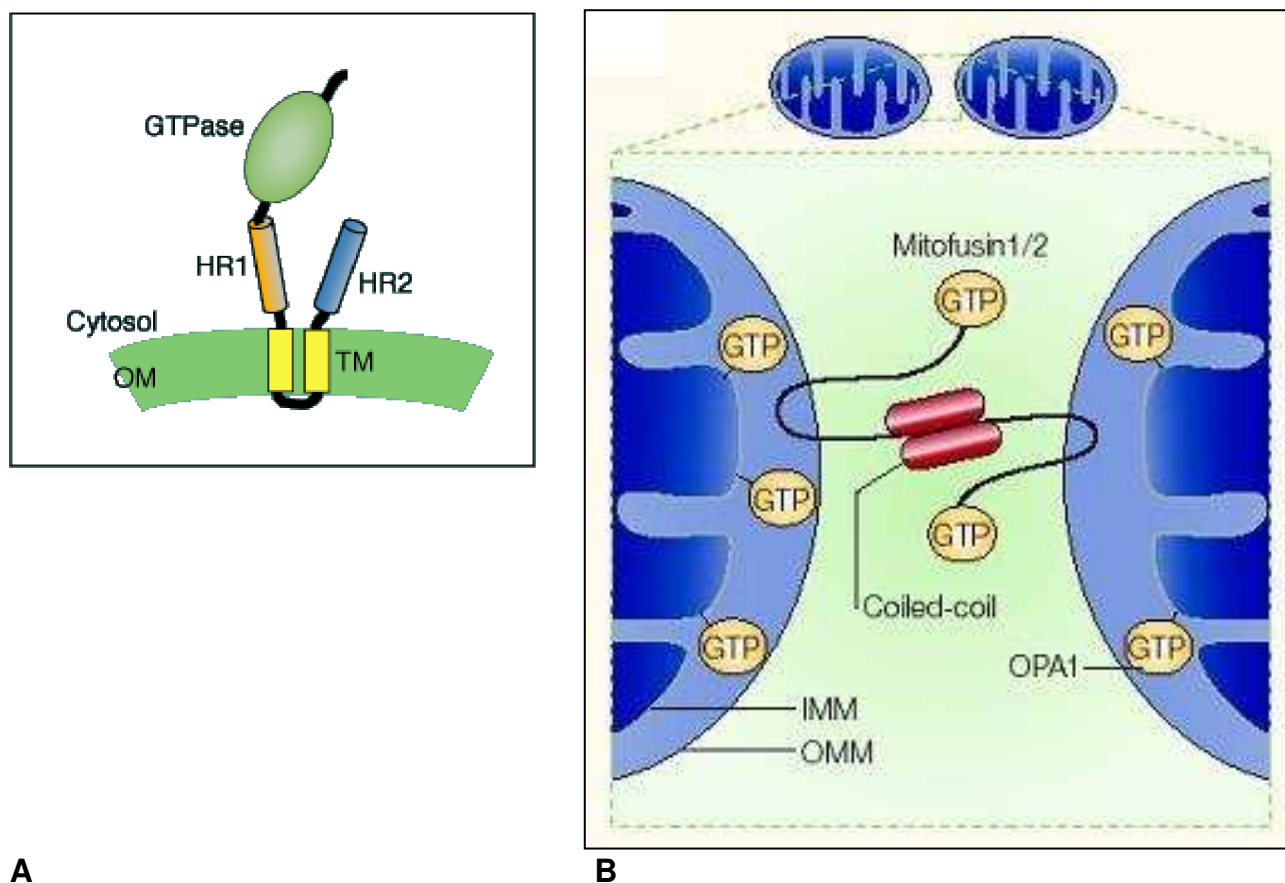


Figure 25 : Schématisation de la structure de MFN2.

A. Schéma représentant la protéine MFN2 (mitofusine 2) dans la membrane mitochondriale externe. Les deux N - et C-terminales sont orientées vers le cytosol. HR1 et HR2 indiquent deux domaines « heptad repeat » motifs qui forment des structures coiled-coil généralement pour les interactions protéines-protéines.

B. Interaction entre deux MFN2 présentes sur deux mitochondries adjacentes.

IMM : membrane interne mitochondriale ; OMM : membrane externe mitochondriale ; HR1 et HR2 : domaine « heptad repeat » 1 et 2 (d'après Youle and Karbowski, 2005).

La fusion mitochondriale joue un rôle primordial dans la stabilité de l'ADNmt. Dans les muscles des souris KO, on retrouve une déplétion avec une augmentation des mutations ponctuelles et des délétions de l'ADNmt (Chen et al., 2010). La fusion mitochondriale permettrait (i) de maintenir un nombre de copies d'ADNmt stable, (ii) d'éviter l'accumulation de mutations/délétions, (iii) de tolérer des taux élevés de mutations. Cet effet protecteur de la fusion mitochondriale pourrait être dû au fait qu'elle permet, *via* le mélange des contenus mitochondriaux, la complémentation de génomes mitochondriaux porteurs de différentes mutations ainsi que le mélange des protéines impliquées dans la réparation du génome mitochondrial (Nakada et al., 2009).

Durant les dernières décennies, des mutations ont été identifiées dans 2 gènes codant les protéines de fusion mitochondriale : MFN2 et OPA1, qui sont responsables respectivement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) et d'atrophies optiques dominantes (AOD) ((Züchner et al., 2004) ; (Delettre et al., 2000)). Des mutations dans les gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale ont également été identifiées dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie de Huntington ou la maladie de Parkinson ((Song et al., 2011) ; (Bose and Beal, 2016)). A ce jour, aucune mutation de *MFN1* n'a été identifiée dans des pathologies humaines.

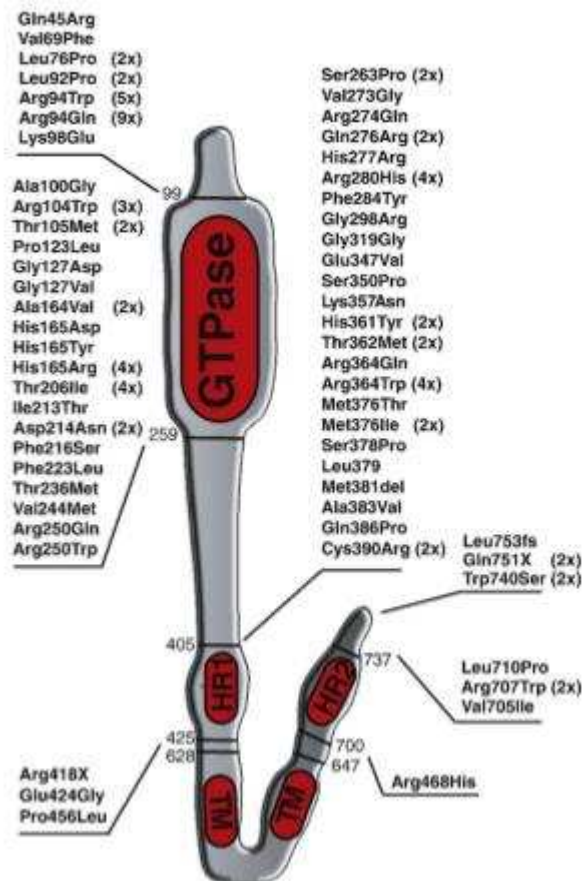


Figure 26 : Schématisation de la structure de MFN2 et de la distribution des mutations pathogènes les plus fréquemment retrouvées.

Les mutations du gène MFN2 sont distribuées le long des domaines protéiques. 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. La taille des différents domaines n'est pas à l'échelle (d'après Cartoni et al., 2009).

8. Mitochondries et neuro-dégénérescence.

8.1 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 (Tableau 2). 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 PINK1 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 neuro-dégénérescence (Chen and Chan, 2009).

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).

Gène / Locus	Fonction de la protéine	Pathologie
OPA1 3q28- 3q29	Fusion mitochondriale (membrane interne) Structure des crêtes mitochondriales Métabolisme énergétique Maintenance de l'ADNmt Régulation de l'apoptose	AOAD (Maladie de Kjer) AOAD plus AOAD + surdité AOAD + neuropathie périphérique AOAD + atteinte de type sclérose en plaque AOAD + surdité, ataxie, neuropathie périphérique, ophtalmoplégie et myopathie mitochondriale
MFN2 1q36.22	Fusion mitochondriale (membrane externe) Métabolisme �nerg�tique Interaction mitochondrie/réticulum endoplasmique	CMT2A (forme axonale à transmission autosomique dominante) HMSN VI (forme de CMT associée à une neuropathie optique)
GDAP1 8q13.1-12.3	Fission mitochondriale (membrane externe) Métabolisme �nerg�tique	CMT4A (forme démyélinisante à transmission autosomique récessive) CMT2K (forme axonale à transmission autosomique dominante)

Tableau 2 : Gènes de la dynamique mitochondriale et pathologies associées.

OPA1: Optic Atrophy 1; AOAD : Atrophie optique autosomique dominante ; MFN2: mitofusine 2; CMT2A: Charcot-Marie Tooth de type 2A; HMSN VI : Hereditary motor and sensory neuropathy VI;
GDAP1: Ganglioside-induced differentiation associated protein 1; CMT4A et CMT2K: Charcot-Marie Tooth de type 4A et 2K; DRP1: dynamin-related protein 1.

8.2 Maladie de Charcot-Marie-Tooth

La maladie de Charcot-Marie-Tooth ou CMT regroupe un ensemble de neuropathies périphériques héréditaires sensibles et motrices dont la prévalence est estimée à 1/2500 (Skre, 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 en 1886). Tooth publia sa thèse de médecine quelques mois plus tard sous le titre : « The peroneal type of progressive muscular atrophy » (Tooth en 1886). La CMT touche les nerfs périphériques et est très hétérogène sur le plan génétique avec plus de 50 gènes différents identifiés. La classification des CMT repose sur 3 critères :

- la nature de l'atteinte du nerf périphérique, qui est déterminée d'après les vitesses de conduction nerveuse : forme axonale (vitesse de conduction nerveuse > 40 m/s); forme démyélinisante (vitesse de conduction nerveuse < 35 m/s); forme intermédiaire (vitesse de conduction nerveuse entre 25 m/s et 45 m/s),
- le mode de transmission génétique : autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X,
- l'anomalie génétique en cause (gène et mutation en cause).

Le CMT de type 2 représente environ 30% des CMT et correspond à une forme axonale, causée par des mutations du gène MFN2 dans la forme 2A. La transmission est majoritairement autosomique dominante mais des formes récessives ont été décrites.

II. Objectifs.

Mon travail de thèse est axé sur la compréhension des mécanismes responsables de maladies mitochondriales avec instabilité de l'ADNmt et comporte 3 parties :

1. L'étude de mutations du gène *MFN2*, impliqué dans la dynamique mitochondriale, et son implication dans une maladie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt. Le laboratoire a identifié une mutation faux-sens dans le domaine d'activité GTPase de la protéine (c.629A>T ; p.D210V) au sein d'une grande famille présentant un phénotype neurologique complexe incluant une neuropathie périphérique associée à une atrophie optique. L'analyse du muscle des patients de cette famille a mis en évidence une myopathie mitochondriale accompagnée d'une désorganisation des crêtes des mitochondries en microscopie électronique. Des délétions multiples de l'ADNmt ont également été mises en évidence montrant pour la première fois que *MFN2* était un gène responsable de pathologies avec instabilité de l'ADNmt (Rouzier et al., 2012). L'objectif fixé pour cette partie de ma thèse est de définir les mécanismes responsables de l'instabilité de l'ADNmt (délétions multiples) observée chez ces patients en comparant l'impact de la mutation p.D210V à celui d'une autre mutation dans le même gène, responsable du phénotype CMT2A "classique" sans instabilité de l'ADNmt (c.496G>A ; p.A166T).

2. L'étude d'un modèle de souris qui a permis de montrer que l'inactivation de l'hélicase Pif1 entraîne une myopathie mitochondriale avec délétions multiples de l'ADNmt.

3. L'identification d'un nouveau gène d'instabilité *CHCHD10* qui a permis de montrer l'origine primaire d'un dysfonctionnement mitochondrial dans certaines formes de sclérose latérale amyotrophique (SLA).

III. Résultats.

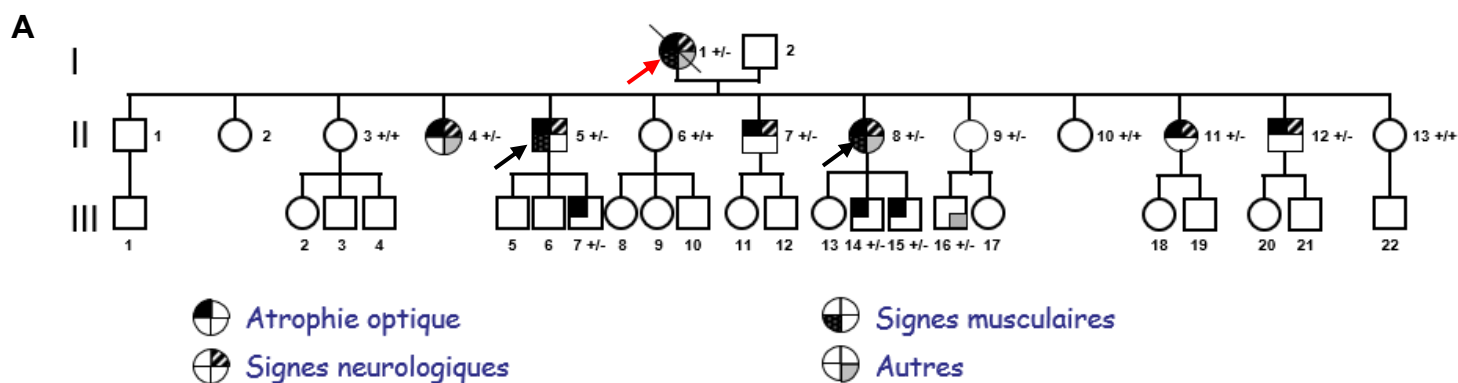
Partie 1 : MFN2 et implication dans l'instabilité de l'ADNmt.

Un grand nombre de mutations dans *MFN2* a été associé à une maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) ((Züchner et al., 2004) ; (Züchner et al., 2006)). Par ailleurs, nous avons montré que la mutation faux sens c.629A>T dans la séquence du gène *MFN2* (p.D210V) entraîne une atteinte neurologique complexe et sévère associée à une instabilité de l'ADNmt (Rouzier et al., 2012). Cette atteinte est à rapprocher de celle observée dans les formes « AOD plus » (Atrophie Optique Dominante plus), liée à une mutation du gène *OPA1*, associée à une instabilité de l'ADNmt (Züchner et al., 2006). Une partie de mon travail s'est portée sur l'étude de deux mutations du gène *MFN2* : les mutations c.629A>T (p.D210V) et c.496G>A (p.A166T) dans des fibroblastes de patients afin de comparer et comprendre comment ces 2 mutations, toutes deux situées dans la séquence codant pour le domaine d'activité GTPase de la protéine, peuvent être responsables de phénotypes aussi différents.

1. Phénotypes cliniques associés aux mutations p.D210V et p.A166T.

1.1. La mutation p.D210V est associée à un phénotype sévère avec instabilité de l'ADNmt.

Nous avons étudié une grande famille tunisienne non consanguine présentant un phénotype complexe associant essentiellement une atrophie optique, une neuropathie périphérique et une myopathie mitochondriale (Rouzier et al., 2012). Les principales caractéristiques cliniques des individus atteints dans cette famille sont résumées dans la figure 27. L'analyse histologique faite sur le muscle des patients avait révélé la présence d'un grand nombre de fibres RRF et de fibres COX-négatives, qui sont révélatrices d'une myopathie mitochondriale (Rouzier et al., 2012). L'analyse en microscopie électronique (ME) réalisée sur le muscle, montrait des mitochondries élargies avec une désorganisation des crêtes, confirmant la présence d'une atteinte mitochondriale. De plus, ce travail avait permis de montrer pour la première fois que *MFN2* est un gène d'instabilité puisque nous avons trouvé une accumulation de délétions multiples dans le muscle des individus atteints (Rouzier et al., 2012).



B

Patient	Age at exam (years)	Optic atrophy onset	Axonal neuropathy			Onset of neurological symptoms	Additional symptoms			Brain MRI	Muscle biopsy			
			Visual acuities (left eye, right eye)	Electrophysiology	Clinical symptoms		Deafness	Clinical myopathy	Others		OXPHOS deficiency	Histology	mtDNA multiple deletions	mtDNA depletion
I-1	60	?	20/63, 20/63	Sensory motor	+	54	+	Limb girdle weakness	Pyramidal and cerebellar syndrome Cataracts	Periventricular white matter lesions, diffuse cerebral atrophy	No	RRFs/CO X	Yes	No
II-4	45	Early childhood	20/200, 20/200	ND	+	-	-	-	Cataracts	ND	ND	ND	ND	ND
II-5	44	Early childhood	20/63, 20/100	Sensory	+	20	-	Limb girdle weakness	-	Slight atrophy of occipital cortex	ND	ND	ND	ND
II-7	34	Early childhood	20/200, 20/200	Sensory motor	+	14	-	-	-	Unremarkable	ND	ND	ND	ND
II-8	40	Early childhood	20/63, 20/63	Sensory	+	30	+	Limb girdle weakness	-	Unremarkable	No	Lipid accumulation, RRFs/CO X	Yes	No
II-9	38	-	-	Sensory motor	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
II-11	34	Early childhood	20/32, 20/32	ND	+	20	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
II-12	26	Early childhood	?	Sensory	+	10	-	-	-	Unremarkable	ND	ND	ND	ND
III-7	19	Early childhood	20/50, 20/50	ND	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
III-14	16	Early childhood	20/200, 20/200	ND	-	-	-	-	Learning difficulties	Unremarkable	No	Non-specific	No	No
III-15	14	8	20/200, 20/200	ND	-	-	-	-	Learning difficulties	Unremarkable	ND	ND	ND	ND
III-16	6	-	-	ND	-	1,5	-	-	Psychomotor					

Figure 27 : Présentation de la famille avec mutation MFN2D210V (Rouzier et al., 2012).

A. Arbre généalogique de la famille (Rouzier et al., 2012) :

Cas index = patiente I-1 (flèche rouge). Les fibroblastes des patients II-5 et II-8 sont utilisés dans cette étude (flèches noires) ; la patiente présente des signes neuromusculaires avec une atrophie optique et des délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle ; elle a eu 13 enfants dont 6 présentent une atrophie optique bilatérale. Les fibroblastes de peau des patients II-5 et II-8 sont utilisés pour notre étude. La maladie s'est déclarée précocement pour les deux patients, ils présentent également une atrophie optique et des signes neuromusculaires.

B. Résumé des signes cliniques et des résultats obtenus à partir des biopsies musculaires des patients atteints (MFN2^{D210V}) (Rouzier et al., 2012).

COX = cytochrome c oxydase ; mtDNA = ADN mitochondrial ; ND = non déterminé ; OXPHOS = phosphorylation oxydative ; RRFs = ragged-red fibres ou fibres rouges déchiquetées ; SDH = succinate déshydrogénase ; ? = inconnu.

1. 2. La mutation p.A166T est associée à un phénotype CMT2A « classique ».

Grâce à une collaboration avec le Pr. Vincent Procaccio au CHU d'Angers, nous avons pu obtenir les fibroblastes d'un patient porteur de la mutation c.496G>A (p.A166T). Ce jeune homme est actuellement âgé de 17 ans. Une première consultation à l'âge de 8 ans notait des troubles de la marche, ayant débuté 2 ans plus tôt. L'examen retrouvait un déficit moteur prédominant sur les releveurs des membres inférieurs avec un steppage bilatéral. L'EMG était en faveur d'un CMT et objectivait une atteinte polyneuropathique, sensitivo-motrice à prédominance axonale. Le patient n'a pas bénéficié d'une biopsie musculaire. L'analyse moléculaire confirmait le diagnostic en identifiant la mutation c.496G>A (p.A166T), à l'état hétérozygote, dans le gène *MFN2*. La mère et la grand-mère maternelle du patient étaient également atteintes.

2. Analyse comparative des fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} et *MFN2*^{A166T/+}.

2.1. Analyse de la chaîne respiratoire.

Les résultats obtenus sur les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} de 2 patients issus de la grande famille (II-5 et II-8) montraient un déficit en CIV de la chaîne respiratoire (Tableau 3A) (Rouzier et al., 2012). L'analyse en polarographie n'avait pas permis de mettre en évidence d'anomalie de la respiration (Tableau 3A). Les fibroblastes du patient porteur de la mutation *MFN2*^{A166T/+} ne présentent pas de déficit de la chaîne respiratoire et pas d'anomalie de la respiration (Tableau 3A). Les mêmes expériences ont ensuite été réalisées sur les fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} dans un milieu sans glucose, en présence de galactose. Le galactose est une source de carbone qui alimente la glycolyse avec une faible efficacité. Par conséquent, les cellules sont obligées de compter principalement sur la CR pour la production d'ATP. Ce milieu permet de « démasquer » des déficits de la CR compensés en milieu « classique » (Robinson et al., 1992). Nous n'avons retrouvé aucune anomalie par spectroscopie et polarographie dans les fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} en milieu galactose (Tableau 3B). Ce résultat indique que la CR est fonctionnelle dans ces cellules contrairement à ce qui est observé dans les fibroblastes porteurs de la mutation *MFN2*^{D210V/+} (p.D210V).

A

ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE						
FIBROBLASTES CULTIVÉS EN MILIEU GLUCOSE						
Complexes de la chaîne respiratoire	I	II	III	IV	V	CS
Normes (nmol/min/mg de protéines)	9,0-27,1	18,5-54,0	57,4-176,2	109,9-350,0	22,0-46,2	74,7-161,1
Patient II-5 (MFN2 ^{D210V})	17,2	26,2	87,7	45,8	24,3	85,7
Patient II-8 (MFN2 ^{D210V})	15,9	22,9	196,9	57,9	27,2	118,1
Patient (MFN2 ^{A166T})	17,3	38,4	158,4	278,1	42,9	153,2

OXYGRAPHIE				
FIBROBLASTES CULTIVÉS EN MILIEU GLUCOSE				
Conditions	Cellules intactes	Cellules perméabilisées avec de la Digitonine		
		Glutamate +Malate	Succinate	G3P
Normes (nmol O ₂ /min/mg de protéines)	5,90-13,80	8,00-16,60	8,00-15,80	4,90-13,50
Patient II-5 (MFN2 ^{D210V})	19,59	18,66	22,20	16,97
Patient II-8 (MFN2 ^{D210V})	17,62	15,52	19,39	15,86
Patient (MFN2 ^{A166T})	8,26	9,49	10,10	8,26

B

ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE						
FIBROBLASTES CULTIVÉS EN MILIEU GALACTOSE						
Complexes de la chaîne respiratoire	I	II	III	IV	V	CS
Normes (nmol/min/mg de protéines)	15,2-20,1	28,2-48,0	88,8-143,0	181,7-315,4	22,7-47,5	124,8-225,0
Patient (MFN2 ^{A166T})	20,0	47,6	142,3	262,6	34,2	161,8

OXYGRAPHIE				
FIBROBLASTES CULTIVÉS EN MILIEU GALACTOSE				
Conditions	Cellules intactes	Cellules perméabilisées avec de la Digitonine		
		Glutamate +Malate	Succinate	G3P
Normes (nmol O ₂ /min/mg de protéines)	5,58-17,44	8,16-13,45	8,60-10,97	5,22-12,91
Patient (MFN2 ^{A166T})	14,85	11,58	10,57	8,98

Tableau 3 : Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

A : Analyse à partir de fibroblastes cultivés en milieu contenant du glucose. Mesure de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par spectrophotométrie. Mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie.

B : Analyse à partir de fibroblastes MFN2^{A166T} cultivés en milieu contenant du galactose (150µM) et déplété en glucose. Mesure de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par spectrophotométrie. Mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie.

I,II,III,IV,V= les cinq complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale; **CS** = citrate synthase; **G3P** = glycérol 3-phosphate.

2.2 Analyse ultrastructurale des mitochondries.

Nous avons analysé la morphologie des mitochondries des différents fibroblastes par microscopie électronique. Les mitochondries des fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} sont comparables à celles des fibroblastes *MFN2*^{D210V/+}. Dans les 2 cas, les mitochondries apparaissent plus petites, plus rondes avec peu de crêtes mitochondriales qui sont par ailleurs anormales dans la majorité des cas (Figure 28). Nous avons mesuré la longueur, la largeur, le périmètre et l'aire des mitochondries des cellules de patients par comparaison à celles de cellules contrôles. Quelque soit la mutation du gène *MFN2*, il y a une baisse significative de l'ensemble des paramètres mesurés dans les fibroblastes des patients avec des mitochondries environ 2 fois plus petites chez les patients par rapport aux contrôles (Figure 29).

Figure 28 : Analyse de l'ultrastructure mitochondriale dans les fibroblastes des patients en microscopie électronique.

Fibroblastes contrôles (Contrôle 1 et Contrôle 2) : mitochondries allongées, normales.

Fibroblastes patients II-5 et II-8 (MFN2^{D210V}), patient MFN2^{A166T} : présence de mitochondries de petites tailles, rondes
Barre d'échelle = 2 µm

A

	Contrôle 1	Contrôle 2	Patient II-5 (MFN2 ^{D210V})	Patient II-8 (MFN2 ^{D210V})	Patient (MFN2 ^{A166T})
Longueur (µm)	4,00	3,20	1,36	1,48	1,27
Largeur (µm)	0,82	0,79	0,41	0,46	0,36
Périmètre (µm)	9,32	7,72	3,21	3,47	2,89
Surface (µm ²)	1,48	1,10	0,33	0,43	0,29

B

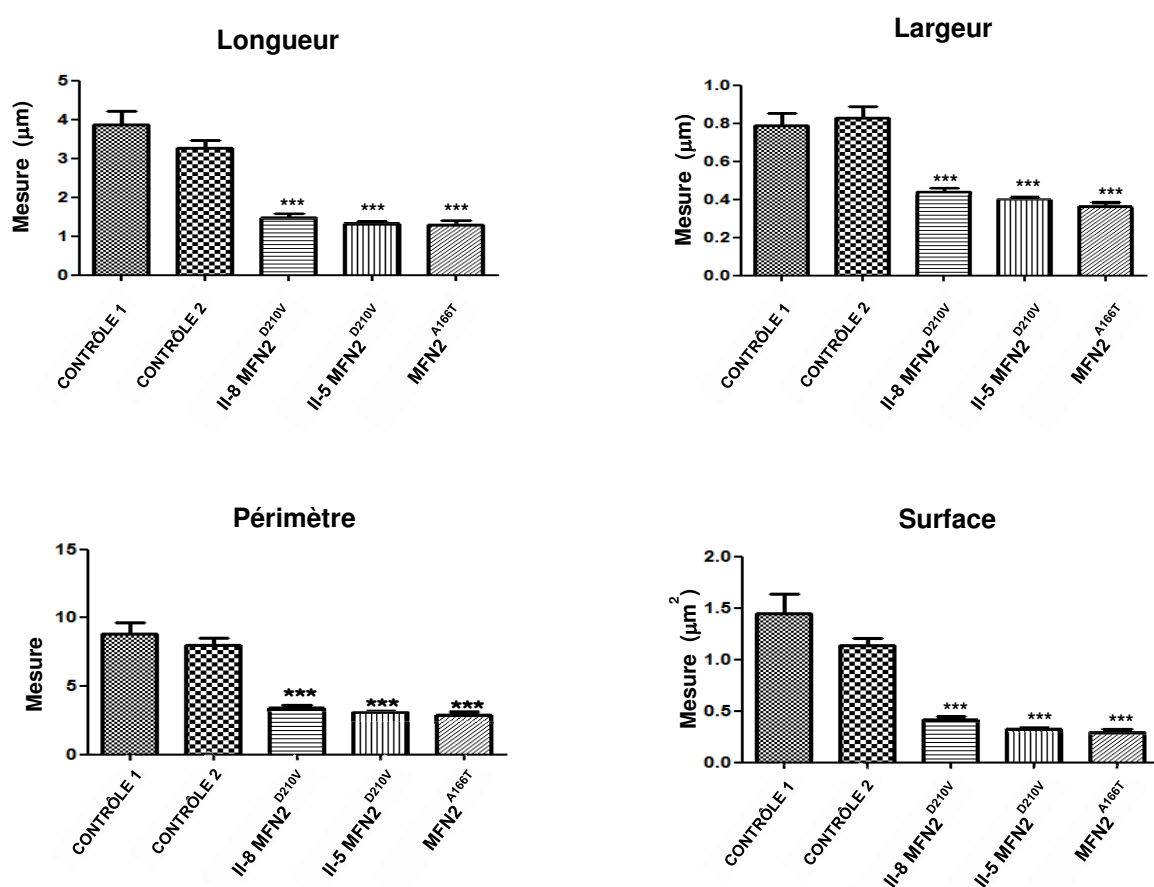


Figure 29 : Analyse des images de microscopie électronique.

A. Mesures de la longueur, largeur, périmètre et surface des mitochondries observées en microscopie électronique. Moyenne des mitochondries sur dix cellules minimum (moyenne de deux expériences indépendantes, n=2).

B. Représentation graphique des mesures rapportées dans le tableau A. Etude statistique suivant le test-t de student entre les fibroblastes contrôles vs patients (extrêmement significatif : *** $P < 0.001$)

2.3. Analyse du réseau mitochondrial.

L'analyse du réseau mitochondrial dans les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} avait initialement été réalisée par Arnaud Chevrollier qui avait retrouvé une fragmentation significative par rapport à des fibroblastes contrôles (Rouzier et al., 2012). J'ai confirmé ces résultats en analysant, en parallèle, les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+}, *MFN2*^{A166T/+} et *MFN2*^{+/+}. J'ai mesuré la longueur du réseau après un marquage au Mitotracker® Red et une analyse en microscopie confocale. L'analyse quantitative a été réalisée grâce au logiciel Huygens Essential Software™ (Scientific Volume Imaging). Les résultats montrent une fragmentation significative du réseau mitochondrial pour tous les fibroblastes porteurs d'une mutation *MFN2* par rapport aux cellules contrôles (Figure 30). Aucune différence entre les mutations p.D210V et p.A166T n'a été observée.

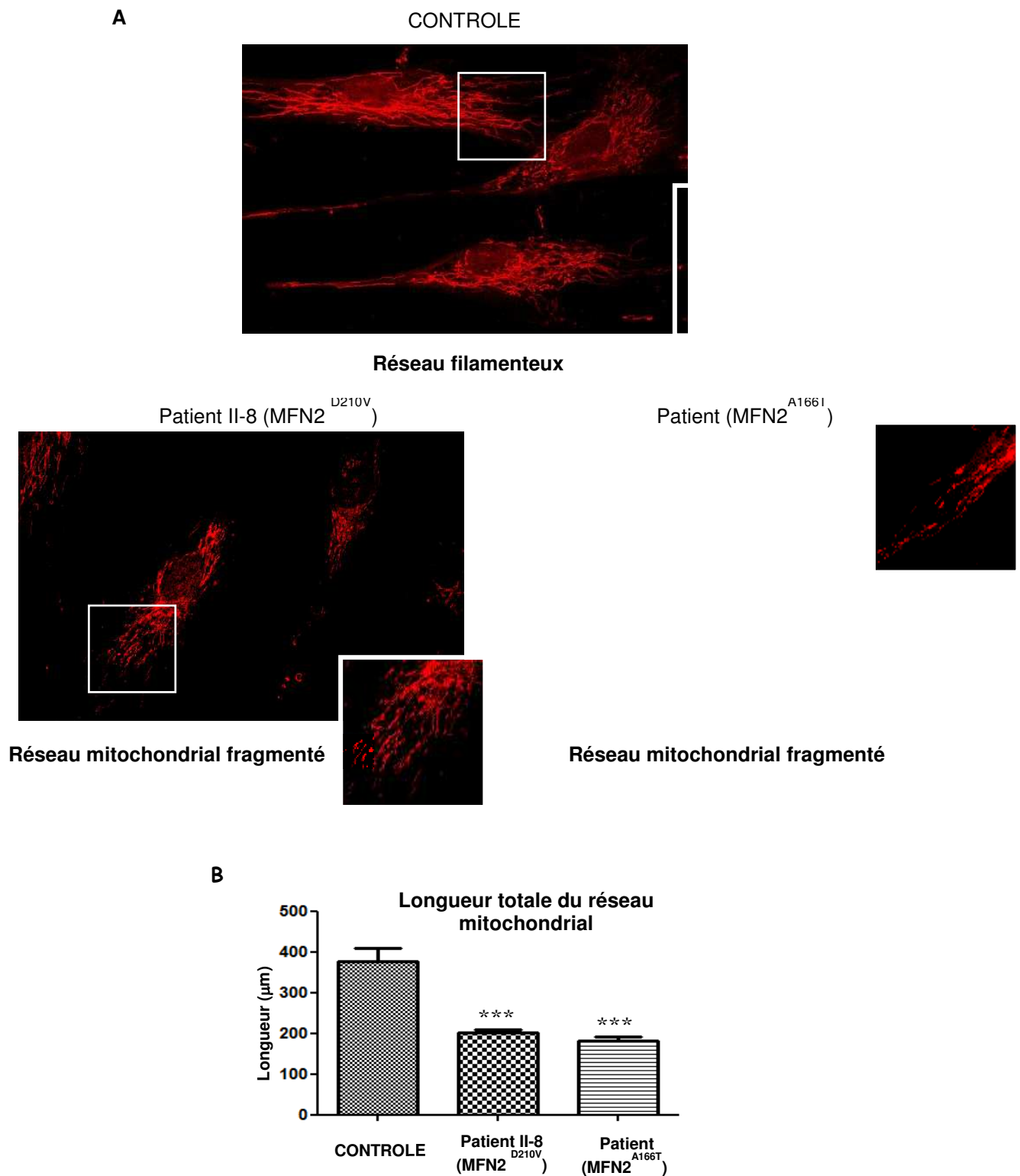


Figure 30 : Analyse du réseau mitochondrial à partir des fibroblastes des patients.

A: Le réseau mitochondrial des fibroblastes contrôles, du patient II-8 (MFN2^{D210V}) ou du patient (MFN2^{A166I}) a été analysé par microscopie confocale après un marquage au MitoTracker® Red. Les photographies du réseau ont été prises en microscopie confocale (Objectif x 63 immersion).

B: La longueur du réseau mitochondrial observé en microscopie confocale (**A**) a été quantifiée pour chaque patient sur 45 cellules prises au hasard. Le calcul de la longueur totale du réseau mitochondrial par cellule a été réalisé à l'aide du logiciel Huygens Essential SoftwareTM (moyenne de deux expériences indépendantes). Etude statistique suivant le test-t de student entre les fibroblastes contrôles vs patients (extrêmement significatif : *** $P < 0.001$).

2.4. Analyse de l'ADN mitochondrial.

- Recherche de délétions et détermination du nombre de copies d'ADNmt.

Des délétions multiples avaient été détectées par PCR « grands fragments » dans le muscle des patients porteurs de la mutation $MFN2^{D210V/+}$ et ce résultat avait été confirmé par Southern blot (Rouzier et al., 2012). L'analyse des fibroblastes $MFN2^{D210V/+}$ et $MFN2^{A166T/+}$ n'a pas retrouvé de délétions de l'ADNmt (Figure 31A). Par ailleurs, le nombre de copies d'ADNmt n'était pas diminué dans ces cellules par rapport à des fibroblastes contrôles (Figure 31B).

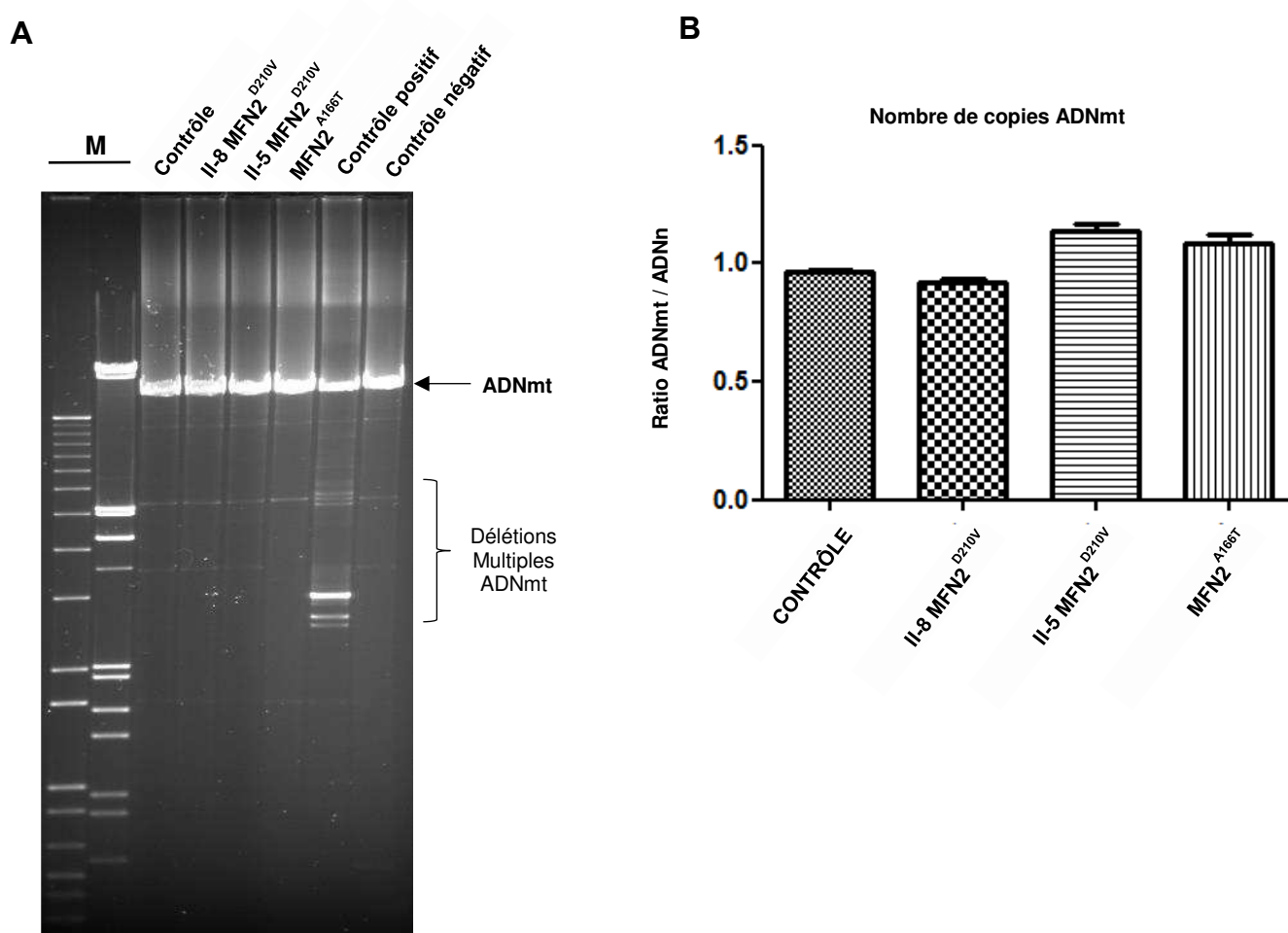


Figure 31 : Analyse de l'ADNmt.

A. Recherche des délétions multiples de l'ADNmt par PCR grands fragments (XL-PCR) à partir d'ADN génomique extrait des fibroblastes de patients. Contrôle positif : ADN génomique extrait de biopsie musculaire de patient avec délétions multiples de l'ADNmt. Contrôle négatif : ADN génomique extrait de biopsie musculaire de patient sans délétions multiples de l'ADNmt.

Nombre de copies de l'ADNmt par qPCR. Moyenne de 4 expériences indépendantes en duplicat. ADNn = ADN nucléaire. M = marqueur ADN 1kb (à gauche) et marqueur d'ADN lambda HindIII/EcoRI (à droite)

- **Analyse des nucléoïdes.**

Afin de savoir si l'instabilité de l'ADNmt observée dans le muscle des patients porteurs de la mutation p.D210V pouvait être associée à une désorganisation des nucléoïdes, j'ai quantifié leur nombre et mesuré leur taille dans les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} ainsi que dans les cellules *MFN2*^{A166T/+} et *MFN2*^{+/+}. Les nucléoïdes ont été marqués avec un anticorps anti-DNA ou avec un anticorps anti-TFAM (facteur de transcription mitochondrial A), une protéine constitutive de ces complexes nucléoprotéiques. Les résultats obtenus sont identiques pour les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} et *MFN2*^{A166T/+} qui présentent une diminution du nombre et une augmentation de la taille des nucléoïdes par rapport aux cellules contrôles (Figure 32). Ces résultats ont été confirmés par expression transitoire des mutations p.A166T et p.D210V dans des cellules HeLa. J'ai retrouvé une réduction du nombre et une augmentation de la taille des nucléoïdes dans les cellules transfectées exprimant les 2 mutants par comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur vide (données non présentées).

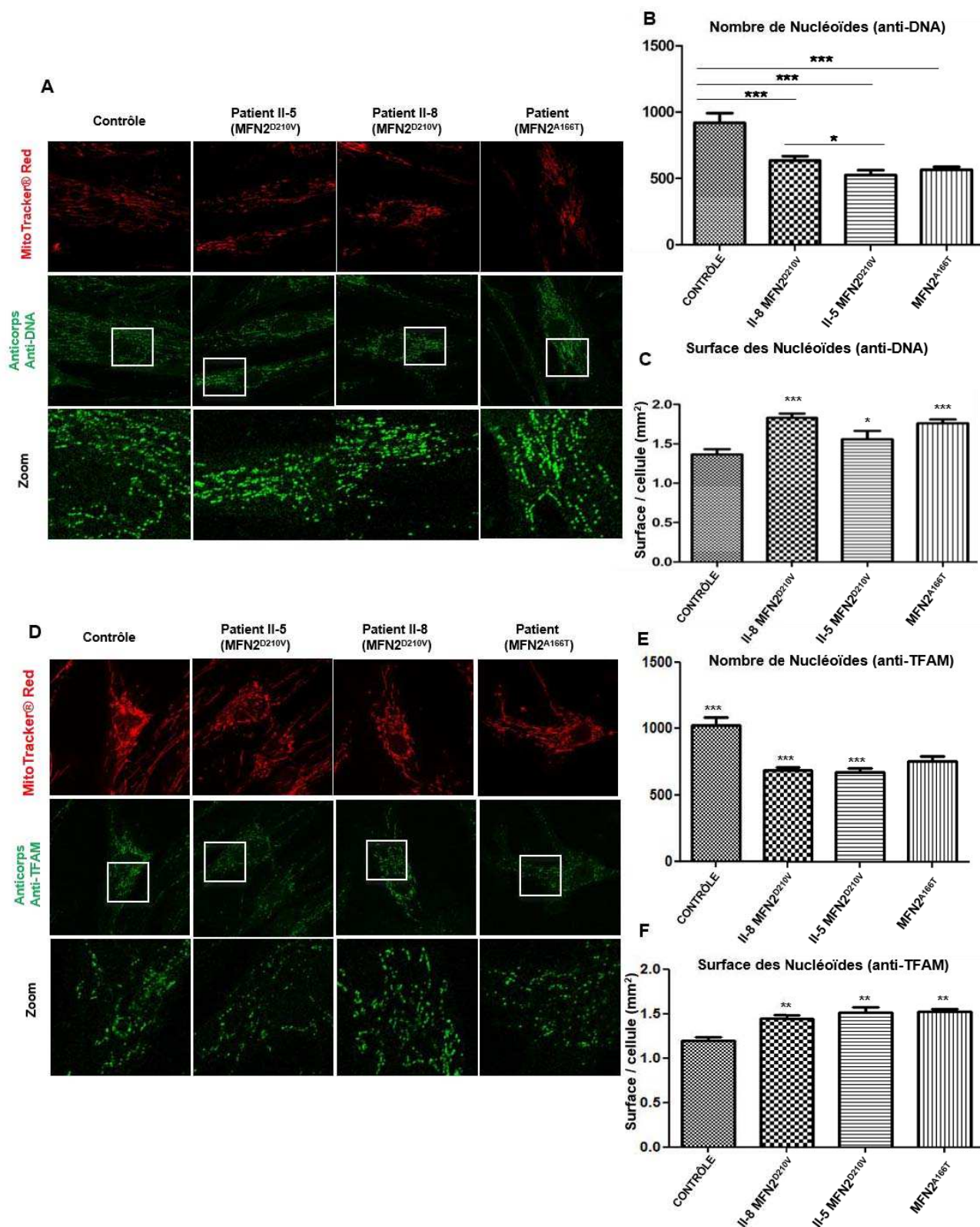


Figure 32 : Analyse de la stabilité de l'ADNmt : étude des nucléïdes mitochondriaux.

Analyse du nombre (B, E) et de la surface (C, F) des nucléïdes par immunofluorescence après marquage avec un anticorps anti-DNA (A-C) ou un anti-TFAM (D-F). Le réseau mitochondrial est visualisé après marquage au MitoTracker® Red. Les images sont analysées avec le logiciel Huygens. Pour chaque expérience 45 cellules par condition sont analysées. Etude statistique suivant le test-t de student à partir de 2 expériences indépendantes : significatif ($0.05 > P > 0.01$), très significatif ($0.01 > P > 0.001$) ou extrêmement significatif ($***P < 0.001$).

- **Réparation de l'ADNmt après stress oxydatif.**

Nous avons montré que les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} présentaient également un défaut de réparation de l'ADNmt suite à un stress oxydatif induit par un traitement H₂O₂ (Figure 33B) (Rouzier et al., 2012). Afin de déterminer si la mutation *MFN2*^{A166T/+}, qui a effet sur le réseau mitochondrial et le nombre de nucléoïdes peut induire un défaut de réparation de l'ADNmt, nous avons analysé la cinétique de réparation de l'ADNmt suite à des dommages causés par un stress oxydatif, secondaire à un traitement par H₂O₂. *MFN2*^{A166T/+}. Les dommages à l'ADN ont été mesurés par PCR « grands fragments » semi-quantitative. La réparation de l'ADNmt dans les fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} est retardée par rapport à celle des fibroblastes contrôles (Figure 33A).

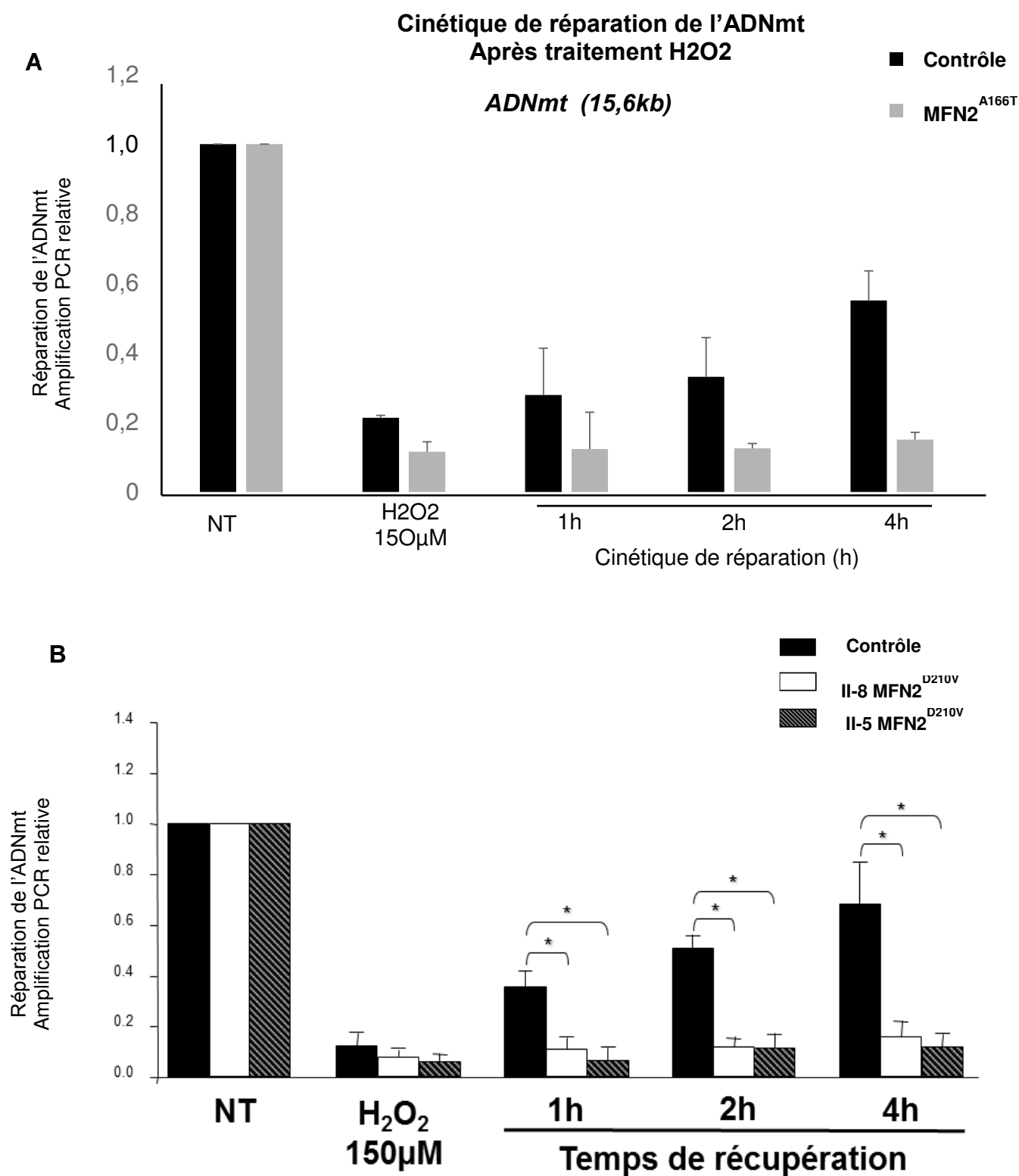


Figure 33 : Cinétique de réparation de l'ADNmt après traitement H₂O₂.

A. PCR-semi quantitative à partir d'ADN génomique extrait des fibroblastes non traités (NT), après traitement de 30min par H₂O₂ à 150mM et cinétique de réparation à 1h, 2h, ou 4h. Les dommages à l'ADNmt sont quantifiés par PCR grand fragment (15,6kb) normalisé par la quantification d'un fragment PCR ADNmt de petite taille (172pb). Moyenne de 3 expériences en triplicat.

B. Même expérience faite sur les fibroblastes des patients II-8 MFN2^{D210V} et II-5 MFN2^{D210V} (Rouzier et al., 2012).

2.5. Analyse de la fusion mitochondriale.

Les mutations p.A166T et p.D210V se situent toutes les deux dans le domaine d'activité GTPase de MFN2, nécessaire à la fusion mitochondriale. Nous avons voulu savoir si l'expression des 2 allèles *MFN2*^{A166T} et *MFN2*^{D210V} pouvaient entraîner un défaut de fusion dans les fibroblastes des patients. Mes résultats montrent un défaut de fusion dans les fibroblastes des patients portant la mutation p.D210V mais pas dans ceux du patient exprimant l'allèle *MFN2*^{A166T/+} qui se comportent comme les cellules contrôles (Figure 34). Le défaut de fusion observé pour la mutation p.D210V pourrait expliquer l'instabilité observée au niveau du muscle des patients et également la différence de phénotype associé à ces 2 mutants.

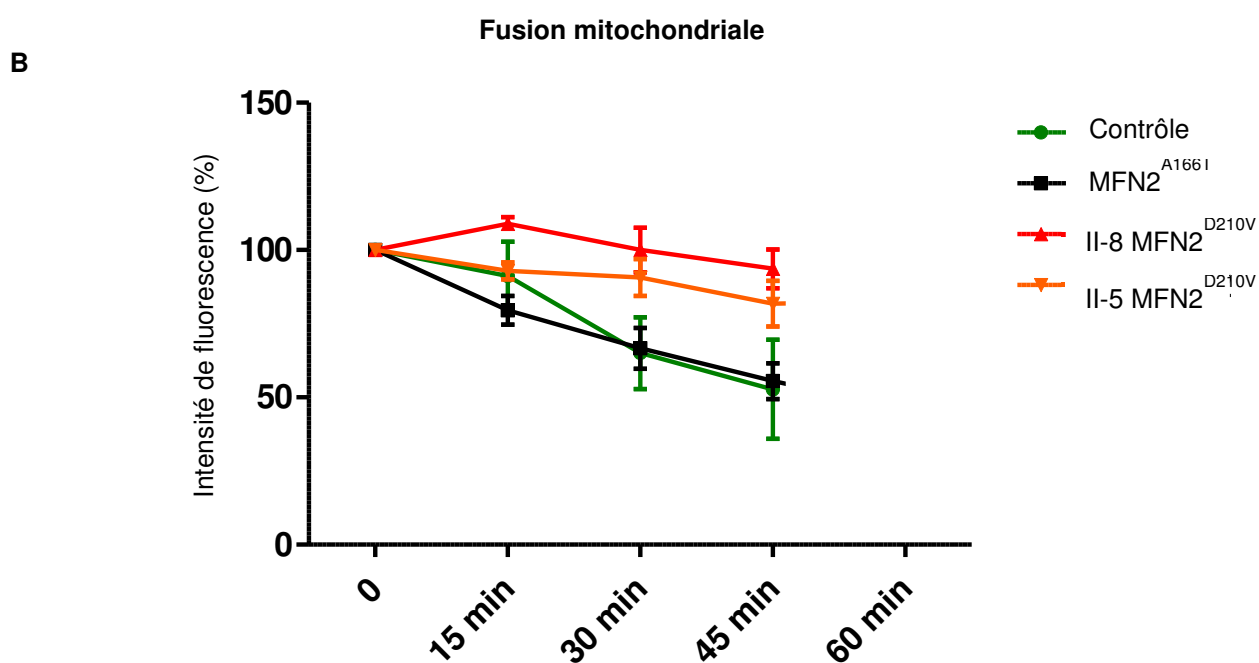
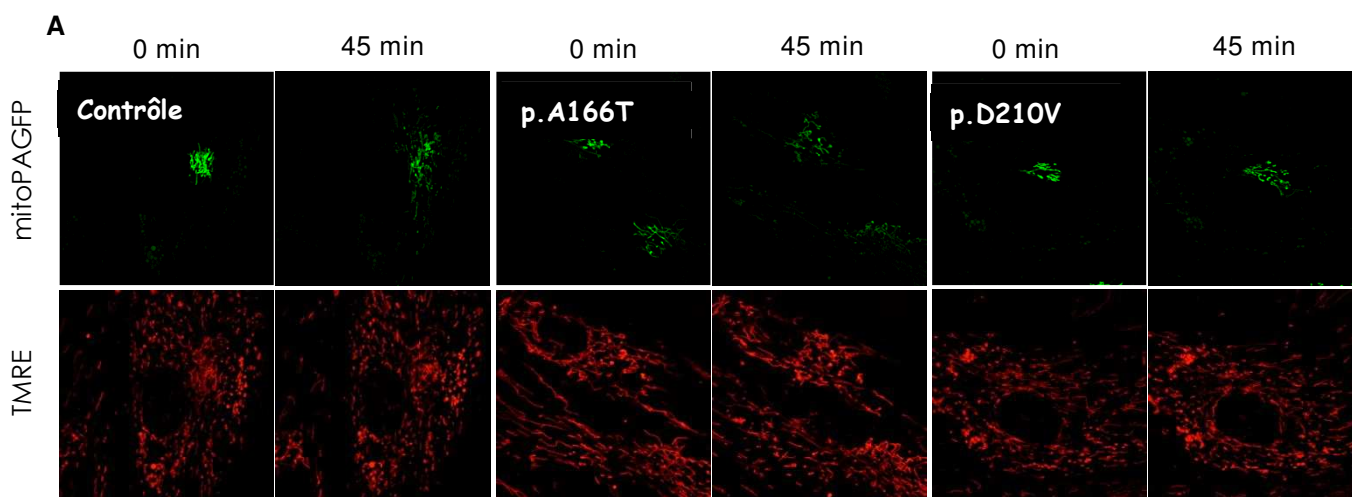


Figure 34 : Analyse de la fusion mitochondriale.

Les fibroblastes contrôles et patients ont été transduits de façon à exprimer une GFP mitochondriale photoactivable (mito-PA-GFP). Après activation, la diffusion du signal est mesurée après 15, 30, 45 min.

- A. Images obtenues en microscopie confocale. Le réseau mitochondrial est visualisé grâce à un marquage au TMRE.
- B. Représentation graphique de l'intensité du signal GFP quantifié par le logiciel NIH ImageJ.

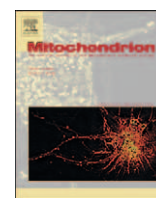
Partie 2 : L'inactivation du gène PIF1 dans un modèle murin entraîne une myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt.

Une partie de ma thèse a consisté à étudier un modèle murin dans lequel le gène *pif1*, codant pour une hélicase mitochondriale a été inactivé. Il existe 5 hélicases mitochondriales qui jouent un rôle fondamental dans le métabolisme de l'ADNmt : Twinkle, Dna2, Pif1, Suv-3 et YB-1. Des mutations dans les gènes codant pour les hélicases mitochondriales Twinkle et DNA2 entraînent une atteinte à type de myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt aussi bien dans des modèles murins que chez l'homme ((De Souza-Pinto et al., 2010) ; (Ronchi et al., 2013b)). Différentes études concernant la localisation subcellulaire de ces hélicases ont été réalisées d'autant que certaines jouent aussi un rôle dans le noyau. Néanmoins, leur rôle spécifique dans la mitochondrie est encore peu caractérisé

Pif1 est une hélicase 5'-3' ATP dépendante de la super famille des hélicases 1B. Elle est très conservée et a été étudiée essentiellement chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chez l'homme, l'isoforme nucléaire de PIF1 inhibe la télomérase et le domaine hélicase de hPIF1 se lie préférentiellement sur des structures ADN qui miment des fourches de réplication bloquées ((George et al., 2009) ; (Zhang et al., 2006)). Comme chez l'homme, mPIF1 est exprimée uniquement dans des cellules en prolifération et interagit avec la télomérase dans des extraits de souris (Snow et al., 2007). Cependant, les souris dans lesquelles le gène *pif1* est inactivé sont viables et ne présentent pas de changement de la longueur des télomères, même après plusieurs générations, et pas de réarrangements chromosomiques (Snow et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la fonction télomérique de mPIF1 pourrait être redondante avec celle d'autres hélicases chez la souris.

Pour étudier le rôle de l'isoforme mitochondriale de PIF1, j'ai analysé les effets de l'inactivation de *Pif1* sur les fonctions mitochondriales dans un modèle murin. Les animaux *mPif1*^{-/-} (KO) développent une myopathie vers l'âge d'un an avec une perte d'endurance et de résistance à l'effort (diminution des capacités physiques par rapport aux souris contrôles). Nous avons retrouvé un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale (déficit du complexe I), et des anomalies de structure et d'organisation des fibres musculaires (présence de fibres nécrotiques, désorganisation des sarcomères et prolifération de mitochondries anormales) dans le muscle des souris KO. Mon travail a permis de montrer que ce phénotype de myopathie mitochondriale s'accompagne d'une accumulation de délétions de l'ADNmt dans le muscle des souris avec un défaut de réparation du génome mitochondrial suite à un stress oxydatif. Nous avons également montré que l'isoforme

mitochondriale de mPif1 interagit directement avec l'ADNmt expliquant l'effet sur la stabilité, le maintien et la réparation de ce dernier.



Inactivation of Pif1 helicase causes a mitochondrial myopathy in mice



Sylvie Bannwarth^{a,b}, Laetitia Berg-Alonso^a, Gaëlle Augé^{a,b}, Konstantina Fragaki^{a,b}, Jill E. Kolesar^c, Françoise Lespinasse^a, Sandra Lacas-Gervais^d, Fanny Burel-Vandenbos^e, Elodie Villa^f, Frances Belmonte^c, Jean-François Michiels^e, Jean-Ehrland Ricci^f, Romain Gherardi^g, Lea Harrington^h, Brett A. Kaufman^c, Véronique Paquis-Flucklinger^{a,b,*}

^a IRCAN, CNRS UMR 7284/INSERM U1081/UNS, Faculté de Médecine, Nice, France

^b Service de Génétique Médicale, Hôpital Archet 2, CHU de Nice, Nice, France

^c Department of Medicine, Center for Metabolism and Mitochondrial Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

^d Centre Commun de Microscopie Electronique Appliquée, Faculté des Sciences, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

^e Service de Neuropathologie, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, France

^f INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe “contrôle métabolique des morts cellulaires”, Nice Sophia-Antipolis University, France

^g INSERM U955, E10, Université Paris-Est, Créteil, France

^h Université de Montréal, Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, 2950 chemin de Polytechnique, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2015

Received in revised form 19 February 2016

Accepted 19 February 2016

Available online 24 February 2016

Keywords:

Pif1 helicase

mtDNA instability

Mitochondrial myopathy

Mitochondrial disease

ABSTRACT

Mutations in genes coding for mitochondrial helicases such as TWINKLE and DNA2 are involved in mitochondrial myopathies with mtDNA instability in both human and mouse. We show that inactivation of *Pif1*, a third member of the mitochondrial helicase family, causes a similar phenotype in mouse. *pif1*^{−/−} animals develop a mitochondrial myopathy with respiratory chain deficiency. *Pif1* inactivation is responsible for a deficiency to repair oxidative stress-induced mtDNA damage in mouse embryonic fibroblasts that is improved by complementation with mitochondrial isoform *mPif1*⁶⁷. These results open new perspectives for the exploration of patients with mtDNA instability disorders.

© 2016 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

The PIF1 helicase family is a group of 5′ → 3′ directed, ATP dependent, super family 1B helicases found in nearly all eukaryotes. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) *PIF1* was first identified as a gene whose mutation results in reduced recombination between the mitochondrial DNA (mtDNA) of rho[−] and rho⁺ strains (Foury and Kolodnyski, 1983). *ScPIF1* was rediscovered in a screen for mutations that affect telomeres (Lahaye et al., 1993). The nuclear *Pif1p* isoform is involved in numerous functions, including: inhibition of telomere addition to double strand breaks (DSBs), inhibition of telomerase with an enrichment of *ScPif1p*

at telomere ends and a negative regulation of telomere length by removing telomerase from telomeres, participation in resolving G-quadruplex structures, and Okazaki fragment maturation (Bochman et al., 2010; Li et al., 2014; Wilson et al., 2013; Zhou et al., 2000). The mitochondrial *PIF1* isoform plays an important role in mtDNA maintenance. *Scpif1* mutants lose their mtDNA, especially at high temperatures, and are defective in mtDNA repair. *Pif1p* binds to mtDNA and may prevent accumulation of oxidative DNA damage in mtDNA (de Souza-Pinto et al., 2010). Both mitochondrial and nuclear isoforms are expressed from the single *ScPIF1* open reading frame but use different translational start sites with a mitochondrial targeting signal (MTS) being located between the first and the second translational start site.

PIF1 is also found both in the nucleus and mitochondria of human cells (Futami et al., 2007; Kazak et al., 2013). The hPIF1 nuclear isoform inhibits telomerase, and the helicase domain of hPIF1 preferentially binds and unwinds DNA structures that mimic stalled replication forks (George et al., 2009; Zhang et al., 2006). Furthermore, *PIF1* is a highly active evolutionarily conserved, G-quadruplex helicase (Paeschke et al., 2013; Sanders, 2010). As in human, *mPIF1* is found only in proliferating cells and interacts with telomerase in mouse extracts, suggesting that *mPIF1* would affect telomeres (Snow et al., 2007). However, the *pif1* knockout (KO) mice are viable, with no change in telomere length,

Abbreviations: COX, cytochrome c oxidase; SDH, succinate dehydrogenase; NADH-TR, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase tetrazolium reductase; mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation; LX-PCR, long extension-PCR; *mPIF1*⁶⁷, mitochondrial *PIF1* isoform; MEF, mouse embryonic fibroblast; MMS, methyl methanesulfonate; mtDIP-PCR, mtDNA immunoprecipitation PCR; KO, Knock-out; DATI, downstream alternative translation initiation; TBHP, Tert-butyl hydroperoxide; NAC, N-acetylcysteine; ROS, reactive oxygen species; PEO, progressive external ophthalmoplegia; CI, complex I; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; nDNA, nuclear DNA.

* Corresponding author at: IRCAN UMR7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, 28 av de Valombrose, 06107 Nice cedex 2, France.

E-mail address: paquis@hermes.unice.fr (V. Paquis-Flucklinger).

even after several generations, and no gross chromosomal rearrangements (Snow et al., 2007). These results suggest that PIF1 telomere function could be redundant with that of other helicase in mice. Nevertheless, the mitochondrial functions of PIF1 in mouse and human are currently not characterized.

In this study, we examined the phenotype of *pif1*^{−/−} mice in order to analyze the consequences of *PIF1* inactivation on mitochondrial functions. Knockout animals develop mitochondrial myopathy with respiratory chain deficiency and a low amount of mtDNA deletions after 1 year of age. Furthermore, we show that mPIF1 associates with mtDNA and increases recovery from oxidative damage. These findings strongly support a role for PIF1 in mtDNA maintenance *in vivo*.

2. Material and methods

2.1. Generation of *pif1*^{−/−} mice

A targeting construct was designed to delete a region of mPIF1 that spanned the first five conserved helicase motifs of *mPif1* as described by Snow and colleagues (Snow et al., 2007). Chimeric and founder mice were generated and the complete absence of the *mPif1* transcript was shown by Northern analysis of *mPif1* MEFs (Snow et al., 2007).

2.2. Histopathology and ultrastructure

Muscle samples were frozen in cooled isopentane and stored in liquid nitrogen for histological and histochemical analysis including Gomori modified trichrome staining, cytochrome *c* oxydase (COX) activity, succinate dehydrogenase (SDH) activity and double COX/SDH staining, and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase tetrazolium reductase staining (NADH-TR) according to standard protocols. For transmission electron microscopy analysis, muscles and hearts were dissected and rapidly fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, rinsed in the same buffer, post-fixed for 1 h in 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer to enhance the staining of membranes. Tissues were rinsed in distilled water, dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope mounted with a Morada Olympus CCD camera. At least three animals per group were analyzed.

2.3. Voluntary exercise

Hamster-sized metal cages wheels (diameter 24 cm) with digital magnetic counters (Intellibio) were placed into 37 × 20 × 16 cm cages to measure the voluntary daily running distance for 2 weeks. Six *pif1*^{−/−} mice with six littermates at 14 months of age and six *pif1*^{−/−} mice with six littermates at 3 months of age were tested (three males and three females in each group).

2.4. OXPHOS spectrophotometric measurements

Enzymatic spectrophotometric measurements of the OXPHOS respiratory chain complexes and citrate synthase were performed at 37 °C on tissue homogenates according to standard procedures (Rustin et al., 1994). Proteins were measured according to Bradford microassay (Bradford, 1976) and results were expressed as nmol/min/mg of proteins normalized to citrate synthase activity.

2.5. Long extension PCR (LX-PCR) and Southern blot for detection of mtDNA deletions

LX-PCR was performed with Expand long template PCR system (Roche Applied Science). Reaction mixtures contained 200 ng of template genomic DNA, 5 µl Buffer 3, 1 mM dXTP (Roche Applied Science), 200 ng primers and 3.75 Units of mix Taq Polymerase. Primers sequence

are listed in Supplementary Table 1 (Edgar et al., 2009). The PCR program used for amplification of the 12.8 kb mouse mtDNA fragment was: 95 °C 5 min, followed by 20 cycles (10 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, 13 min at 68 °C), followed by 10 cycles (10 s at 95 °C, 30 s at 62 °C, 13 min + 20 s per cycle at 68 °C), with a final extension of 5 min at 68 °C. PCR products were loaded on a 0.8% agarose gel and migrated 7 h at 130 V. Southern blots were performed as previously described (Tyynismaa et al., 2004). 5 µg of genomic DNA was digested with *AfeI* endonuclease, electrophoresed on 0.8% agarose gel and transferred to Hybond N+ membrane (Roche Applied Science). Blots were hybridized with a probe obtained by PCR amplification of mouse mtDNA (primers spanning positions 15,809–15,810, Supplementary Table 1) and labeled using digoxigenin random priming method (Roche Applied Science).

2.6. mtDNA quantification

The mouse mtDNA content was determined by real-time PCR using TaqMan probes, specific for mitochondrial 12S rRNA. Nuclear gene used for normalization was mouse *GAPDH*. Mitochondrial 12S rRNA and nuclear *GAPDH* genes were individually amplified by real-time PCR using primers m12S-F/m12S-R and those from mouse *GAPDH* gene expression assay kit (Applied Biosystems) with corresponding TaqMan probes (Supplementary Table 1). The real-time PCR reaction was performed 3 times, in duplicate for each reaction. PCR reaction mixture (20 µl) contained 20 ng of genomic DNA, 1X LightCycler 480 probes master mix (Roche Applied Science), 1 µl of *GAPDH* gene expression assay kit (Life Technologies) or 0.3 nM of each primer and 6 µM of each probe. The PCR amplification, performed in the LightCycler LC480 apparatus, consisted of a single denaturation–enzyme activation step for 10 min at 95 °C, followed by 45 amplification cycles of 15 s at 95 °C, 40 s at 60 °C. A single acquisition was done at the end of each annealing step, and data were analyzed using LightCycler software version 1.5.0.39 (Roche Applied Science). The ratio of mtDNA amplicon to nuclear DNA amplicon was used as a measure of mtDNA content in each specimen.

2.7. Somatic mtDNA mutations

Total DNA was extracted from the muscles and heart of three *pif1*^{−/−} mice with three littermates at 14 months of age and of three *pif1*^{−/−} mice with three littermates at 3 months of age. The somatic mtDNA mutation load was determined by targeted next-generation sequencing (NGS) with Ion PGM System (Ion Torrent). Whole mtDNA was amplified from 80 ng of genomic DNA, using the Roche Expand Long Template Kit (Roche Applied Science), in one LX-PCR amplicon, as previously described. Primers sequence are listed in Supplementary Table 1 (Edgar et al., 2009). Library preparations were performed following the manufacturer's instructions (Ion Xpress plus Fragment Library kit, Life Technologies) for 200 bp single-end reads. Emulsion PCR was performed on pooled libraries (Ion One Touch 200 Template Kit v2; Life Technologies). Samples were prepared according to the instructions provided with Ion PGM 200 Sequencing Kit (Life Technologies) protocol. Six pooled samples were loaded on an Ion 314 chip.

2.8. RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA from tissues was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies) and purified with PureLink RNA kit (Life Technologies). Prior to reverse transcription, residual genomic DNA was removed from total RNA with DNase I (Life Technologies). cDNA was then reverse-transcribed using transcription first strand cDNA synthesis kit (Roche Applied Science) with 1 µg total RNA and oligo-dT as primer. All PCR were performed in triplicate. Quantitative RT-PCR was carried out using SYBR Green master mix (Roche Applied Science) on a LightCycler LC480. Results were normalized to *OAZ1* or *HPRT*. Primer sequences are shown in Supplementary Table 1.

2.9. Plasmid construction

Coding sequence of the mitochondrial PIF1 isoform (*mPIF1*⁶⁷) was cloned into pBABE after amplification by PCR and enzyme-mediated recombination according to the manufacturer (Life Technologies). To generate pEGFP-N1-*mPif1*⁶⁷ (*mPIF1*⁶⁷-EGFP) construct, the ORF was amplified by PCR from the pBABE plasmid with primers containing terminal restriction sites (Kazak et al., 2013). The resulting PCR product was digested and ligated into the *XhoI*-AgeI sites of pEGFP-N1. Primers used are listed in Supplementary Table 1. Constructs were verified by sequencing.

2.10. Cell culture

HeLa cells were maintained in Dulbecco-modified Eagle medium (DMEM) (GE Healthcare) supplemented with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (0.1 mg/ml), 10% fetal calf serum (FCS) (GE Healthcare), at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. For transient transfections, cells were seeded onto 100-mm-diameter culture sterile dishes. At 60–80% confluence, cells were transfected using a standard calcium-phosphate procedure as previously described (Neyton et al., 2004). After a 24 h-period, transfected cells were harvested for mtDIP-PCR, western blot or confocal microscopy analyses.

Primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared by mincing 14.5-day-old embryos of C57Bl/6J or *pif1*^{−/−} mice, treating them with trypsin, and plating in DMEM supplemented with 10% FCS. Cells were maintained in DMEM supplemented with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (0.1 mg/ml), 10% FCS, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air.

2.11. immortalization of primary MEFs

pif1^{+/+} and *pif1*^{−/−} primary MEF cells were plated in 100-mm dishes in DMEM, 10% fetal bovine serum/fetal calf serum (FBS/FCS) and allowed to grow to approximately 70% confluence. Cell lines PA317 hTERT and PA317 E7/TEL were each plated in 100-mm dishes and allowed to grow to confluence in DMEM, 10% FBS/FCS (Morales et al., 1999). On the day of immortalization, virus-containing medium from each plate was filtered through a 0.45 µm filter, combined and 4 µg/ml polybrene added. MEFs were washed once with PBS, and immortalized by adding virus-containing medium with polybrene followed by overnight incubation. After 16 h, cells were washed once with PBS and fresh medium added (no virus). Cells were passaged alongside non-immortalized MEFs and compared for senescence. Only immortalized cells grew beyond three serial passages.

2.12. Transduction of immortalized primary *pif1*^{+/+} and *pif1*^{−/−} MEFs

Packaging cells were plated into three separate 100-mm dishes and allowed to grow to approximately 70% confluence. On day 1, Turbofect (Thermo Scientific) and serum-free medium were used according to manufacturers' directions to transiently transfect one plate each with 3 µg vector DNA containing pBABE-puro or pBABE-*mPIF1*⁶⁷. Cells were incubated overnight and medium changed on day 2. On day 3, virus-containing medium from plate dishes was filtered through a 0.45 µm filter and 4 µg/ml polybrene added. Primary MEF target cells (40% confluent) were washed once with PBS, and viral supernatant with polybrene added and incubated overnight. Medium was changed on day 4, and on day 5, fresh medium with 2 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich) was added. Cells were passaged as necessary under puromycin selection to establish the cell lines for subsequent experiments.

2.13. Isolation of mitochondria and western blot analysis

Mitochondria were isolated from HeLa cells using Q-Proteome mitochondria isolation kit (Qiagen) as described by the manufacturer. Proteinase K treatment was performed as previously described

(Bannwarth et al., 2012). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting were performed using standard protocols. Samples were immunoblotted with mouse monoclonal anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-MFN2 (outer mitochondrial membrane protein, Abcam), and rabbit polyclonal anti-SMAC (mitochondrial intermembrane space protein, Abcam). The cytosolic rabbit polyclonal anti-GAPDH (Abcam), and nuclear mouse monoclonal anti-PCNA (BD Biosciences) antibodies were also used to ensure the absence of contamination by cytosolic or nuclear proteins. Signals were detected using a Chemiluminescence system (Immobilon western chemiluminescent HRP substrate, Millipore).

2.14. Confocal microscopic analysis

HeLa cells were grown and transfected by calcium phosphate precipitation on glass coverslips. For mitochondrial staining, cells were incubated in a 100 nM solution of MitoTracker red (Life Technologies) for 15 min, replaced by HeLa cells culture medium for 2 h at 37 °C, and washed in PBS. The samples were fixed with paraformaldehyde 15 min, washed with PBS, mounted on glass slides using 12% Mowiol (Calbiochem), and analyzed using a Zeiss LSM510 meta confocal laser-scanning microscope.

2.15. mtDIP-PCR assay of PIF1-mtDNA interaction

The mtDIP method is based on the principle of chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay and was exactly performed as previously described (Bannwarth et al., 2012).

2.16. Treatment of cells with H₂O₂ or MMS

Immortalized MEFs were plated in triplicate in 100 mm-diameter culture sterile dishes at 60–70% confluence 20 h before treatment. H₂O₂ (30%, Sigma-Aldrich) or MMS (99%, Sigma-Aldrich) were diluted into PBS. The concentration of H₂O₂ was determined by absorbance at 260 nm as described (Shull et al., 1991). Monolayer cultures were exposed to 150 µM H₂O₂ for 30 min at 37 °C or to 2 mM MMS for 45 min at 37 °C in serum free medium that was replaced by complete medium culture and incubated for the indicated times. Before genomic DNA extraction, the medium culture was removed and plates were rapidly frozen in N₂ liquid and stored at −80 °C. High molecular weight DNA from cell lines was isolated using a Qiagen genomic tip 20G kit (Qiagen) as described by the manufacturer.

2.17. mtDNA damage and repair assays

The qPCR assay measures the DNA lesions in a genomic segment of interest. DNA lesions, including H₂O₂- or MMS-induced damages, block the progression of the Taq DNA polymerase resulting in a decreased amplification of a target sequence (Furda et al., 2012; Rouzier et al., 2012; Yakes and Van Houten, 1997). PCR quantification was normalized with a small target PCR which is not affected by H₂O₂ or MMS treatment and serves as an indicator of relative copy number and PCR quality of the genomic extract. Therefore, for each sample, 3 separate PCR reactions were performed with 3 different cycle numbers to determine quantitative conditions. A 10 kb mouse mtDNA fragment was amplified in a Applied PCR System 2720 with Expand long template PCR system (Roche Applied Science). Primer sequences are listed in Supplementary Table 1. Reaction mixtures were contained of 200 ng of template genomic DNA, 1X Buffer 3, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (Roche Applied Science), 200 ng of each primer and 3.75 Units of Taq Polymerase mix. A 117 bp mouse mtDNA small fragment was amplified to determine the copy number of mitochondria, using 2.5 Units of Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science), 200 ng of template genomic DNA, 1X Taq DNA Polymerase buffer, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (Roche Applied Science), and 200 ng of each primer. PCR programs and Quant-

iT PicoGreen method used for the quantification of PCR products were previously described (Bannwarth et al., 2012).

2.18. Reactive oxygen species (ROS) detection

CellROX green reagent (Life technologies) was added to cell culture medium at a concentration of 500 nM for 30 min at 37 °C, 5% CO₂, protected from light. The cells were then analyzed by flow cytometry using a MACS-Quant Analyzer (Miltenyi Biotec). As a positive control, cells were treated 30 min with tert-butyl hydroperoxide (TBHP) at 200 μM, and as a negative control cells were incubated with N-acetylcysteine (NAC) at 500 μM for 1 h prior to treatment with 200 mM TBHP.

2.19. Circular: linear mtDNA analysis

From frozen culture plates, cells were scraped in proteinase K digestion buffer and digested overnight as previously described (Kolesar

et al., 2013). Samples were quantified and mtDNA resolved into relaxed circular and linear genomes by single dimension intact mtDNA agarose gel electrophoresis (1D-IMAGE) prior to quantitation (Kolesar et al., 2014).

3. Results

3.1. *pif1* ^{−/−} mice show histological features of mitochondrial myopathy

Patients with mtDNA instability disorders often develop mitochondrial myopathy during adulthood with little functional consequences. We therefore first sacrificed 14-month-old mice to analyze muscle histopathology and ultrastructure (Fig. 1A–L). *pif1* ^{−/−} animals presented an accumulation of mitochondria in the subsarcolemmal region of type 1 muscle fibers on Gomori trichrome stain (Fig. 1D). Although histological analysis found no COX negative (COX[−]) muscle fibers, moth-eaten fibers were observed with both COX and NADH-TR staining (Fig. 1E, F). Electron microscopy studies (Fig. 1G–L) confirmed muscle

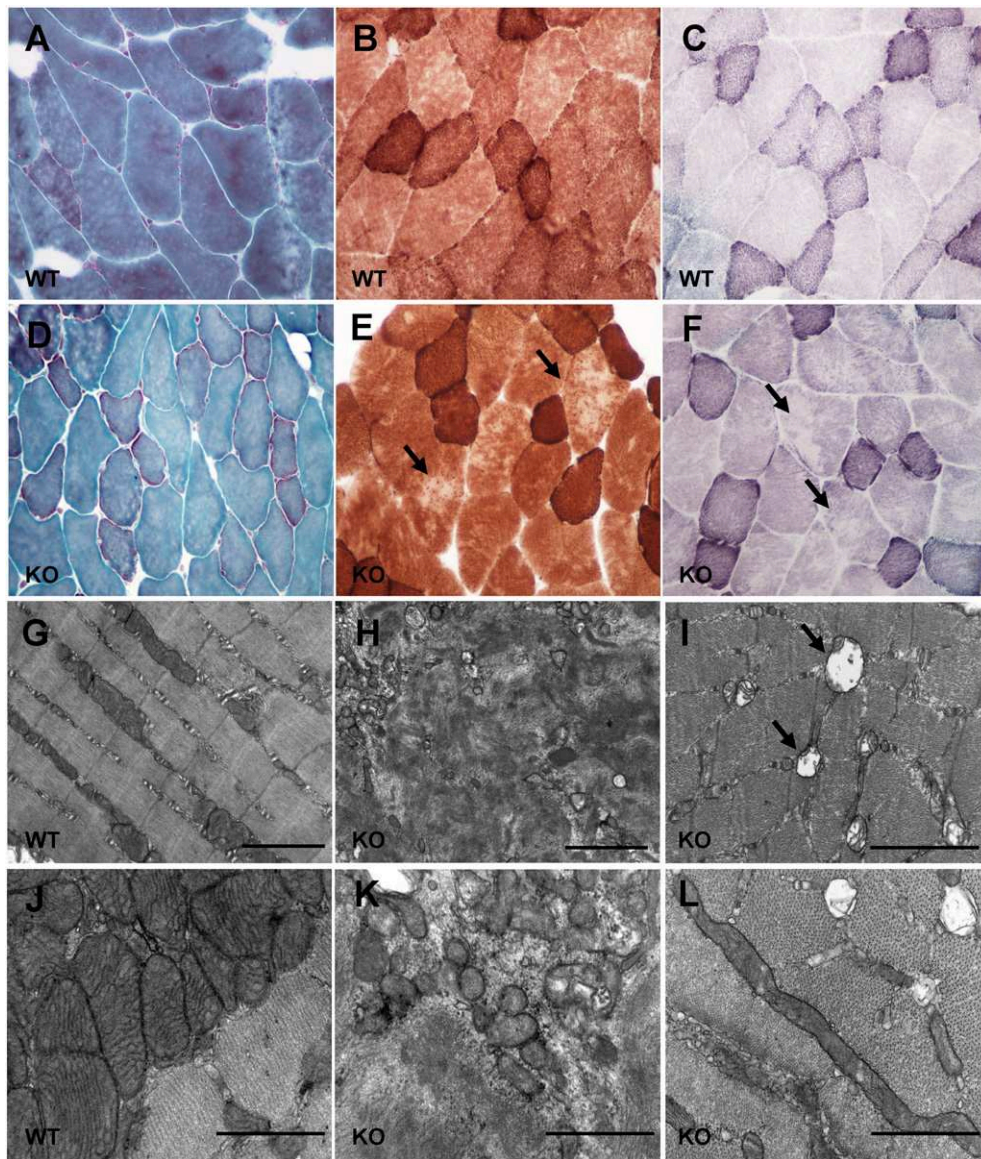


Fig. 1. Muscle analysis from 14-month-old control and *pif1* ^{−/−} mice. A–F. Histopathology of control (A–C) and KO (D–F) mice with Gomori modified trichrome (A, D) showing an accumulation of mitochondria in the subsarcolemmal region in *pif1* ^{−/−} mice, COX/SDH (B, E) and NADH-TR (C, F) staining revealing moth-eaten fibers in the same animals (arrows). G–L. Ultrastructure of skeletal muscle from control (G, J) and KO (H, I, K, L) mice showing some necrotic fibers characterized by an erasing of the striation and a general disorganization of sarcomeres (H, K) and mitochondrial abnormalities such as emphasis of mitochondria contours and lost of cristae (K). Other fibers show enlarged and swollen mitochondria with altered cristae organization (I, arrows) or elongated mitochondria (L) in *pif1* ^{−/−} mice. Scale bars: G, H, I: 2 μm, J, K, L: 1 μm.

dysfunction and mitochondrial abnormalities by showing necrotic muscle fibers characterized by an erasing of the striation and a general disorganization of sarcomeres associated with a characteristic emphasis of mitochondria contours (Fig. 1H, K). Subsarcolemmal mitochondria accumulation, lipid droplets and abnormal mitochondria were also found in non-necrotic fibers including elongated or enlarged and swollen mitochondria with altered cristae organization (Fig. 1I, L). In some fibers, the coexistence of a mitochondrial overload and necrotic alteration of myofilaments was also observed.

No signs of mitochondrial dysfunction were noted during the first months of life by optic microscopy analysis in mutant mice (not shown). However, mitochondria with altered morphology and myofibrillar disorganization were observed in a few number of muscle fibers by electron microscopy in *pif1*^{−/−} animals from the age of 3 months (not shown).

We also examined the hearts of mice without finding abnormalities by light microscopy analysis. However, electron microscopy showed swollen mitochondria and disorganization of some cardiomyocytes in 14-month-old animals only (Supplementary Fig. 1). These data demonstrate progressive defects in the *pif1*^{−/−} mice, with an overt mitochondrial requirement for PIF1 in skeletal muscle in adult mice.

3.2. The physical performance of *pif1*^{−/−} mice is decreased

Because of the histological abnormalities found in the muscle of *pif1* KO mice, we studied the physical performance of mutant animals at one year of age. The distance run on voluntary running-wheel exercise has been shown to reflect the endurance capacity. As previously described, we observed that C57BL/6J female mice ran longer than male mice (Fig. 2) (De Bono et al., 2006). We found impairment of exercise capacity in *pif1*^{−/−} mice with a daily running distance significantly lower compared to controls both in males ($p < 0.05$) and females ($p < 0.01$) (Fig. 2A). The distance per day (mean $\pm$ SD) was 1.7 ± 1.5 km in *pif1*^{−/−} males versus 5.6 ± 1.1 km in control males and 2.4 ± 1.0 km in *−/−* females versus 7.0 ± 0.4 km in control females. In the younger three months aged mice, the difference between knockout and wild-type mice was smaller but still significant. The distance per day was 4.4 ± 0.7 km in *pif1*^{−/−} males versus 6 ± 0.6 km in control males and 4.8 ± 0.9 km in *−/−* females versus 6.7 ± 0.6 km in control females (Fig. 2B).

At birth and during the first months of life, there was no difference in weight between KO and control mice in males or females. However, *pif1*^{−/−} animals presented a significant gain of weight from the age of 6 months in males and 5 months in females (Fig. 2C). When we compared the body weight-normalized running distance (m/g), the exercise capacity was still significantly different between *pif1*^{−/−} and control mice at one year of age ($p < 0.05$): 3.8 fold less in males and 4.3 fold less in females (Fig. 2D).

3.3. Respiratory chain deficiency with low amount of mtDNA deletions in muscle of *pif1*^{−/−} mice

Mitochondrial function was assessed by enzymatic spectrophotometric measurements of the individual respiratory chain complexes in muscle of KO mice, which presented characteristic histological changes at 14 months of age. We observed a significant decrease of complex I activity in both 14 month and 3 month-aged *pif1*^{−/−} animals compared to controls (Fig. 3A, B). We also characterized respiratory chain function in the hearts of KO mice, which revealed a decrease of complex I and III activity, but only in old animals (Fig. 3C, D), which is consistent with the cardiac abnormalities found by electron microscopy.

Because loss of PIF1 in yeast causes mtDNA deletions (Schulz and Zakian, 1994), we searched for mtDNA deletions in KO and age-matched control mice by long extension PCR (LX-PCR). Amplification of muscle mtDNA of *pif1*^{−/−} animals at 14 months of age resulted in multiple products, corresponding to full-size mtDNA and molecules

with deletions of multiple sizes (Fig. 4A). Only the 12.8 kb product was amplified from control muscles. No deletion was found in other tissues tested except for one KO mouse that had one single deleted PCR product of around 3 kb in brain, heart and kidney but not in liver (Fig. 4A). Cloning and sequencing of deletion breakpoints revealed that the 3 kb amplicon contained a single 9676 bp deletion between nt 5597 and nt 15,271. The deletions could not be seen on Southern blot except for the deleted population corresponding to the 3 kb amplicon upon overexposure of autoradiography (Fig. 4B), suggesting that the amount of deleted molecules is very modest. Quantification of mtDNA copy number against the nuclear *GAPDH* gene revealed no depletion in any tissue examined (muscle, heart, brain, liver and kidney) neither in old (Fig. 4C) nor in young (not shown) *pif1*^{−/−} mice.

Next-generation sequencing revealed that 3-month-old or 14-month-old *pif1* KO animals did not have a detectable increase in somatic mtDNA point mutation load in their muscle and heart samples (not shown). In order to determine the putative role of endogenous ROS production in mtDNA mutagenesis, we quantified the level of ROS production in *pif1*^{−/−} cells. In basal condition, the endogenous ROS level was similar in control and *pif1*^{−/−} MEFs suggesting that mutagenesis associated with endogenous ROS production is not increased in KO mice compared to control animals. Interestingly, treatment with tert-butylhydroperoxide (TBHP), an oxidative stress inducer, resulted in marked increase of ROS level in *pif1*^{−/−} MEFs compared to control MEFs (Fig. 4D).

3.4. Mitochondrial deficiency in *pif1*^{−/−} mice is not secondary to *Pif1*-dependent telomere dysfunction

A lot of human diseases (muscle atrophy, cardiovascular disorders, diabetes...) implicate mitochondrial deficiency and telomere dysfunction. Dysfunctional telomeres activate p53 which in turn binds and represses promoters of *Ppargc1 α* (PGC-1 α) and *Ppargc1 β* (PGC-1 β), two key regulators of mitochondrial physiology, leading to impaired mitochondrial function (Sahin et al., 2011). *pif1*^{−/−} mice apparently did not show a telomere phenotype so we analyzed PGC pathway to verify that diminished mitochondrial function that we observed was not secondary to an undetected telomere dysfunction (Snow et al., 2007). Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis (RT-qPCR) of muscle and heart tissues from 14 month-old *pif1*^{−/−} mice showed no decreased *PGC-1 α* and *PGC-1 β* expression and their critical targets such as *Sirt3*, *CD36* and *Acox1* genes (Fig. 5). Thus, respiratory chain defect and histological changes found in these tissues were likely secondary to the absence of a PIF1 mitochondrial isoform rather than a PIF1-dependent telomere dysfunction.

3.5. Mitochondrial localization of mPIF1 and physical association with mtDNA

It has been recently shown that generation of mitochondrial-targeted forms of human and mouse PIF1 occurs via downstream alternative translation initiation (dATI) (Kazak et al., 2013). In mouse, dATI occurs from the AUG encoding methionine 67 of PIF1 and the generated mitochondrial isoform is cleaved after mitochondrial import. To confirm this result, we treated isolated mitochondria, from *mPIF1*^{67-EGFP} transfected HeLa cells, with proteinase K. As shown in Fig. 6A, *mPIF1*^{67-EGFP} was resistant to protease treatment indicating that the fusion protein is present inside mitochondria. We also observed a shorter protein (m), which was also resistant to degradation by proteinase K, presumably corresponding to the product of the mature mitochondrial isoform (Kazak et al., 2013). As expected, MFN2 (outer mitochondrial membrane) was digested by proteinase K while SMAC (intermembrane space protein) was resistant to protease digestion. Confocal microscopy analysis further confirmed mitochondrial targeting of *mPIF1*^{67-EGFP} (Fig. 6B).

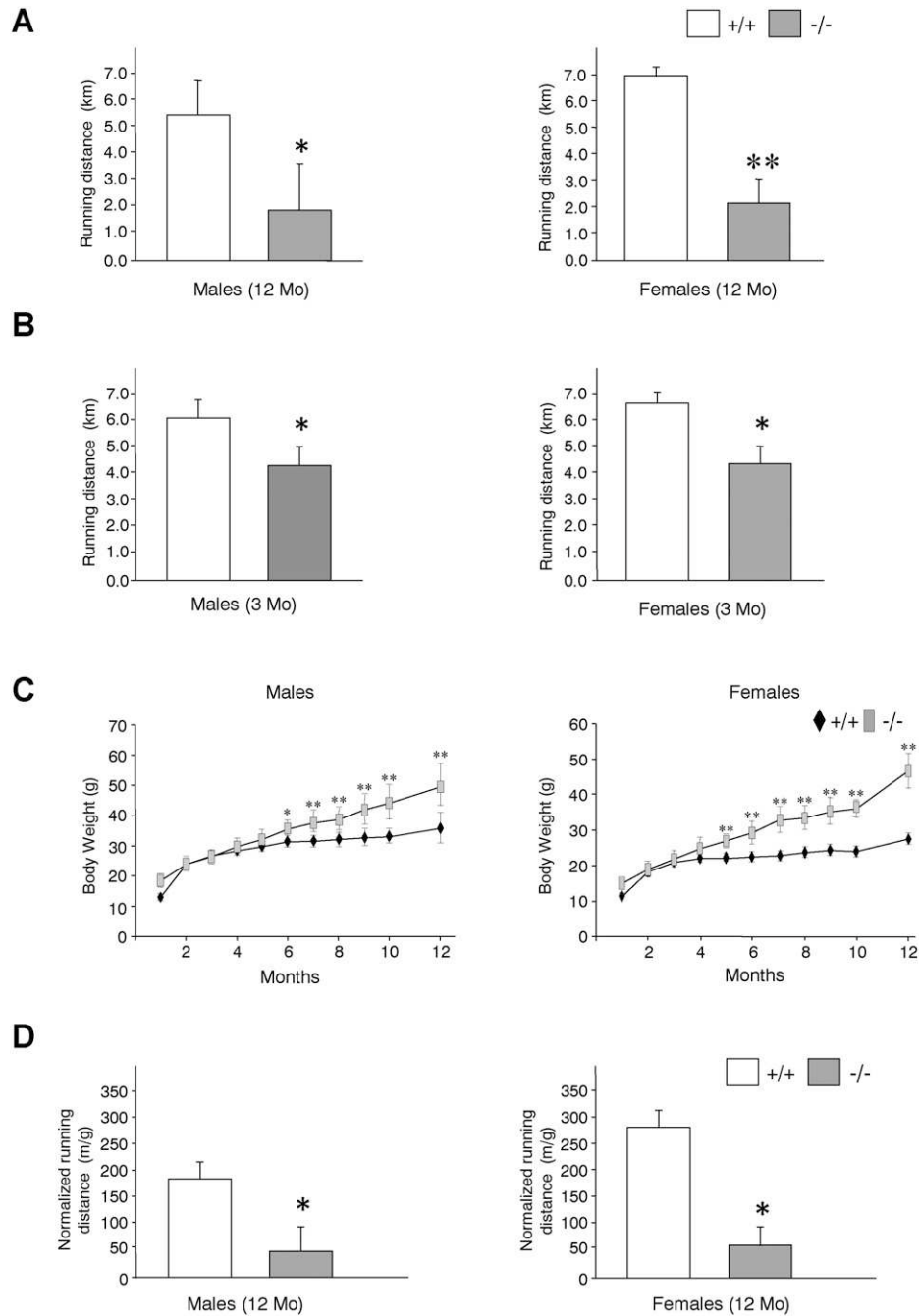


Fig. 2. Physical performance of control and *pif1*^{-/-} mice. **A.** Average distance run voluntarily per day by males (left panel, *n* = 6) and females (right panel, *n* = 6) at 12 months of age. **B.** Average distance run voluntarily per day by males (left panel, *n* = 6) and females (right panel, *n* = 6) at 3 months of age. **C.** Left panel: body weight curves for male wild-type (*n* = 9 at the different time points, black diamonds) and *pif1*^{-/-} (*n* = 6–11, gray rectangles) mice. Right panel: body weight curves for female wild-type (*n* = 4–7, black diamonds) and *pif1*^{-/-} (*n* = 4–11, gray rectangles) mice. **D.** Body weight-normalized running distance from males (left panel) and females (right panel) at 12 months of age. Mo: month; km: kilometer; m/g: meter/g; +/+ : wild-type and -/- : KO mice. Differences were analyzed by the Student's *t* test (*: *p* < 0.05; **: *p* < 0.01).

To test whether *mPIF1*⁶⁷-EGFP associated with mtDNA, we then performed the mtDNA immunoprecipitation assay (mtDIP assay) and PCR analysis (Bannwarth et al., 2012). Mitochondria were isolated from *mPIF1*⁶⁷-EGFP transfected HeLa cells and proteins that interact with mtDNA were chemically crosslinked. The samples were then submitted to immunoprecipitation with anti-GFP antibody, as well as negative control antibodies (anti-FLAG and non-specific IgG) (Fig. 6C). The precipitated DNA was isolated and analyzed by PCR for mtDNA, using pairs of primers specific for coding regions

(amplicons C, E and G) (Fig. 6C). These primers do not allow any amplification from DNA extracted from Wall-2A- ρ^0 cells, demonstrating that the corresponding amplicons do not result from the amplification of nuclear pseudogenes (Bannwarth et al., 2005). DNA isolated prior immunoprecipitation from each sample was used as positive control (input) for the PCR reaction. As shown in Fig. 6C, mtDNA sequences were amplified only in GFP-precipitated samples, and not in the negative control IgG and FLAG samples or untransfected cells. These results are consistent with the localization of Pif1 inside mitochondria

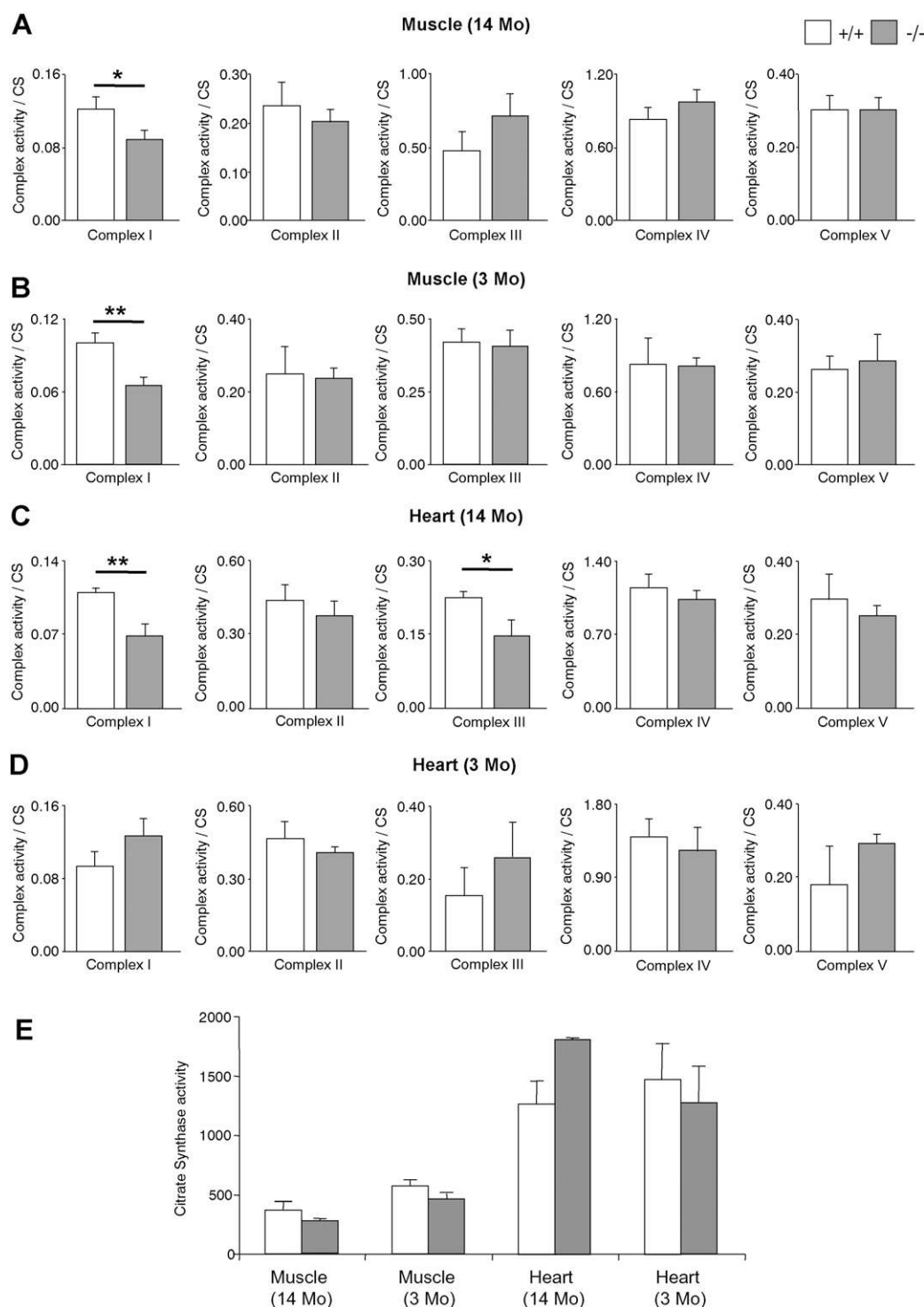


Fig. 3. Spectrophotometric analysis of respiratory chain in wild-type and *pif1* $-/-$ mice. A. Muscle from mice at 14 months (Mo) of age. B. Muscle from mice at 3 months of age. C. Heart from mice at 14 months of age. D. Heart from mice at 3 months of age. Results represent the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments from 3 wild-type and 3 *pif1* $-/-$ mice. Activities were expressed as activity ratios compared to citrate synthase (CS). E. Citrate synthase activity in A, B, C and D samples. Differences in respiratory complex activities were analyzed by the Student's *t* test (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

and show that the mitochondrial isoform of this helicase associates with mtDNA.

3.6. *mPif1* inactivation affects mtDNA repair following DNA damage induced by oxidative stress that is improved by complementation with *mPif1*⁶⁷

To assess the role of PIF1 in mtDNA damage, we determined whether this protein could influence mtDNA repair kinetics caused by

oxidative stress. Lesions in mitochondrial genome due to H_2O_2 treatment were first assessed by qPCR-based assay in which base lesions, abasic sites or strand breaks interfere with the amplification of long DNA targets (Rouzier et al., 2012; Yakes and Van Houten, 1997). Long PCR products serve as sensitive probes for lesions introduced by oxidative stress, where shorter control amplicons are less likely to be damaged and serve to normalize the samples. We treated control and *pif1* $-/-$ MEFs with 150 μM H_2O_2 and measured mitochondrial DNA

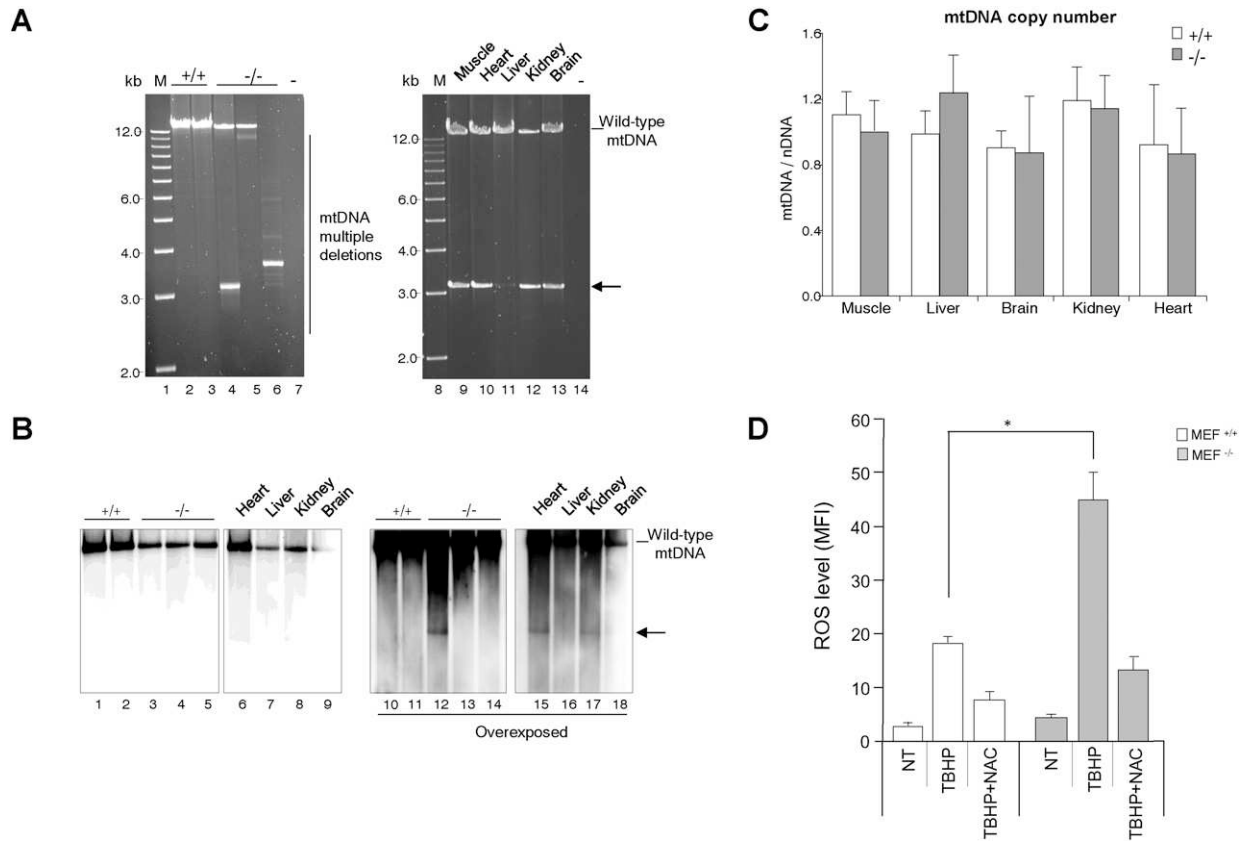


Fig. 4. Mitochondrial DNA analysis and copy number determination. A. Long extension PCR of mtDNA from muscle of 2 wild-type (lanes 2, 3) or 3 *pif1*^{-/-} (lanes 4–6) mice at 14 months of age and from muscle, heart, liver, kidney and brain (lanes 9–13) of the *pif1*^{-/-} mouse corresponding to lane 4. Arrow indicates the 3 kb amplicon. Lanes 1, 8: molecular weight marker; 1 kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Lanes 7, 14: negative PCR controls. B. Southern blot of muscles (lanes 1–5 and 10–14) and other tissues (lanes 6–9 and 15–18) of 14-month-old wild-type (lanes 1, 2, 10, 11) and *pif1*^{-/-} (lanes 3–9 and 12–18) mice. The right panel corresponds to the overexposed version of the Southern blot showed on the left panel. The deleted molecule corresponding to the 3 kb amplicon is pointed by the arrow. C. Determination of mtDNA content. Mitochondrial DNA quantification in muscle, liver, brain, kidney and heart of wild-type (white) or *pif1*^{-/-} (gray) mice at the age of 14 months. The mouse mitochondrial 12S rRNA (mtDNA) and the nuclear GAPDH (nDNA) genes were individually amplified by real-time PCR. Data were expressed as ratio between mtDNA and nDNA concentration and values were normalized to wild-type sample. Results represent the mean of relative PCR $\pm$ SD of 3 independent experiments from 3 wild-type and 3 *pif1*^{-/-} mice. D. ROS level production in MEFs by flow cytometry. Wild-type (white) and *pif1*^{-/-} (gray) MEFs were pretreated with 500 μM or without antioxidant NAC for one hour. Cells were then incubated with 200 μM TBHP (ROS inducer) and stained with CellROX green reagent. Results represent the mean of two independent experiments $\pm$ SEM. Differences were analyzed by Student's *t* test (*: $p < 0.05$). MFI: median fluorescence intensity, NT: not treated cells.

damage by qPCR analysis immediately after treatment and after 1, 2 or 4 h of recovery. As shown in Fig. 7A, *pif1*^{-/-} MEFs showed a decreased capacity to repair stress-induced mtDNA lesions compared to control MEFs with an absence of recovery four hours after H₂O₂ treatment. The mtDNA damage phenotype was also confirmed by direct assessment of double strand breaks using one dimensional intact mtDNA agarose gel electrophoresis (1D-IMAGE) (Supplementary Fig. 2) (Kolesar et al., 2014).

To demonstrate that depletion of PIF1 mitochondrial isoform (*mPIF1*⁶⁷) was responsible for the observed mtDNA repair deficiency in *pif1*^{-/-} MEFs, we transduced both *pif1*^{+/+} (control) and *pif1*^{-/-} MEFs with retrovirus encoding the mitochondrial isoform. The transduction of *pif1*^{-/-} MEFs resulted in significantly improved mtDNA repair capacity four hours after H₂O₂ treatment whereas transduction of control cells has no effect (Fig. 7A).

Mitochondrial DNA copy number was not different between control and *mPIF1*^{-/-} MEFs in basal conditions (not shown). We further explored the impact of H₂O₂ treatment on mtDNA level by qPCR during the recovery process. As previously described, we observed that ROS exposure did not immediately alter mtDNA content but the relative number of mtDNA molecules decreased during the process of recovery (Fig. 7B) (Rothfuss et al., 2010). Interestingly, mtDNA copy number decreased more rapidly in *pif1*^{-/-} MEFs than in control cells suggesting that mtDNA was more severely damaged and degraded in PIF1-deficient cells (Fig. 7B). The *mPIF1*⁶⁷ expression in *pif1*^{-/-} MEFs led

to a delay of mtDNA copy number decrease compared to *mPIF1*-deficient cells after H₂O₂ treatment. All together, these results are consistent with a role of mPIF1 in mtDNA maintenance and repair after oxidative stress.

While mitochondria lack some repair pathways they have robust base excision repair of base damage resulting from oxidizing and alkylating agents (LeDoux et al., 1999; Sawyer and Van Houten, 1999). We asked whether PIF1 is also involved in mtDNA damage secondary to alkylating agents. We treated control and *pif1*^{-/-} MEFs with methyl methanesulfonate (MMS). We observed that there was no delay to repair mtDNA lesions in KO MEFs compared to control MEFs after MMS treatment, suggesting that PIF1 is not involved in alkylation repair pathway (Fig. 7C).

4. Discussion

Helicases are crucial enzymes in genome stability. While several mitochondrial helicases have been described, they remain poorly characterized (de Souza-Pinto et al., 2010; Ding and Liu, 2015). The mtDNA helicase encoded by the *TWINKLE* gene, also known as *PEO1*, is related to the phage T7 gp4 helicase-primase. TWINKLE, the first mammalian mitochondrial helicase identified, participates in mtDNA replication and has been shown to form a minimal mtDNA replisome *in vitro* together with the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and POLG, the sole mitochondrial DNA polymerase (Korhonen et al.,

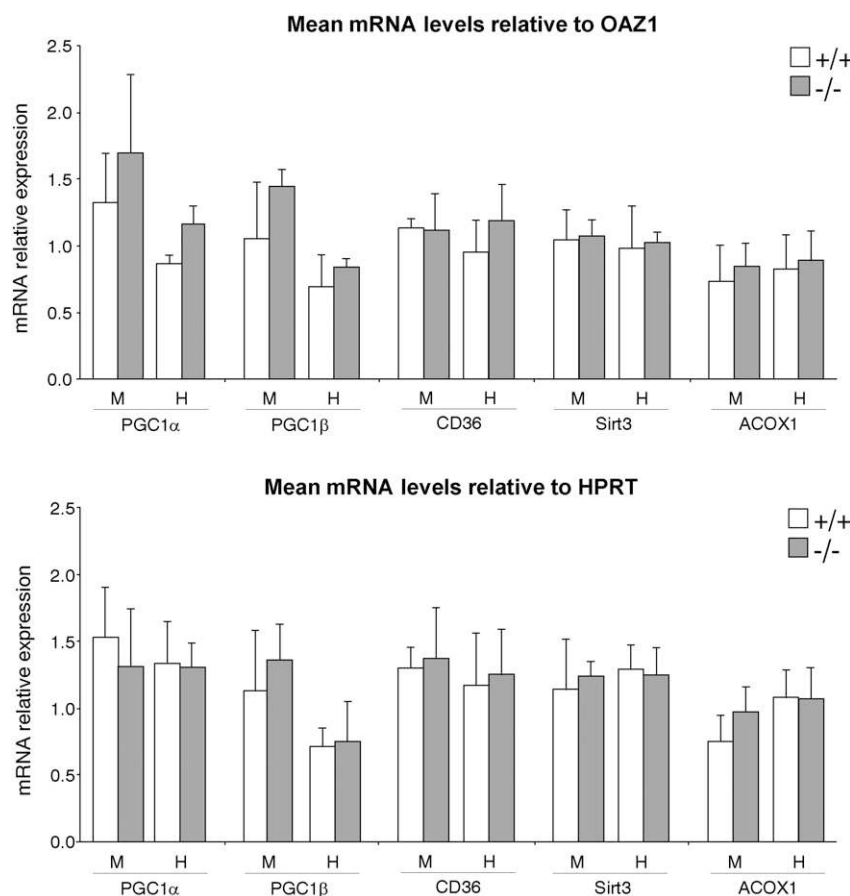


Fig. 5. Quantitative real-time PCR analysis of PGC pathway in wild-type and *pif1* $-/-$ mice. RT-qPCR analysis of *PGC-1α*, *PGC-1β* and transcriptional targets (*Sirt3*, *CD36*, *Acox1*) in muscle (M) and in heart (H) of control (white) and *Pif1* $-/-$ (gray) 14-month-old mice. Results were normalized to *OAZ1* (upper panel) and *HPRT* (lower panel). Results represent the mean of relative PCR $\pm$ SD of 3 independent experiments from 3 wild-type and 3 *pif1* $-/-$ mice.

2004). Mutations in *TWINKLE* are mainly associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO) (Copeland, 2008) but can also be responsible for severe recessive neurodegenerative disorder with CI deficiency (Hakonen et al., 2008). Mouse transgenic models that overexpressed several of the PEO mutations in *TWINKLE* (deletor mice) recapitulated many of the characteristics of human PEO, including late-onset mitochondrial myopathy and multiple mtDNA deletions (Tyymsmaa et al., 2005). Human DNA2, a second member of the mitochondrial helicase family, was recently found in mammalian mitochondria where it participates in the removal of RNA primers during mtDNA replication due to its nuclease activity (Zheng et al., 2008). Human DNA2 interacts with POLG, stimulates its catalytic activity and most likely serves as an alternative to the *TWINKLE* helicase. Recently, mutations in *DNA2* have been identified in patients with adult-onset mitochondrial myopathy featuring instability of muscle mtDNA (Ronchi et al., 2013).

We show here that inactivation of *mPif1*, encoding another mitochondrial helicase, causes a mouse phenotype similar to those observed with *TWINKLE* and *DNA2* mutations. The mice developed a progressive mitochondrial myopathy. In muscle, we observed a mitochondrial accumulation in the subsarcolemmal region with abnormal mitochondria in animals at 14 months of age but no COX negative fibers. Interestingly, we also observed moth-eaten muscle fibers that have been described in association with CI defect and that correspond to necrotic fibers with a general disorganization of sarcomeres found by electron microscopy (Arenas et al., 1998). Another consequence of *PIF1* ablation is the complex I deficiency similar to that found in patients with infantile-onset spinocerebellar ataxia (IOSCA) carrying recessive *TWINKLE* mutations (Hakonen et al., 2008). Muscle weakness was confirmed by an

impairment of exercise capacity particularly evident after one year of age. This decrease in physical activity is probably partly responsible for the weight gain observed in mice after 6 months of age. However, we cannot exclude that the inactivation of *Pif1* causes metabolic abnormalities that should be investigated. In young *pif1* $-/-$ animals, muscle morphology, biochemical analyses and physical performance revealed mild abnormalities suggesting that *Pif1* inactivation causes a slowly progressive disease; the mitochondrial defect becoming increasingly apparent under conditions of advanced age as with other mitochondrialopathies. Despite Twinkle deletor mice and *pif1* $-/-$ animals both develop a mitochondrial myopathy with mtDNA deletions, the phenotypic, biochemical and histological characteristics are quite different. Twinkle deletor mice show clear COX-fibers but yet their biochemistry is closed to normal. In contrast, *pif1* $-/-$ animals show signs of exercise intolerance and muscle weakness with CI deficiency whereas Twinkle deletor mice don't.

Here, we also show that *PIF1* is involved in mtDNA maintenance. We found a low amount of mtDNA deletions in *pif1* $-/-$ muscle. The number of deleted mtDNA molecules increased with age but was quite low after one year, resembling the findings in Twinkle deletor mice (Tyymsmaa et al., 2005) and in some affected individuals harboring *DNA2* or *TWINKLE* mutations (Ronchi et al., 2013; Suomalainen et al., 1997). It should also be noted that, as deletor mice, *pif1* $-/-$ animals did not have an increased somatic mtDNA point mutation load in their muscle samples. Though the exact role of *PIF1* helicase in mtDNA stability remains to be determined, it is likely that this protein is involved in the protection against oxidative damage. In yeast, *pif1Δ* mutants display elevated levels of oxidative mtDNA damage and mutagenesis (Doudican et al., 2005). The phenotypic severity of *pif1Δ* mutants may reflect the

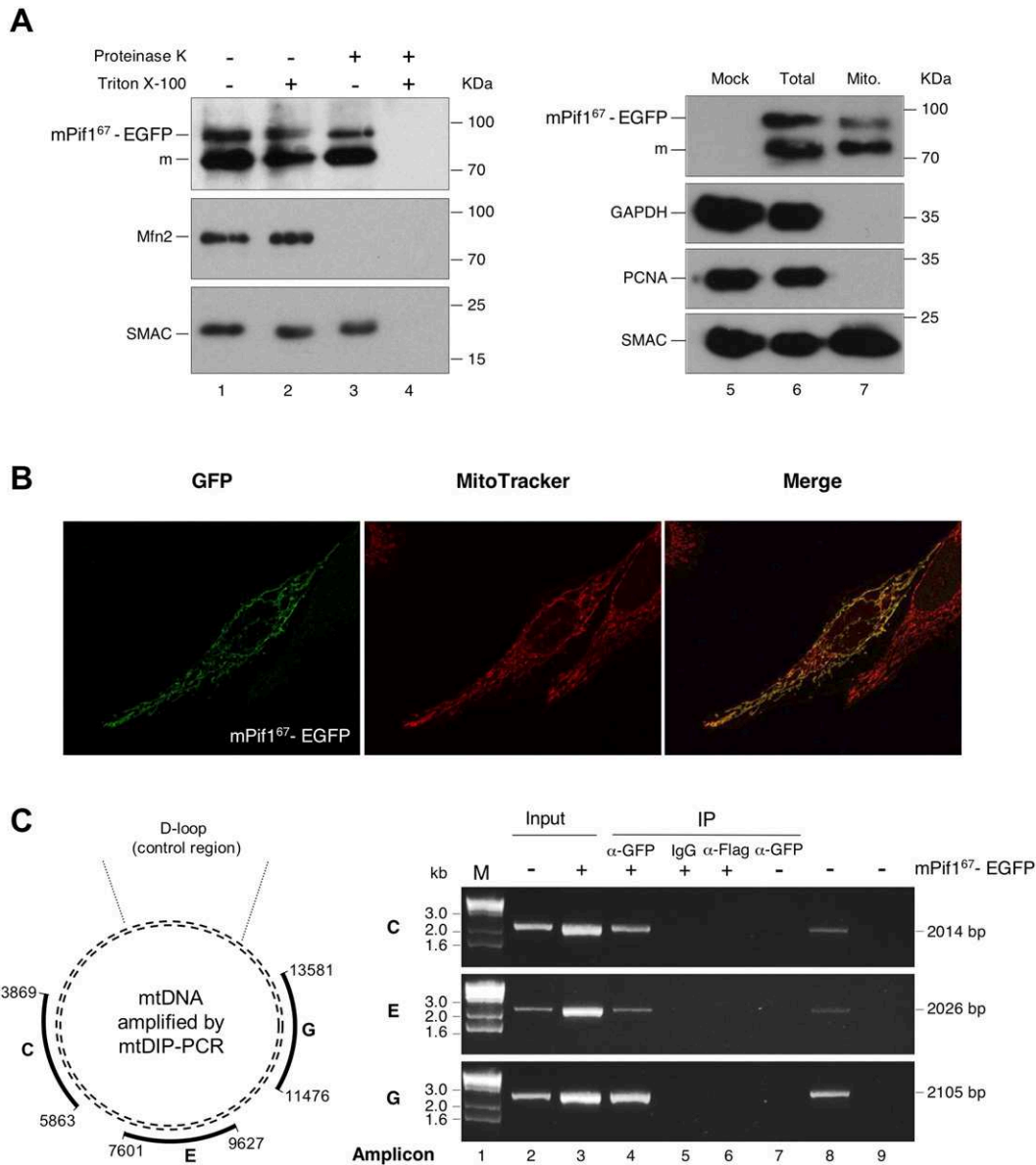


Fig. 6. Mitochondrial localization of PIF1 and association with mtDNA. **A.** Intact isolated mitochondria (lanes 1–4, 7) from *mPif1⁶⁷-EGFP* transfected HeLa cells were incubated in the presence (+) or in the absence (–) of Proteinase K or Triton X-100 before analysis by immunoblotting using antibodies against GFP, MFN2 (mitochondrial outer membrane protein) or SMAC (mitochondrial intermembrane space protein). To verify the purity of isolated mitochondria, total lysates of untransfected cells (lane 5), *mPif1⁶⁷-EGFP* transfected cells (lane 6) and mitochondrial isolates (lane 7) were analyzed by immunoblotting using antibodies against GAPDH (cytosolic protein), PCNA (nuclear protein) or SMAC (mitochondrial protein). m: putative mature DAT1 isoform of *mPif1⁶⁷* after mitochondrial import and removal of the MTS (Mitochondrial Targeting Sequence). **B.** Confocal microscopy images of *mPif1⁶⁷-EGFP* transfected HeLa cells stained with MitoTracker. **C.** mtDIP-PCR analysis of *mPif1⁶⁷-EGFP* binding *in vivo*. Left panel: Schematic diagram of the mitochondrial genome (dotted line). The regions of the mtDNA which were amplified by PCR are represented with primer positions (thick line). Numbers correspond to mtDNA nucleotides (GenBank NC_012920). Right panel: Agarose gel of PCR products for amplicons C, E or G containing either mtDNA co-immunoprecipitated (IP) with anti-GFP (lanes 4, 7), IgG (lane 5) or anti-Flag (lane 6). Input: PCR positive control (mtDNA before immunoprecipitation). M: molecular weight marker 1 kb Plus (Life Technologies). Lane 8: PCR positive control. Lane 9: “no template” PCR negative control.

multifunctional role that ScPif1 mediates in response to mitochondrial oxidative stress, including inhibition of replication fork progression in order to allow time for repair to occur, controlling recombination, and other potential activities, such as influencing the accessibility of mtDNA to repair proteins (Doudican et al., 2005). The data presented here suggest that, in mammals, PIF1 is also involved in repair of oxidative damage in mitochondria because in response to H₂O₂ treatment, the recovery of mtDNA was delayed in *pif1* –/– MEFs compared to wild-type cells. Data revealing a shift in the relative abundance of circular and linear mtDNA in KO MEFs after H₂O₂ treatment is another argument in favor of this hypothesis. Furthermore, the number of mtDNA molecules decreased more rapidly during the recovery process in

PIF1-deficient MEFs supporting the hypothesis that mtDNA recovery, involving replication of undamaged or repaired mtDNA molecules and degradation of affected mtDNA molecules, is more efficient in the presence of PIF1. Complementation of PIF1-deficient MEFs with mPIF mitochondrial isoform had positive effects both on mtDNA repair capacity and amount of mtDNA molecules during the recovery process, thus demonstrating that the observed effects are specific to the PIF1 mitochondrial protein. Last, the induction of oxidative stress led to a significant increase of ROS level in *pif1* –/– MEFs compared to control cells. On the contrary, our results suggest that PIF1 is not involved in mtDNA repair generated by alkylating agents like MMS (Furda et al., 2012).

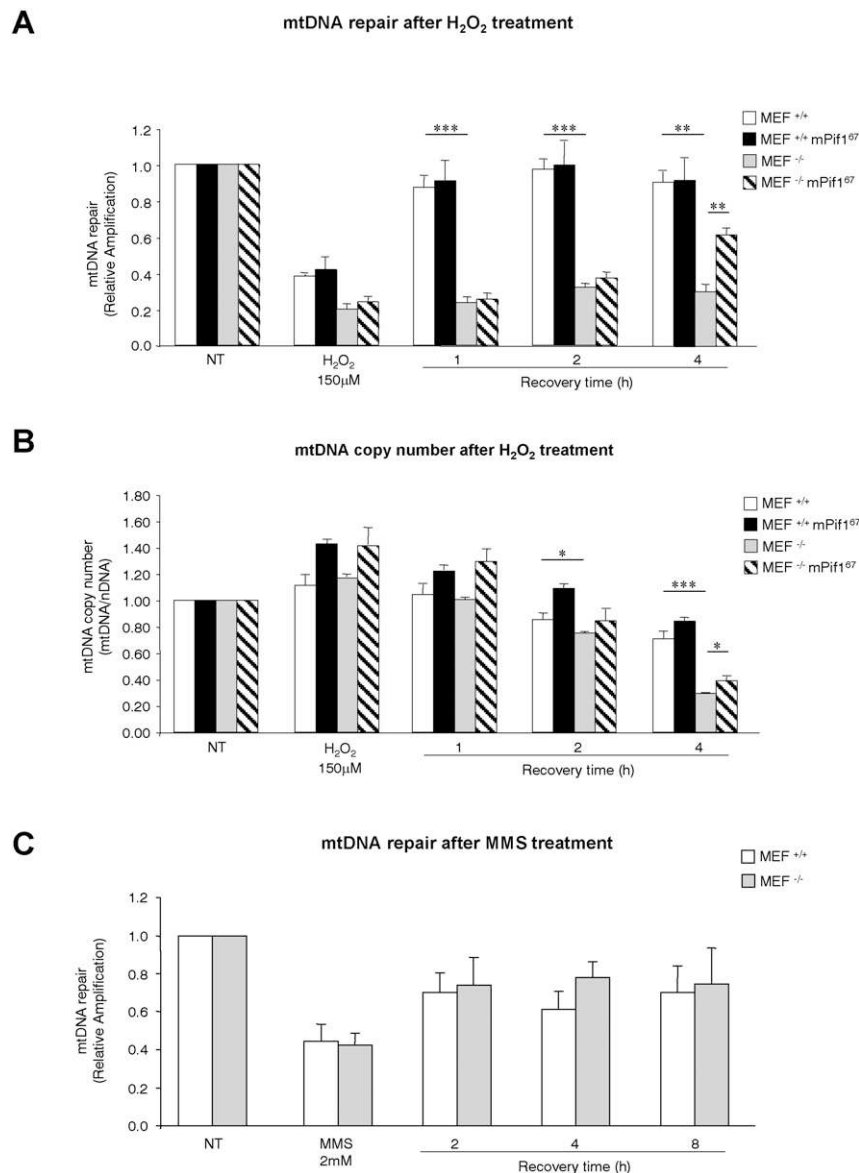


Fig. 7. mtDNA repair following DNA damage induced by oxidative or alkylating stress in MEFs and complementation with the mitochondrial isoform. **A.** mtDNA repair activity after H₂O₂-induced DNA damage in wild-type (white), wild-type + mPif1⁶⁷ (black), pif1^{-/-} (gray) and pif1^{-/-} + mPif1⁶⁷ (hatched) MEFs. A long-range PCR was used to evaluate the oxidative damage, induced by H₂O₂ treatment, in mtDNA. The relative PCR amplification of a 15.6 kb mtDNA fragment was normalized to mtDNA copy number that was evaluated by PCR amplification of a 172 bp mtDNA fragment. **B.** Determination of the mtDNA copy number after H₂O₂ treatment. mtDNA/nDNA values in wild-type (white), wild-type + mPif1⁶⁷ (black), pif1^{-/-} (gray) and pif1^{-/-} + mPif1⁶⁷ (hatched) MEFs. mtDNA: mitochondrial DNA, nDNA: nuclear DNA. **A–B.** Cells were exposed to 150 μM H₂O₂ for 30 min and either harvested immediately or allowed to recover in conditioned medium for the indicated times. **C.** mtDNA repair activity after MMS-induced DNA damage in wild-type (white) and pif1^{-/-} (gray) MEFs. A long-range PCR was used to evaluate the alkylating damage induced by MMS treatment. The relative PCR amplification of a 15.6 kb mtDNA fragment was normalized to mtDNA copy number that was evaluated by PCR amplification of a 172 bp mtDNA fragment. Results represent the mean of relative PCR amplification ± SEM of two independent experiments in which three PCRs per point were performed. Values were normalized to untreated cells and differences were analyzed by Student's *t* test (*: *p* < 0.05, **: *p* < 0.01, ***: *p* < 0.001).

Oxidative lesions in the mitochondrial genome are repaired by base excision repair enzymes (BER). *In vitro* and *in vivo* experiments support a role for hDNA2 in mitochondrial long patch BER (LP-BER) with immunodepletion of hDNA2 from mitochondrial extracts resulting in decreased LP-BER activity (Zheng et al., 2008). *In vivo*, hDNA2 deficiency decreases repair of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in mtDNA (Zheng et al., 2008) in the same way that the inactivation of mPif1. In yeast, it has been suggested that Pif1p generates long 5' flaps which are removed by Dna2p (Budd et al., 2006). Since hDNA2 is largely mitochondrial, it is possible that in mammals these 2 proteins cooperate during mtDNA replication and/or repair, and the loss of these activities could lead to accumulation of intermediates that would, ultimately lead to mtDNA deletions. In the same way, TWINKLE is known as the

mitochondrial replication helicase but it is not yet known whether it plays a role in mtDNA repair. However, the observed redistribution of mitochondrial DNA2 to the nucleoids in cells expressing mutated TWINKLE proteins (Duxin et al., 2009) also suggests a functional link between these mitochondrial helicases.

5. Conclusions

In conclusion, Pif1 inactivation does not lead to dysfunctional telomeres in mouse but we show that animals develop a mitochondrial telomereopathy. Pif1 inactivation is also responsible for a deficiency to repair oxidative stress-induced mtDNA damage. Improvement of mtDNA repair by complementation with the PIF1⁶⁷ mitochondrial-targeted form

suggests that the mitochondrial phenotype observed in KO animals is due to the loss of the mPIF1 mitochondrial isoform. The similarity of human and mouse phenotypes associated with defects in TWINKLE, DNA2 or PIF1 is an additional argument in favor of the hypothesis of a functional interaction of these three helicases in the maintenance of mtDNA stability. These results open new perspectives for the study of mitochondrial helicases and for the exploration of patients with mtDNA instability disorders.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2016.02.005>.

Acknowledgments

We thank Charlotte Cochaud and Sandra Foustoul for technical help. We thank the Animal Facility of IRCAN and the Pasteur-IRCAN Cellular and Molecular Imaging platform (PICMI). V.P-F was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM – DPM20121125552) and the Association Française contre les Myopathies (AFM-16248); BAK and FRB were supported by grant R01GM110424.

References

- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martín, M.A., Rubio, J.C., Ablanedo, P., et al., 1998. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 43, 397–400.
- Bannwarth, S., Procaccio, V., Paquis-Flucklinger, V., 2005. Surveyor™ nuclease: a new strategy for a rapid identification of heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in patients with respiratory chain defects. *Hum. Mutat.* 25, 575–582.
- Bannwarth, S., Figueroa, A., Fragaki, K., Destrois, L., Lacas-Gervais, S., Lespinasse, F., et al., 2012. The human MSH5 (MutS homolog 5) protein localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. *Mitochondrion* 12, 654–665.
- Bochman, M.L., Sabouri, N., Zakian, V.A., 2010. Unwinding the functions of the Pif1 family helicases. *DNA Repair* 9, 237–249.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Budd, M.E., Reis, C.C., Smith, S., Myung, K., Campbell, J.L., 2006. Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2490–2500.
- Copeland, W.C., 2008. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu. Rev. Med.* 59, 131–146.
- De Bono, J.P., Adlam, D., Paterson, D.J., Channon, K.M., 2006. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R926–R934.
- de Souza-Pinto, N.C., Aamann, M.D., Kulikowicz, T., Stevnsner, T.V., Bohr, V.A., 2010. Mitochondrial helicases and mitochondrial genome maintenance. *Mech. Ageing Dev.* 131, 503–510.
- Ding, L., Liu, Y., 2015. Borrowing nuclear DNA helicases to protect mitochondrial DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 10870–10887.
- Doudican, N.A., Song, B., Shadel, G.S., Doetsch, P.W., 2005. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5196–5204.
- Duxin, J.P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J.L., et al., 2009. Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4274–4282.
- Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M.A., Nijtmans, L., et al., 2009. Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature ageing in mtDNA mutator mice. *Cell Metab.* 10, 131–138.
- Foury, F., Kolodinsky, J., 1983. Pif mutation blocks recombination between mitochondrial rho+ and rho− genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5345–5349.
- Furda, A., Marrangoni, A., Lokshin, A., Van Houten, B., 2012. Oxidants and not alkylating agents induce rapid mtDNA loss and mitochondrial dysfunction. *DNA Repair* 11, 684–692.
- Futami, K., Shimamoto, A., Furuichi, Y., 2007. Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1685–1692.
- George, T., Wen, Q., Griffiths, R., Ganesh, A., Meuth, M., Sanders, C.M., 2009. Human Pif1 helicase unwinds synthetic DNA structures resembling stalled DNA replication forks. *Nucleic Acids Res.* 37, 6491–6502.
- Hakonen, A.H., Goffart, S., Marjawaara, S., Paetau, A., Cooper, H., Mattila, K., et al., 2008. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3822–3835.
- Kazak, L., Reyes, A., Duncan, A.L., Rorbach, J., Wood, S.R., Brea-Calvo, G., et al., 2013. Alternative translation initiation augments the human mitochondrial proteome. *Nucleic Acids Res.* 41, 2354–2369.
- Kolesar, J.E., Wang, C.Y., Taguchi, Y.V., Chou, S.H., Kaufman, B.A., 2013. Two-dimensional intact mitochondrial DNA agarose electrophoresis reveals the structural complexity of the mammalian mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 41, e58.
- Kolesar, J.E., Saffar, A., Abadi, A., MacNeil, L.G., Crane, J.D., Tarnopolsky, M.A., et al., 2014. Defects in mitochondrial DNA replication and oxidative damage in muscle of mtDNA mutator mice. *Free Radic. Biol. Med.* 75, 241–251.
- Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., Falkenberg, M., 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* 23, 2423–2429.
- Lahaye, A., Leterme, S., Foury, F., 1993. PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 26155–26161.
- LeDoux, S.P., Driggers, W.J., Hollensworth, B.S., Wilson, G.L., 1999. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 434, 149–159.
- Li, J.R., Yu, T.Y., Chien, I.C., Lu, C.Y., Lin, J.J., Li, H.W., 2014. Pif1 regulates telomere length by preferentially removing telomerase from long telomere ends. *Nucleic Acids Res.* 42, 8527–8536.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., et al., 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* 21, 115–118.
- Neyton, S., Lespinasse, F., Moens, P.B., Paul, R., Gaudray, P., 2004. Association between MSH4 (MutS homolog 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 917–924.
- Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C., et al., 2013. Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature* 497, 458–462.
- Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., et al., 2013. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 293–300.
- Rothfuss, O., Gasser, T., Patenge, N., 2010. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Res.* 38, e24.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussonot, A., Chevrollet, A., Verschuere, A., Bonello-Palot, N., et al., 2012. The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135, 23–34.
- Rustin, P., Chrétien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., et al., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiency. *Clin. Chim. Acta* 228, 35–51.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., et al., 2011. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- Sanders, C.M., 2010. Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity. *Biochem. J.* 430, 119–128.
- Sawyer, D.E., Van Houten, B., 1999. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res.* 434, 161–176.
- Schulz, V.P., Zakian, V.A., 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* 76, 145–155.
- Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M., Marsh, J.P., et al., 1991. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* 266, 24398–24403.
- Snow, B.E., Mateyak, M., Paderova, J., Wakeham, A., Iorio, C., Zakian, V.A., et al., 2007. Murin Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1017–1026.
- Suomalainen, A., Majander, A., Wallin, M., Setälä, K., Kontula, K., Leinonen, H., et al., 1997. Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* 48, 1244–1253.
- Tynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., et al., 2004. Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3219–3227.
- Tynismaa, H., Mjosund, K.P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., et al., 2005. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17687–17692.
- Wilson, M.A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.H., Chi, P., Niu, H., et al., 2013. Pif1 helicase and Pold promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* 502, 393–396.
- Yakes, F.M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 514–519.
- Zhang, D.H., Zhou, B., Huang, Y., Xu, L.X., Zhou, J.Q., 2006. The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* 34, 1393–1404.
- Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., et al., 2008. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Mol. Cell* 32, 325–336.
- Zhou, J., Monson, E.K., Teng, S.C., Schulz, V.P., Zakian, V.A., 2000. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* 289, 771–774.

Partie 3 : L'identification du gène *CHCHD10* ou la preuve génétique de l'origine mitochondriale de certaines formes de SLA.

Une autre partie de mon travail de thèse a été basée sur la caractérisation d'un nouveau gène impliqué dans une grande famille de patients présentant une myopathie mitochondriale associée à une ataxie, une démence et une atteinte du motoneurone, évocatrice de SLA. Nous avons mis en évidence un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et des délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle de ces patients confirmant le diagnostic de myopathie mitochondriale avec instabilité de l'ADNmt.

Par séquençage d'exome, nous avons identifié une mutation faux sens (c.176C>T; p.Ser59Leu), à l'état hétérozygote, dans le gène *CHCHD10* (Coiled-coil Helix Coiled-coil Helix Domain-containing protein 10) qui code pour une protéine dont la fonction était inconnue au début de notre étude. Nous avons montré que *CHCHD10* est fortement exprimée dans les tissus humains riches en mitochondries et que la protéine est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial avec un enrichissement au niveau des crêtes mitochondriales. Les fibroblastes des patients présentent un déficit de la chaîne respiratoire, une fragmentation du réseau mitochondrial et une désorganisation des crêtes mitochondriales en microscopie électronique. Le même phénotype (fragmentation du réseau et désorganisation des crêtes mitochondriales) est observé après surexpression de l'allèle *CHCHD10*^{S59L} dans des cellules HeLa (Bannwarth et al., 2014b).

L'association d'un défaut cognitif de type démence frontotemporale (DFT) et d'une atteinte du motoneurone dans cette première famille nous a conduit à rechercher des mutations de *CHCHD10* dans une cohorte de 115 patients présentant une DFT-SLA. La mutation p.Ser59Leu a été retrouvée dans une famille de DFT-SLA, d'origine espagnole. Une nouvelle mutation faux-sens : c.100C>T (p.Pro34Ser) a été également identifiée chez 2 individus non apparentés. La fréquence de DFT-SLA imputable à une mutation dans *CHCHD10* est évaluée à 2,6% dans cette cohorte (Chaussonot et al., 2014b). Depuis, plusieurs équipes ont montré que des mutations de *CHCHD10* sont aussi responsables de SLA pures sporadiques et familiales, de DFT pures, d'une forme modérée d'atteinte du motoneurone (SMAJ) et aussi de Charcot Marie Tooth de type 2A (CMT2A) ((Penttilä et al., 2015b); (Jokela et al., 2015), (Cozzolino et al., 2015)).

Ce travail a permis de montrer :

- que *CHCHD10* est un nouveau gène responsable de pathologies mitochondriales avec instabilité de l'ADNmt.
- que certaines formes de SLA et de maladies du motoneurone ont une origine mitochondriale.

A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through *CHCHD10* involvement

Sylvie Bannwarth,^{1,2,*} Samira Ait-El-Mkadem,^{1,2,*} Annabelle Chaussenot,^{1,2} Emmanuelle C. Genin,¹ Sandra Lacas-Gervais,³ Konstantina Fragaki,^{1,2} Laetitia Berg-Alonso,¹ Yusuke Kageyama,⁴ Valérie Serre,⁵ David G. Moore,⁶ Annie Verschueren,⁷ Cécile Rouzier,^{1,2} Isabelle Le Ber,^{8,9} Gaëlle Augé,^{1,2} Charlotte Cochaud,² Françoise Lespinasse,¹ Karine N'Guyen,¹⁰ Anne de Septenville,⁸ Alexis Brice,⁸ Patrick Yu-Wai-Man,⁶ Hiromi Sesaki,⁴ Jean Pouget⁷ and Véronique Paquis-Flucklinger^{1,2}

1 IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France

2 Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France

3 Joint Centre for Applied Electron Microscopy, Nice Sophia-Antipolis University, France

4 Department of Cell Biology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

5 UMR7592 CNRS, Jacques Monod Institute, Paris Diderot University, France

6 Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Institute of Genetic Medicine, International Centre for Life, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK

7 Department of Neurology, Timone Hospital, Marseille Teaching Hospital, France

8 Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, UMR75, Inserm U1127, Cnrs UMR7225, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), F-75013 Paris, France

9 National Reference Centre on Rare Dementias, AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

10 Department of Medical Genetics, Timone Hospital, Marseille Teaching Hospital, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Prof. Véronique Paquis-Flucklinger, IRCAN UMR CNRS 7284 / INSERM U1081 / UNS, School of Medicine, 28 av de Valombrose, 06107 Nice cedex 2, France
E-mail: paquis@hermes.unice.fr

Mitochondrial DNA instability disorders are responsible for a large clinical spectrum, among which amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms and frontotemporal dementia are extremely rare. We report a large family with a late-onset phenotype including motor neuron disease, cognitive decline resembling frontotemporal dementia, cerebellar ataxia and myopathy. In all patients, muscle biopsy showed ragged-red and cytochrome c oxidase-negative fibres with combined respiratory chain deficiency and abnormal assembly of complex V. The multiple mitochondrial DNA deletions found in skeletal muscle revealed a mitochondrial DNA instability disorder. Patient fibroblasts present with respiratory chain deficiency, mitochondrial ultrastructural alterations and fragmentation of the mitochondrial network. Interestingly, expression of matrix-targeted photoactivatable GFP showed that mitochondrial fusion was not inhibited in patient fibroblasts. Using whole-exome sequencing we identified a missense mutation (c.176C>T; p.Ser59Leu) in the *CHCHD10* gene that encodes a coiled-coil helix coiled-coil helix protein, whose function is unknown. We show that *CHCHD10* is a mitochondrial protein located in the intermembrane space and enriched at cristae junctions. Overexpression of a *CHCHD10* mutant allele in HeLa cells led to fragmentation of the mitochondrial network and ultrastructural major abnormalities including loss, disorganization and dilatation of cristae. The observation of a frontotemporal

dementia-amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mitochondrial disease led us to analyse *CHCHD10* in a cohort of 21 families with pathologically proven frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis. We identified the same missense p.Ser59Leu mutation in one of these families. This work opens a novel field to explore the pathogenesis of the frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis clinical spectrum by showing that mitochondrial disease may be at the origin of some of these phenotypes.

Keywords: *CHCHD10*; mitochondrial DNA instability; mitochondrial disorder; FTD-ALS

Abbreviations: ALS = amyotrophic lateral sclerosis; COX = cytochrome c oxidase; FTD = frontotemporal dementia; mitoPAGFP = mitochondria-targeted photoactivatable GFP

Introduction

Mitochondrial disorders can result from defects in mitochondrial DNA or in nuclear genes that encode proteins that are imported in the mitochondria. In recent years, a growing list of genes responsible for mitochondrial DNA instability has been reported (Copeland, 2012; Shapira, 2012; Ylikallio and Suomalainen, 2012). Mutations in these genes lead either to mitochondrial DNA depletion syndrome, a devastating mitochondrial disease of childhood associated with a significant reduction of mitochondrial DNA copy number, or disorders characterized by accumulation of multiple mitochondrial DNA deletions in post-mitotic tissues (Suomalainen and Isohanni, 2010; Copeland, 2012). Diseases associated with deletions comprise commonly known clinical presentations including progressive external ophthalmoplegia and ataxia neuropathy syndromes, but also some rare disorders (for review see Copeland, 2012). To date, nuclear genes responsible for mitochondrial DNA instability disorders mainly fall into three categories: (i) genes encoding proteins directly involved in mitochondrial DNA replication, such as *POLG*, *POLG2* or *C10orf2* (formerly known as *twinkle*); (ii) genes encoding proteins responsible for the maintenance of mitochondrial nucleotide pool, such as *TMPO* (formerly known as *TP*), *TK2*, *DGUOK*; and (iii) genes encoding membrane proteins involved in mitochondrial dynamics, such as *OPA1* or *MFN2* (Amati-Bonneau *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 2008; Rouzier *et al.*, 2012). This third category was recently individualized. Autosomal dominant optic atrophy is mainly related to mutations in the *OPA1* gene, which encodes a dynamin-like GTPase involved in the fusion of the inner mitochondrial membrane (Delettre *et al.*, 2000). *MFN2* is one of the two mitofusin proteins also required for mitochondrial fusion. *MFN1* and *MFN2* are conserved integral outer mitochondrial membrane proteins, each consisting of a large GTPase domain and 2 heptad repeat (HR), or putative coil-coiled domains, all of which face the cytoplasm (Koshiba *et al.*, 2004; Meeusen *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2009). *MFN2* mutations are a major cause of primary axonal Charcot–Marie–Tooth disease type 2A (CMT2A) (Zuchner *et al.*, 2004), an autosomal dominant neuropathy that impairs motor and sensory neurons with the longest axons resulting in earliest symptoms in distal extremities. A subset of *OPA1* missense mutations have been associated with the ‘autosomal dominant optic atrophy plus’ syndrome and with accumulation of mitochondrial DNA deletions in muscle (Amati-Bonneau *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 2008). Complex phenotypes have also been associated with

MFN2 mutations. Recently, we reported a large family with optic atrophy beginning in early childhood, associated with axonal neuropathy and mitochondrial myopathy with mitochondrial DNA deletions in adult life. The clinical presentation resembles the autosomal dominant optic atrophy plus phenotype linked to *OPA1* mutations, but is associated with a novel *MFN2* missense mutation, thus confirming the link between mitochondrial DNA stability and mitochondrial fusion (Rouzier *et al.*, 2012).

Here, we report the involvement of a novel gene responsible for ‘mitochondrial DNA breakage’ syndrome and frontotemporal lobe dementia-amyotrophic lateral sclerosis (FTD-ALS) through two families of French and Spanish origin. The responsible gene, *CHCHD10*, encodes a coiled-coil helix coiled-coil protein whose function is unknown. However, *CHCHD10* belongs to a family of mitochondrial proteins located in the intermembrane space, some of which interact with *OPA1* and are involved in cristae integrity and mitochondrial fusion (Darshi *et al.*, 2011; An *et al.*, 2012).

Materials and methods

Patients

The pedigree of the first family of French origin is shown in Fig. 1. All clinical data are summarized in Table 1. Blood and tissue samples were obtained after patients had given informed consent. The index case was a 67-year-old female (Patient IV-6), who developed a cerebellar ataxia at 50 years of age, associated with progressive bulbar syndrome, dementia and sensorineural deafness. Clinical examination showed cerebellar ataxia, Babinski sign, areflexia and bulbar palsy with dysarthria and dysphagia. Neuropsychological tests revealed a frontal lobe syndrome. Laboratory investigations showed normal lactate concentrations (1.6 mmol/l, normal <2.1 mmol/l). She died at 67 years of age.

The age of onset of the seven other patients who underwent a muscle biopsy was between 49 and 65 years. Three patients presented with a motor neuron disease, two with cerebellar ataxia and the two last patients had a motor neuron disease and a cerebellar ataxia, similar to the index case. All developed cognitive disorders with mainly a frontal lobe syndrome, except Patient V-2 who died at age 51. Neuropsychological evaluation of Patient IV-3 showed severe impairment in episodic memory, attention, verbal fluency and executive functions with behavioural changes corresponding to frontal dementia. Brain MRI of Patient V-10 was normal, and Patient IV-3 showed moderate cortical atrophy. Brain MRI performed in four other patients

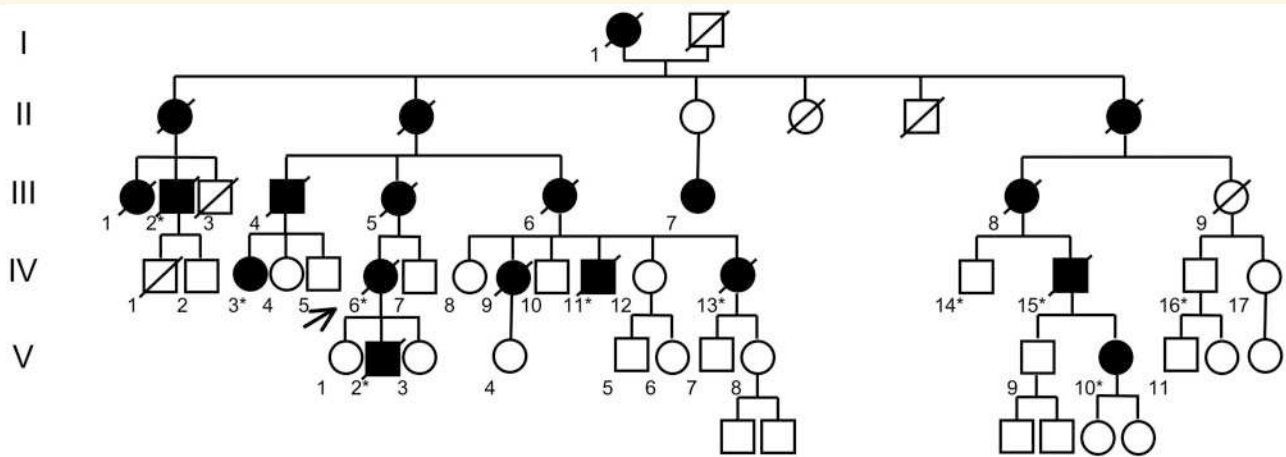


Figure 1 Pedigree of the first family. Solid symbols represent clinically affected individuals. Asterisk corresponds to individuals tested for segregation analysis.

(Patients III-2, IV-11, IV-13 and V-2) showed no specific abnormality. Proximal weakness was observed in four individuals (Patients IV-3, IV-11, IV-13 and IV-15) with bilateral ptosis and facial paresis in Patient IV-15. Electromyography excluded peripheral neuropathy with normal test (Patient V-10), chronic neurogenic changes suggesting a lower motor neuron disease (Patient IV-15) or myopathic abnormalities only (Patient IV-3). Patients IV-3 and V-10 are alive at the time of writing, all others died after >10 years of evolution.

Other affected individuals had no muscle biopsy (Patients I-1, II-1, II-2, II-6, III-1, III-4, III-5, III-6, III-7, III-8 and IV-9). They presented dementia, progressive bulbar syndrome with dysarthria and dysphagia, and became bedridden.

Muscle histopathology and ultrastructure

Muscle samples were frozen in cooled isopentane and stored in liquid nitrogen for histological and histochemical analysis including Gomori modified trichrome staining, cytochrome *c* oxidase (COX) activity, succinate dehydrogenase (SDH) activity and double COX/SDH staining according to standard protocols. A fragment of muscle was also fixed in 2% glutaraldehyde and processed for ultrastructural analysis by electron microscopy.

Oxidative phosphorylation spectrophotometric measurements

Enzymatic spectrophotometric measurements of the oxidative phosphorylation respiratory chain complexes and citrate synthase were performed at 37°C on crude muscle homogenates and fibroblasts according to standard procedures (Rustin *et al.*, 1994).

Polarographic study

Polarographic studies on fibroblasts of intact cell respiration and digitonin (0.004%) permeabilized cells mitochondrial substrate oxidation were carried out as previously described (Rustin *et al.*, 1994).

Blue native gel electrophoresis and immunoblotting

Fifteen micrograms of muscle mitochondrial respiratory complexes, obtained by solubilization in a solution of 1.5M aminocaproic acid (Sigma-Aldrich), 75mM Bis-TRIS (Sigma-Aldrich) and 4% dodecyl- β -D-maltoside (Sigma-Aldrich), were separated by blue native-PAGE on a 4–13% acrylamide gradient gel (Schägger and Pfeiffer, 2001). Samples were then electroblotted onto a PVDF membrane before sequential incubation with specific antibodies directed against GRIM19 subunit of complex I, SDHA subunit of complex II, UQCRC2 subunit of complex III, MTCO1 subunit of complex IV and ATP5A subunit of complex V (Mitosciences) allowing us to verify that samples were equally loaded between patients and controls.

Protein measurement

Proteins were measured according to Bradford microassay (Bradford, 1976).

Mitochondrial DNA molecular analysis

Total DNA was extracted using standard phenol chloroform procedure. Long-range PCR and Southern blot analysis were performed as previously described (Moraes *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 1996). Mitochondrial DNA quantification in muscle was performed by real-time quantitative PCR as described by Rouzier *et al.* (2010). Primer sequences and PCR conditions are available on request.

Sequencing of nuclear genes

The coding regions of *POLG* (NM_002693.2), *SLC25A4* (ANT1) (NM_001151.3) and *C10orf2* (Twinkle) (NM_021830.4) genes were sequenced as previously described (Naimi *et al.*, 2006). PCR products were purified with illustra™ ExoStar™ enzyme (GE Healthcare), processed with an ABI PRISM® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) and analysed on an ABI 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems).

Table 1 Clinical data of affected members

Patient	III-2	IV-3	IV-6	IV-11	IV-13	IV-15	V-2	V-10
Sex	M	F	F	M	F	M	M	F
AO (years)	?	65	50	58	60	50	50	49
AB (years)	78	68	67	63	62	75	50	50
AD (years)	† ?	-	67	70	† ?	77	51	-
Syndromic diagnosis	MND	MND + cerebellar syndrome	MND + cerebellar syndrome	MND	Cerebellar syndrome	MND + cerebellar syndrome	MND with ALS-like	Cerebellar syndrome
Cerebellar ataxia	-	+	+	-	+	+	-	+
Dysarthria	Bulbar	Bulbar	Bulbar + cerebellar	Bulbar	Cerebellar	Bulbar	Bulbar	Cerebellar
Dysphagia	Bulbar	Bulbar	Bulbar	Bulbar	-	Bulbar	Bulbar	-
Areflexia	+	+	+	?	?	+	+	+
Babinski sign	+	+	+	-	+	+	-	+
Cognitive impairment	+	+	+	+	+	+	-	+
Others	Deafness	Proximal weakness	Deafness	Proximal weakness	Proximal weakness, neurogenic bladder	Proximal weakness, ptosis, facial paresis	-	-
Muscle histology	RRF + + COX –	RRF + + COX –	RRF 30% COX – Lipid and glycogen accumulation	RRF 30% COX – 40% Lipid and glycogen accumulation	RRF 30% COX – Lipid accumulation	RRF + + COX – Lipid accumulation	RRF 20% COX – 20% Lipid accumulation	RRF + + COX – 15% Lipid and glycogen accumulation
Respiratory chain analysis	↓CI, ↓CIV(m)	↓CIII (m)	↓CI, ↓CIV (m)	↓CI, ↓CIV (m)	Not done	Normal (m)	↓CI, ↓CIII, ↓CIV, ↓CV (m)	Normal (m)
Mitochondrial DNA deletions	+ (m)	+ (m)	+ (m)	+ (m)	+ (m)	+ (m)	+ (m)	+ (m)

M = male; F = female; AO = age at onset; AB = age at biopsy; AD = age of death; † = deceased; ? = unknown; m = muscle; MND = motor neuron disease; RRF = ragged-red fibres; COX – = COX-negative fibres; ↓ = decreased; + = present; - = absent.

Cell culture

Skin punches were obtained from Patient V-10 after informed consent. Primary fibroblast cultures were established using standard procedures in RPMI supplemented with 10% foetal bovine serum, 45 µg/ml uridine and 275 µg/ml sodium pyruvate. Cultures were incubated at 37°C with 5% CO₂. For galactose conditions, medium was replaced 24 h before experiments by glucose-free medium containing 5 mM galactose and 5 mM pyruvate (Zanna *et al.*, 2008).

HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (0.1 mg/ml), 10% foetal calf serum, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. For transient transfections, HeLa cells were transfected using LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Mitochondrial network analysis

For mitochondrial staining, cells were incubated in a 100 nM solution of MitoTracker[®] red (Invitrogen) for 15 min, medium was replaced by HeLa cells culture medium incubated 2 h at 37°C and washed in PBS. The samples were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences), washed with PBS, and mounted on glass slides using ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Molecular Probes). For immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed five times with PBS and permeabilized with 2% TritonTM X-100. After PBS washing, coverslips were incubated with 5% bovine serum albumin for 30 min at room temperature before adding mouse anti-FlagM2 (Agilent Technologies) (1/2000 antibody diluted with PBS + bovine serum albumin 5%), mouse anti-HA (Cell Signaling) (1/100 antibody diluted with PBS-bovine serum albumin 5%) or rabbit anti-FlagM2 (Cell Signaling) (1/800 antibody diluted with PBS-bovine serum albumin 5%). The samples were incubated at room temperature for 1 h, PBS washed, and then incubated with fluorescent secondary antibody goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 (Life Technologies) (1/1000 antibody diluted with PBS-bovine serum albumin 1%) or antibody goat anti-rabbit Alexa Fluor[®] 647 (Life Technologies) (1/1000 antibody diluted with PBS-bovine serum albumin 1%) for 1 h at room temperature. The coverslips were washed five times with PBS, mounted on glass slides using ProLong[®] Gold Antifade Reagent (Molecular Probes) and analysed using a Zeiss LSM510 meta confocal laser-scanning microscope.

The images were deconvolved with Huygens Essential SoftwareTM (Scientific Volume Imaging) using a theoretically calculated point spread function for each of the dyes. All selected images were iteratively deconvolved with a maximum iteration scored 40 and a quality threshold at 0.05. The deconvolved images were used for quantitative mitochondrial network analysis with Huygens Essential SoftwareTM with the following standardized set of parameters: threshold = 25% and seed = 0% for each cell types and garbage = 5 or 10 for HeLa cells and fibroblasts, respectively. The quantitative data were further analysed in Microsoft Excel and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Mitochondrial network length was quantified for 35 randomly-selected individual cells.

Data are represented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed by Student's unpaired *t*-test using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

Exome sequencing

Genomic DNA was extracted from blood and 3 µg were fragmented by sonication. Exome targets were enriched with the SureSelect

Human All Exon v4+UTR – 70 Mb Kit (Agilent technologies) and sequenced on the Illumina HiSeq 2000 platform (Illumina). Raw image files were processed by the Illumina Real Time Analysis pipeline for base calling and generating the read sets. The bioinformatic analysis of sequencing data was based on the Illumina CASAVA pipeline (v1.8). CASAVA performs alignment of the 2 × 75 bp paired-end sequence reads to the hg19 reference genome, calls the SNPs based on the allele calls and read depth, and detects variants (single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions). The alignment algorithm used was ELANDv2e. Only the positions included in the bait coordinates were conserved. The web application ERIIS (Integragen) was used for data visualization and prioritization of variants.

For mutation validation and segregation analysis, a part of *CHCHD10* (NM_213720.1) spanning the mutation site in exon 2 was amplified with the following primers: 5'-TCGGGCCAGCCGGGGCTC-3' (forward); and 5'-GGAAGCCTGCCTCTAAGTGA-3' (reverse). Purification and sequencing of PCR products were performed as described above.

Homology modelling of human CHCHD10

Using the threading program PHYRE2 (Kelley and Sternberg, 2009), 142 residues of CHCHD10 (Met1 to Pro142) were modelled using CHCHD5 as template (PDB ID: 2LQL). Swiss-Pdb Viewer 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv>) was used to analyse the structural insight into CHCHD10 mutation and visualize the structure.

Plasmid constructions

The human full-length *CHCHD10* complementary DNA was amplified by reverse transcriptase PCR from total RNA of patient fibroblasts by using Transcription First strand cDNA synthesis kit (Roche) and Taq PCR[®] DNA polymerase (Invitrogen).

We used the following primers: 5'-GGATCCACCGCCGCCACCATG-3' (forward); and 5'-CTCGAGGGGCAGGGAGCTCAG-3' (reverse) containing BamHI and XhoI restriction sites, respectively. Restriction-digested PCR products were cloned into pCMV-3tag-3A to generate Flag-tagged CHCHD10. Sequencing of the clones obtained led to the identification of plasmids coding for wild-type (CHCHD10^{WT}) and mutant (CHCHD10^{S59L}) complementary DNAs.

Western blotting

Total protein extracts (5–25 µg) were separated on acrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes (Millipore). Specific proteins were detected by using mouse anti-MFN2 (1/2000, Abcam, #ab56889), anti-VDAC1 (1/2000, Millipore, #MABN504), anti-Flag M2 (1/2000, Agilent Technologies, #200412), anti-PCNA (1/5000, BD Biosciences, #610664), rabbit polyclonal anti-mitofilin (1/2000; Proteintech #10179-1-AP), anti-GAPDH (1/20 000, Abcam #ab9485), anti-β tubulin (1/10 000, Sigma-Aldrich, #T4026), anti-SMAC (1/4000, Abcam #ab8114), anti-TOM 20 (1/5000, BD Biosciences, #612278), anti-CHCHD10 (1/500, Sigma-Aldrich #HPA003440) and goat polyclonal anti-HSP60 (1/4000, Santa Cruz, #sc-1052) antibodies. Anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat secondary antibody (Dako) was used at 1/10 000 and signals were detected using a chemiluminescence system (Immobilon Western HRP Chemiluminescent substrates, Millipore). Human multiple tissue blot was used as described by the manufacturer (G-Biosciences).

Isolation of mitochondria and mitoplast preparation

Mitochondria were isolated from HeLa transfected cells using Q-Proteome mitochondria isolation kit (Qiagen) as described by the manufacturer. Mitochondria were treated with proteinase K (Invitrogen) in the presence or absence of 0.2% TritonTM X-100 as described in Bannwarth *et al.* (2012). To prepare the mitoplasts, we used a digitonin treatment. Briefly, purified mitochondria were suspended in suspension buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4). Mitochondria were treated with digitonin (2 mg/ml) for 15 min at room temperature. The resulting mitoplasts were treated for 10 min at room temperature with proteinase K (100 ng/ μ l). Proteolysis was halted by the addition of 10 mM PMSF (Sigma-Aldrich) for 15 min on ice. Laemmli sample buffer was added directly to samples, boiled and loaded on SDS-PAGE gels.

Alkali extraction of intact mitochondria

Alkali extraction was performed as previously described (Bannwarth *et al.*, 2012). Briefly, intact isolated mitochondria (25 μ g) were treated with 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5) for 30 min on ice, and then centrifuged at 16000g for 15 min at 4°C. Supernatants were retained and pellets were washed once and then resuspended in an equivalent volume of homogenization buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES-NaOH pH 7.4, plus protease inhibitor). Equivalent volumes were analysed by immunoblot.

Immunoelectron microscopy

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2 h and were processed for ultracycromicrotomy according to a slightly modified Tokuyasu method (Tokuyasu, 1973). In brief, cell suspension was spun down in 10% gelatin. After immersion in 2.3 M sucrose [in (pH 7.4), 0.1 M phosphate buffer] overnight at 4°C, the samples were rapidly frozen in liquid nitrogen. Ultrathin (70-nm thick) cryosections were prepared with an ultracycromicrotome (Leica EMFCS) and mounted on formvar-coated nickel grids (Electron Microscopy Sciences). Immunostainings were processed with an automated immunogold labelling system Leica EM IGL as follows: the grids were incubated successively in PBS containing 50 mM NH₄Cl (5 min twice), PBS containing 1% bovine serum albumin (5 min twice), PBS containing rabbit anti-CHCHD10 (Sigma-Aldrich) or anti-Hsp60 (Abcam, #ab46798) antibody in 1% bovine serum albumin for 1 h, PBS containing 0.1% bovine serum albumin (5 min, three times), PBS containing 1% bovine serum albumin and 10 nm colloidal gold conjugated protein AG (CMC), PBS containing 0.1% bovine serum albumin for 5 min, PBS for 5 min twice. Lastly, the samples were fixed for 10 min with 1% glutaraldehyde, rinsed in distilled water and were contrasted with a mixture of 1.8% methylcellulose and 0.3% uranyl acetate on ice. After having been dried in air, sections were examined under a JEOL 1400 transmission electron microscope.

Mitochondrial fusion assay

Mitochondrial fusion was examined using mitochondria-targeted photoactivatable GFP (mitoPAGFP), as described (Karbowski *et al.*, 2004). The matrix-targeted presequence from Su9 (Wakabayashi *et al.*, 2009) was fused to the N-terminus of photoactivatable GFP (Addgene #11910) and cloned into the lentiviral vector pHR-SIN

(Kim *et al.*, 2011). Fibroblasts were infected with lentiviral particles carrying mitoPAGFP. Thirty minutes before observation, fibroblasts were stained with 7 nM tetramethylrhodamine ethyl ester to visualize mitochondria. mitoPAGFP was photoactivated by 405-nm light (30% power, three times) in a small region (30 $\times$ 30 pixels) using a Zeiss 780 LSM confocal microscope with an environmentally controlled chamber. Images were taken at 15-min intervals for 60 min. Fluorescence intensity of mitoPAGFP was quantified using NIH ImageJ.

Results

Mitochondrial myopathy with multiple mitochondrial DNA deletions

Muscle biopsy was performed in eight patients after informed consent (Patients III-2, IV-3, IV-6, IV-11, IV-13, IV-15, V-2 and V-10) (Fig. 1). Muscle analysis of the index case (Patient IV-6) showed typical features of mitochondrial myopathy including intracellular lipid accumulation with COX-negative and ragged-red fibres (30%) (Fig. 2A and B). Electron microscopy showed altered morphology of mitochondria and cristae organization with paracrystalline inclusions (Fig. 2C). Similar findings with numerous ragged-red fibres and COX-deficient fibres were found in all patients tested. Spectrophotometric analysis showed a combined respiratory chain deficiency in most patients (Table 1). Blue native PAGE assay of Patients IV-3 and V-2 revealed smaller bands with antibody against complex V corresponding to assembly defect or increased instability (Fig. 2D). All patients carried multiple mitochondrial DNA deletions in muscle identified by both long range PCR (not shown) and Southern blot analysis (Fig. 2E). The determination of relative mitochondrial DNA copy number was performed by real-time quantitative PCR without finding any depletion (not shown).

Respiratory chain deficiency, abnormal mitochondrial network and mitochondrial ultrastructural alterations in patient fibroblasts

Spectrophotometric analysis of fibroblasts from Patient V-10 cultivated in glucose medium revealed no respiratory chain deficiency and polarographic analysis showed normal oxygen consumption and mitochondrial substrate oxidation (Table 2). In a glucose-free medium containing galactose, cells are forced to rely predominantly on oxidative phosphorylation for ATP production because the carbon source feeds the glycolytic pathway with a low efficiency. In galactose medium, spectrophotometric analysis revealed a multiple respiratory chain deficiency in patient fibroblasts and polarographic analysis showed a decrease of oxygen consumption, glutamate/malate and succinate (Table 2). Blue native-PAGE analysis of patient fibroblasts revealed no abnormality including complex V (not shown), the activity of which was normal by spectrophotometry. Multiple mitochondrial DNA deletions were not observed and the determination of relative mitochondrial

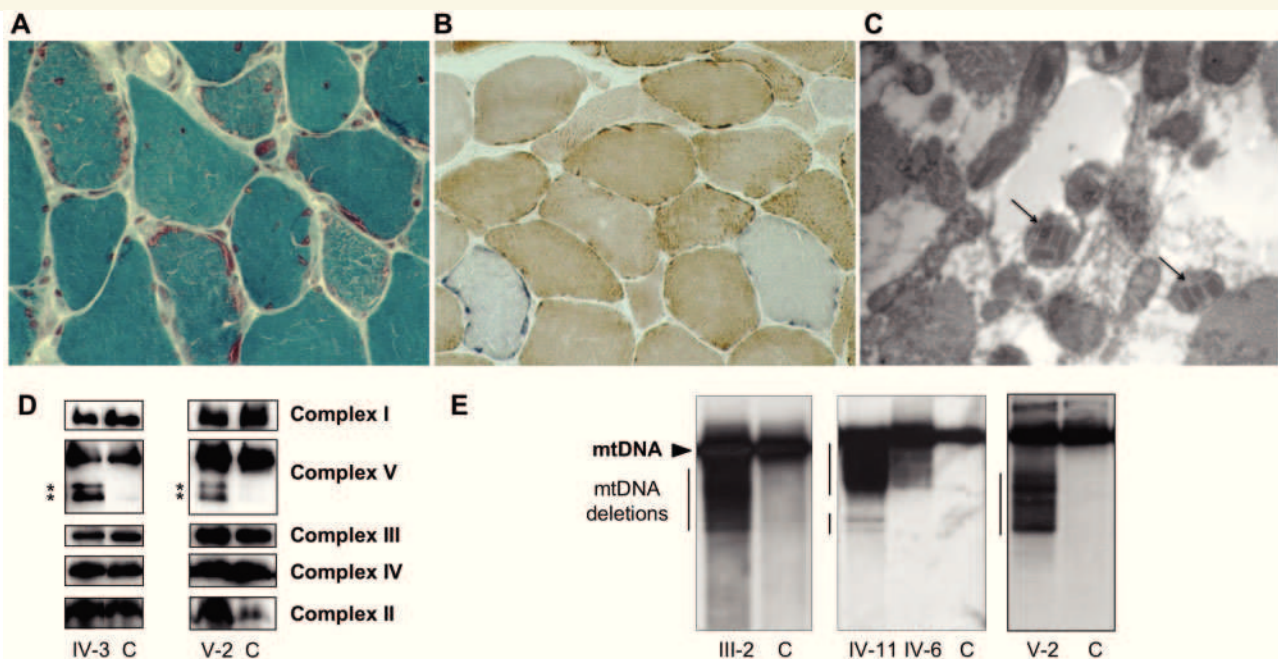


Figure 2 Muscle analysis. (A and B) Histopathology with Gomori modified trichrome (A) showing ragged-red fibres and COX/SDH stain (B) revealing COX-deficient fibres, which are recognized by the prevalent blue stain. (C) Ultrastructure of skeletal muscle showing abnormal mitochondria with crystalloid inclusions (arrows). (D) Blue native electrophoresis of muscle homogenates. Equal amounts (15 µg) of mitochondrial protein from age-matched control subjects (C) and Patients IV-3 and V-2 were subjected to blue native-PAGE, blotted onto a PVDF membrane and then incubated with specific antibodies. Asterisk corresponds to supplementary bands detected by anti-complex V antibody. (E) Southern blot analysis revealing multiple deletion bands in addition to wild-type fragments in muscle of Patients III-2, IV-11, IV-6 and V-2. C = control individual.

DNA copy number was performed by real-time quantitative PCR without finding any depletion (not shown).

We also compared the mitochondrial morphology of fibroblasts from Patient V-10 with that obtained from control fibroblasts. After staining with MitoTracker® and examination by confocal microscopy, control fibroblasts in glucose medium displayed a typical filamentous interconnected network. Patient fibroblasts presented with a fragmentation of the mitochondrial network and less connected mitochondria (Fig. 3A and B). We obtained the same results in galactose medium (not shown).

We then performed ultrastructural analysis of patient fibroblasts. Typical mitochondria of control cells had numerous, thin, well-defined cristae, running perpendicularly to the mitochondrial longitudinal axis, and with a regular pattern of parallel organization (Fig. 3C). They represented 90% of the mitochondrial profiles seen in two independent, genotype-blind, analyses of control cells. In patient cells, they represented 35% of the mitochondrial profiles. Completely disorganized mitochondria with sparse or absent cristae without recognizable parallel orientation were only observed in patient fibroblasts (18%) (Fig. 3D). Less disorganized mitochondria represented 47% of the mitochondrial pattern in patient cells and 10% in control cells (Fig. 3E).

No mitochondrial fusion defect in patient fibroblasts

The fragmentation of mitochondrial network observed in patient fibroblasts can be of different origins including a fusion

deficiency. Furthermore, genes like *MFN2* or *OPA1* involved in mitochondrial fusion are responsible for complex neurological phenotypes associated with mitochondrial DNA deletions. To examine mitochondrial fusion, we expressed matrix-targeted photoactivatable GFP in control and patient fibroblasts (Karbowski *et al.*, 2004). After photoactivation of mitoPAGFP in a portion of mitochondria, we monitored mixing of the fluorescent matrix marker. We found that the fluorescence intensity of mitoPAGFP similarly decreased for 60 min in both fibroblasts, suggesting that mitochondrial fusion is not inhibited in patient fibroblasts (Fig. 4).

Identification of a missense mutation in the CHCHD10 gene by exome sequencing

Analysis of genes involved in multiple mitochondrial DNA deletions with a compatible phenotype (*POLG*, *SLC25A4*, *C10orf2*) revealed no mutation. To identify the causative gene, we sequenced the exome of Patients IV-11 and V-10. The procedure yielded 9.8 and 12.4 Gb of mappable sequence and after alignment to the hg19 reference genome, the average depth was $\sim 70\times$ and $\sim 91\times$, respectively. From the 62 252 and 63 036 identified single nucleotide polymorphisms in Patients IV-11 and V-10, respectively, the pathogenic variant was identified by the following scheme: (i) selection of heterozygous variants shared by the two patients; (ii) exclusion of polymorphic variants present in dbSNP132, EVS

Table 2 Respiratory chain analysis in patient fibroblasts

Spectrophotometric analysis on fibroblasts						
Enzymatic activities	I	II	III	IV	V	CS
Glucose medium						
Control values (nmol/min/mg of proteins)	9.0–27.1	18.5–54.0	57.4–176.2	109.9–350.0	22.0–46.2	74.7–161.1
Patient V-10	16.8	29.7	112.3	202.7	29.7	125.6
Galactose medium						
Control values (nmol/min/mg of proteins)	15.2–19.4	28.2–33.1	88.8–116.4	181.7–315.4	22.7–32.1	124.8–223.0
Patient V-10	10.0	26.7	60.2	167.1	28.2	177.0
Oxygraphic analysis on fibroblasts						
Glucose medium						
	Oxygen consumption					
	Intact cells	Digitonin permeabilized cells				
		Glutamate + malate	Succinate	G3P		
Control values (nmol O ₂ /min/mg of proteins)	5.90–13.80	8.00–16.60	8.00–15.80	4.90–13.50		
Patient V-10	9.40	15.36	9.40	7.04		
Galactose medium						
	Oxygen consumption					
	Intact cells	Digitonin permeabilized cells				
		Glutamate + malate	Succinate	G3P		
Control values (nmol O ₂ /min/mg of proteins)	5.58–8.25	8.16–9.91	8.60–9.76	5.22–12.91		
Patient V-10	4.66	6.22	7.82	8.31		

Spectrophotometric and polarographic analysis of the respiratory chain enzyme activities in patient fibroblasts in glucose and in galactose medium. CS = citrate synthase; G3P = glycerol 3-phosphate. Results are expressed as extreme absolute values or absolute values for controls or patients, respectively. Values are expressed in nanomols of substrate per minute per milligram of proteins (lowered values are in bold).

(Exome Variant Server), HapMap, 1000 Genome databases and in-house control exomes; and (iii) segregation analysis within the family. This filtering led us to identify a single heterozygous missense mutation (c.176C>T; p.Ser59Leu) in exon 2 of *CHCHD10* that was present in the eight patients tested and was absent in two healthy individuals (Subjects IV-14 and IV-16) with normal neurological examination at 79 and 69 years, respectively (Fig. 5A and B). This gene encodes the coiled-coil helix coiled-coil domain-containing protein 10 whose function is unknown. However, the C-terminal CHCH domain is primarily seen in mitochondrial proteins and was known to be involved in the protein import and metal binding in the intermembrane space (Banci *et al.*, 2009). The mutation changes a highly conserved serine into a leucine and was not present in 200 ethnically and geographically matched control alleles (Fig. 5C). *In silico* study by PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) and Mutation Taster (<http://www.mutation-taster.org/>) predicted this variant to be probably damaging.

The CHCH domain of *CHCHD10* is characterized by a CX₉C motif. Although all CX₉C proteins presumably preserve a disulphide bonded α -hairpin conformation, they have a large range of sequence lengths and a very low degree of sequence similarity both within or specific organism and the orthologues of different species (Longen *et al.*, 2009; Cavallo, 2010). Therefore, these features do not allow us to easily predict accurate structural models for this

protein family. Recently, Banci *et al.* (2012) have structurally characterized two members, *CHCHD5* and *CHCHD7*, in their fully oxidized states (Banci *et al.*, 2012). Using the same program, 142 residues of *CHCHD10* (Met1 to Pro142) were modelled using *CHCHD5* as a template (PDB ID: 2LQL). Swiss-Pdb Viewer 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv>) was used to analyse the *CHCHD10* mutation and visualize the structure. The modelling of *CHCHD10* shows: (i) a non-structured N-terminal region; (ii) a highly hydrophobic helix (Gly43 to Ala68), which may typically be an interface of interaction with an interacting protein; and (iii) the CHCH domain near the C-terminal region characterized by a CX₉C motif (Fig. 5D). The four cysteine residues (102, 112, 122 and 132) of the CHCH domain are involved in two disulphide bonds. The p.Ser59 is located in the hydrophobic N-terminal α -helix, and as the few other polar residues of this helix, it may intervene in hydrogen bonds to stabilize *CHCHD10* interaction with another protein. Thus, the p.Ser59Leu mutation could possibly alter protein–protein interactions.

To investigate whether the p.Ser59Leu mutation has an effect on the expression of *CHCHD10*, we analysed *CHCHD10* level in muscle of patients by western blotting. We used GAPDH and the mitochondrial SMAC protein (now known as DIABLO) as controls for quantitation. Normalization showed no significant reduction of *CHCHD10* expression in patient muscles compared to control (not shown).

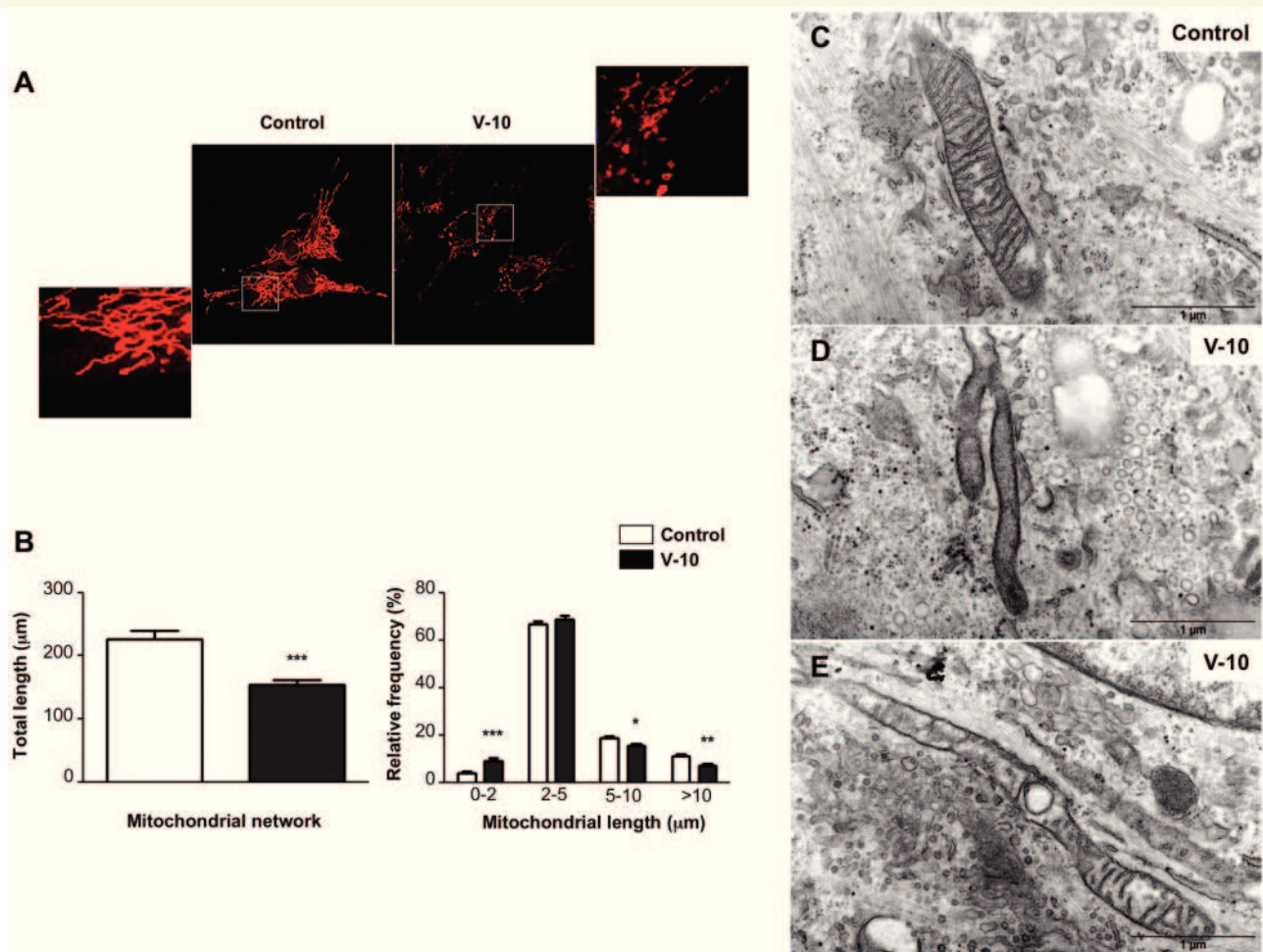


Figure 3 Mitochondrial fragmentation and ultrastructural alterations in skin fibroblasts. (A) Cells obtained from a control (*left*) and Patient V-10 (*right*) were analysed by confocal microscopy using MitoTracker® Red. Enlarged details of the areas are indicated. (B) Mitochondrial phenotypes showed in A were quantified for 35 randomly-selected individual cells per each studied fibroblast cell line from two independent experiments. The data obtained were used to calculate the total length of the mitochondrial network per cell (*left*) and the average mitochondrial fragment length (*right*). Differences between the two cell lines were analysed by Student's *t*-test: significant ($*0.05 > P > 0.01$), very significant ($**0.01 > P > 0.001$) or extremely significant ($***P < 0.001$). (C–E) Ultrastructural analysis of control (C) and Patient V-10 (D and E) fibroblasts. Scale bar = 1 μm (C) Representative image of mitochondria with typical normal aspect found in control cells. (D) Complete mitochondrial disorganization only found in patient cells. (E) Moderate disorganization mainly found in patient cells.

CHCHD10 is a mitochondrial protein located in the intermembrane space

First, we looked at the expression of CHCHD10 in human tissues by western blot. The protein is ubiquitous and highly expressed in organs with high mitochondrial content such as the heart or liver (Fig. 6A). Confocal microscopic analysis showed a co-localization, in HeLa cells, of endogenous CHCHD10 with MitoTracker®, a dye that accumulates specifically in mitochondria (Fig. 6B). To analyse sub-mitochondrial localization of CHCHD10, mitochondria isolated from HeLa cells were treated with proteinase K. Proteins inside mitochondria are protected from protease digestion. As shown in Fig. 6C, CHCHD10 was resistant to treatment with proteinase K indicating that the protein is present inside mitochondria. As expected, the TOMM20 protein (outer mitochondrial

membrane) was digested by proteinase K whereas SMAC (intermembrane space) was resistant to protease digestion. Analysis of the mitochondrial preparations for PCNA and GAPDH confirmed the absence of nuclear and cytosolic contaminations, respectively. When mitochondria were subjected to alkali extraction, peripheral membrane proteins were recovered in the supernatant, whereas integral membrane proteins were found in the membrane-containing pellet fractions (Fig. 6D). As expected, the outer membrane integral protein VDAC1 was primarily recovered in the pellet after extraction whereas SMAC was recovered in the supernatant. CHCHD10 was distributed in the supernatant indicating that it was located in the soluble fraction. Last, to discriminate between intermembrane space or matrix localization, mitochondria were treated with digitonin to open the inner membrane space. In the resulting mitoplasts,

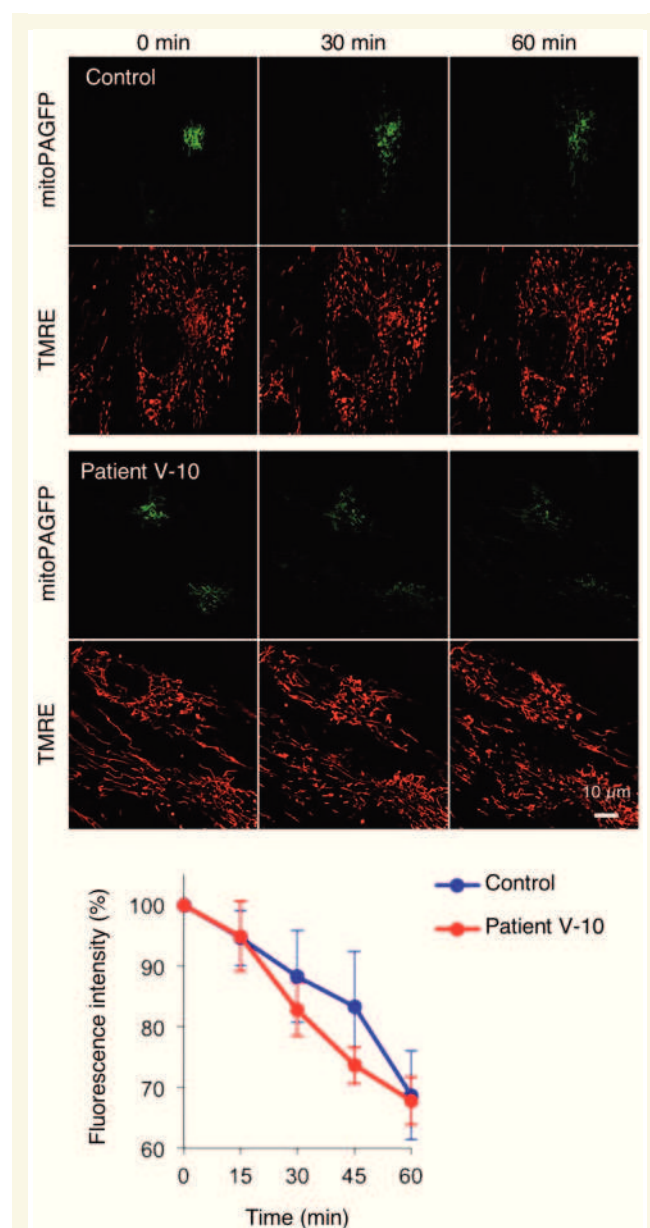


Figure 4 Fusion analysis in patient fibroblasts. Control and patient fibroblasts expressing mitochondria-targeted photoactivatable GFP (mitoPAGFP) were stained with 7 nM tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE). mitoPAGFP was photoactivated with a 405-nm laser in a small region of cells (30×30 pixels) at 0 min. Fibroblasts were observed with 15-min intervals for 60 min. Fluorescence intensity of mitoPAGFP was quantified using NIH ImageJ. Values represent the mean $\pm$ SEM ($n = 7$ for controls and $n = 9$ for patients).

CHCHD10 was degraded by proteinase K like MFN2 (outer mitochondrial membrane), SMAC (intermembrane space) and IMMT, an inner mitochondrial membrane protein mainly facing the intermembrane space, whereas HSPD1 (Hsp60), which is located in the mitochondrial matrix, was protected against protease digestion (Fig. 6E). All these results suggest that CHCHD10 is an intermembrane space protein.

CHCHD10 is enriched at cristae junctions

We performed immunogold labelling of chemically fixed cryosectioned HeLa cells (Fig. 7A). The sections were labelled with a primary antibody against CHCHD10, followed by a secondary gold conjugate. For quantitative analysis, we determined the location of each gold particle ($n = 229$) with respect to the inner boundary membrane and the closest cristae membrane and plotted its respective localization in a model (Fig. 7B). We found that the majority of mitochondrial gold particles were enriched in the vicinity of cristae junctions as reported previously for IMMT, a major component of the MINOS (mitochondrial inner membrane organizing system) complex (Jans *et al.*, 2013). We performed the same experiment with a primary antibody against HSPD1 (Hsp60), a protein highly expressed in the matrix, as a control (Fig. 7C and D).

Expression of CHCHD10 mutant leads to fragmentation of the mitochondrial network and to defect in cristae maintenance

To confirm the role of the p.Ser59Leu mutation, we analysed the effects of overexpression of the pathogenic allele on mitochondrial network. HeLa cells were transiently transfected with the empty vector, the wild-type allele or the pathological allele. After transfection, HeLa cells produced equivalent amounts of wild-type and mutant CHCHD10 (Fig. 8A). Mitochondrial network morphology and CHCHD10 labelling were next assessed using MitoTracker[®] red and CHCHD10 antibodies, respectively. Forty-eight hours after transfection with either empty vector or the wild-type allele, MitoTracker[®] revealed a filamentous network. Overexpression of mutant CHCHD10^{S59L} altered mitochondrial morphology in transfected cells with a significant fragmentation of the network (Fig. 8B and C). We also looked at the mitochondrial morphology by electron microscopy. Contrary to overexpression of either empty vector or the wild-type allele, overexpression of the CHCHD10^{S59L} mutant led to major abnormalities including loss, disorganization or dilation of cristae. Matrix condensation was also observed in numerous mitochondria (Fig. 9A–D).

Involvement of the same CHCHD10 mutation in a frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis family

The observation of a FTD-ALS phenotype in a mitochondrial disease led us to analyse CHCHD10 in a cohort of 21 FTD-ALS families previously tested by exome sequencing. We identified the heterozygous c.176C>T (p.Ser59Leu) mutation in a patient whose family is originally from Catalonia (Spain). This male patient developed walking difficulties at 57 years of age. Progressively, he presented a pseudobulbar syndrome with dysarthria and dysphagia. Electromyography confirmed motor neuron involvement with symmetrical denervation predominant in muscles of the face but

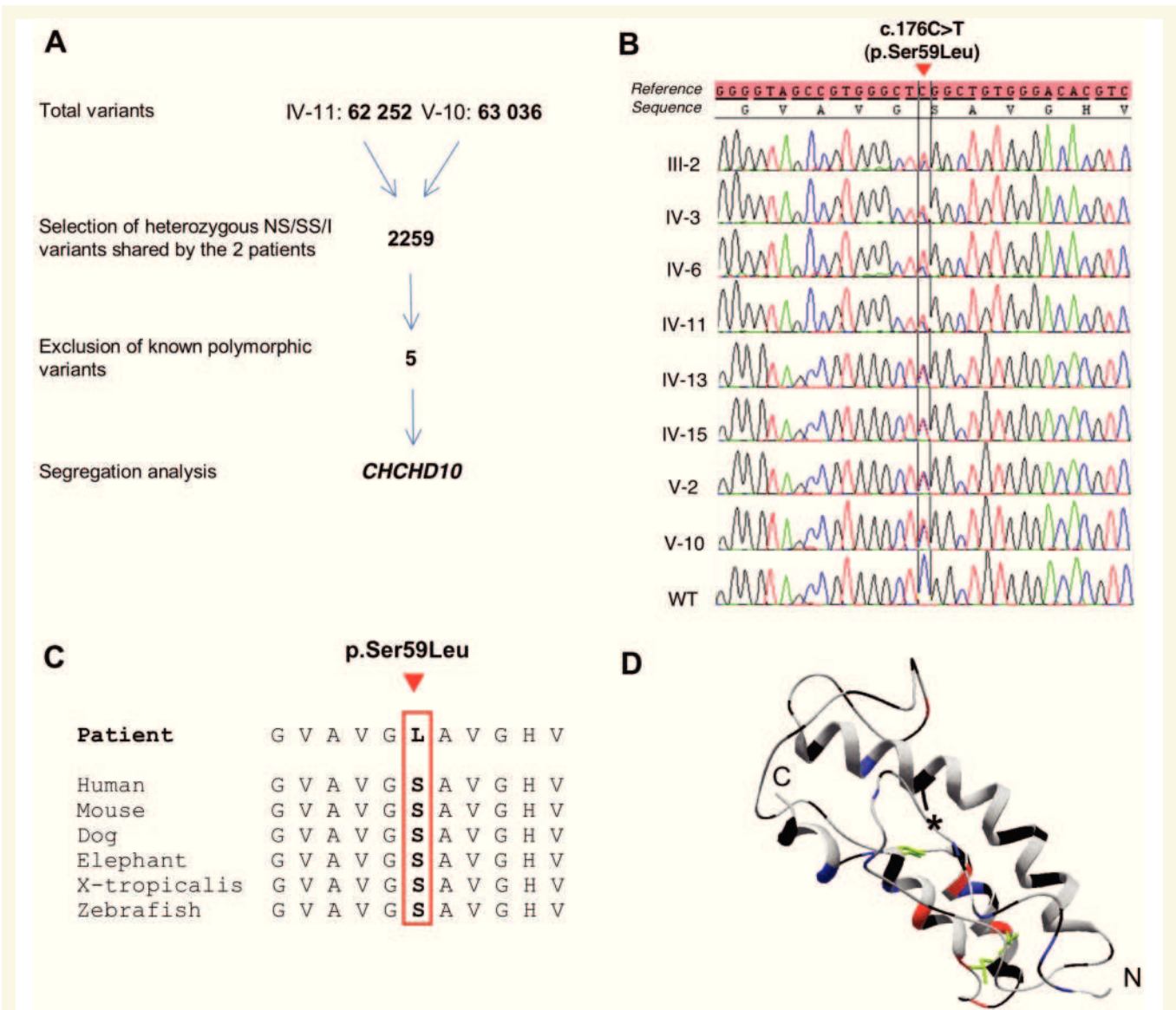


Figure 5 Identification of the p.Ser59Leu mutation in *CHCHD10*. (A) Schematic representation of the exome data analysis and data filtering. NS = non-synonymous variants; SS = splice site disrupting single nucleotide variants; I = exonic indels. Known variants correspond to single nucleotide polymorphisms and Indels already reported in dbSNP132, EVS (Exome Variant Server), HapMap, 1000 Genome databases and in-house control exomes. (B) *CHCHD10* mutation sequences in Patients III-2, IV-3, IV-6, IV-11, IV-13, IV-15, V-2, V-10 and a control (WT). (C) Cross-species protein conservation of *CHCHD10*, flanking the altered amino acid p.Ser59. (D) Model of *CHCHD10* based on the *CHCHD5* structure (PDB ID: 2LQL). Aliphatic, polar, basic and acidic residues are respectively in grey, black, blue and red. Disulphide bonds are in green. The polar residue Ser59 is indicated with an asterisk.

also in muscles of upper and lower limbs. Motor and sensory conduction velocities were normal. The patient also had cognitive impairment and behavioural changes suggesting a frontotemporal dementia. Neuropsychological testing revealed a frontal lobe dysfunction, notably impairment of conceptualization, perseverative behaviours and paraphasia with relative preservation of memory. Brain MRI showed mild bilateral frontal atrophy. Parkinsonian signs were also present with akinesia, rigidity and gait disorders and a Unified Parkinson's Disease Rating Scale at 10. In addition, the patient presented bilateral sensorineural

hypoacusia and a muscular fatigability. A total loss of autonomy was observed after 8 years of evolution, before a loss of sight. The elder sister and one brother of the index case presented with ALS with predominant bulbar features and died after 4 years of evolution. Their father developed a neurological disease with progressive walking and speaking difficulties at 61 years of age leading to death 3 years later. No patient had a muscle biopsy. The presence of the mutation was confirmed by Sanger method in the index case but the absence of DNA samples from other family members did not allow us to perform segregation analysis.

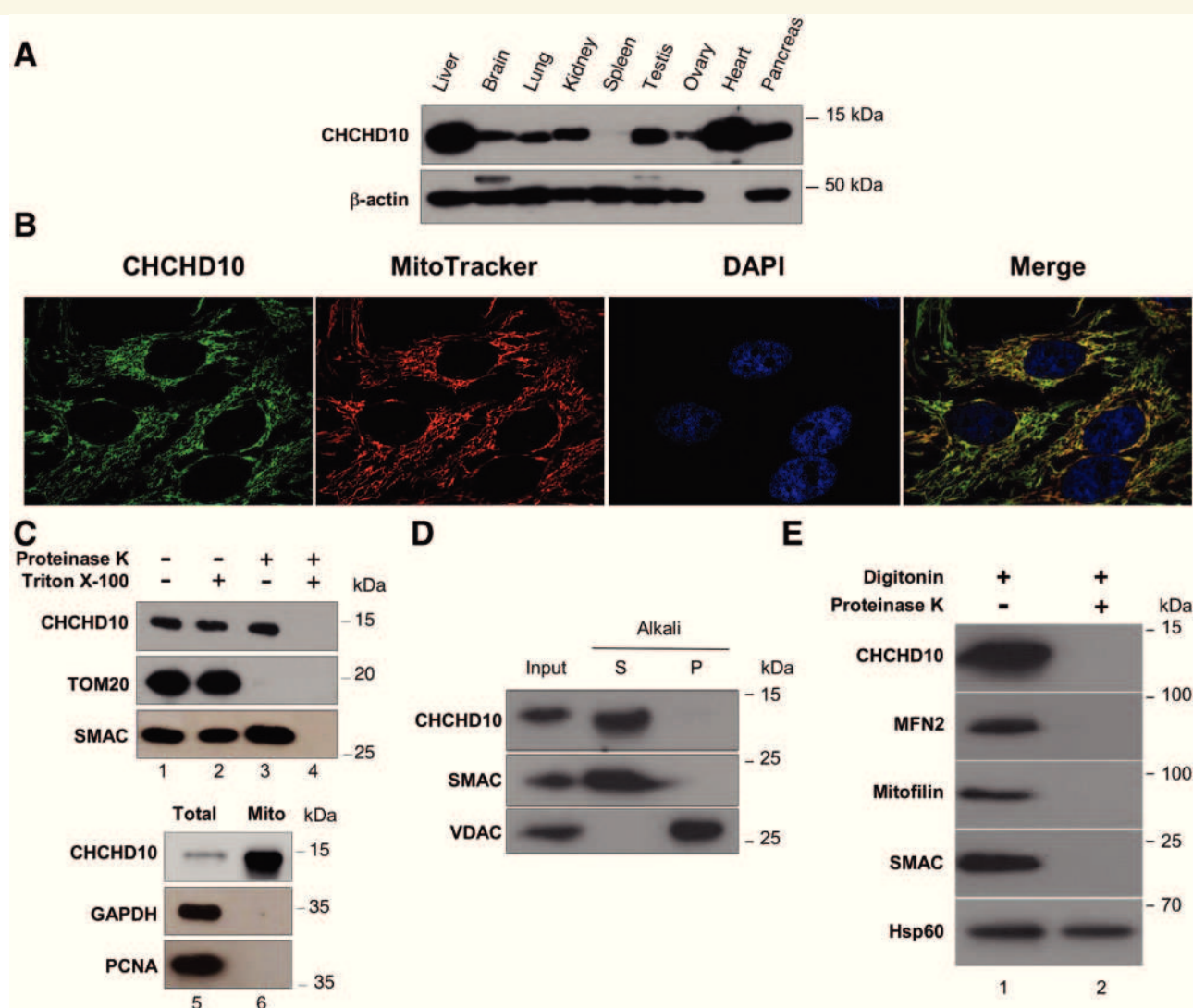


Figure 6 Mitochondrial localization of CHCHD10. **(A)** Expression of CHCHD10 protein in human tissues analysed by western blotting using human multiple tissue blot. **(B)** Co-localization of endogenous CHCHD10 protein with MitoTracker[®] Red indicating mitochondrial localization for CHCHD10 in HeLa cells (overlay in yellow). **(C)** Intact isolated mitochondria from HeLa cells (lanes 1–4) were incubated in presence (+) or in absence (-) of proteinase K or Triton[™] X-100 before analysis by immunoblotting using antibodies against CHCHD10, TOMM20 (mitochondrial outer membrane protein) or SMAC (mitochondrial intermembrane space protein). To verify the purity of isolated mitochondria, total lysates (lane 5) and mitochondrial isolates (lane 6) were analysed by immunoblotting using antibodies against CHCHD10, GAPDH (cytosolic protein) or PCNA (nuclear protein). **(D)** Intact mitochondria were prepared and subjected to Na₂CO₃ extraction. A soluble protein fraction (S) and an integral membrane protein fraction (P) were prepared. Samples of an extract from intact mitochondria (input), and the fraction of each extraction were subjected to western blot analysis. VDAC1 and SMAC were used to identify behaviours of well-defined mitochondrial proteins that are integral membrane protein and soluble, respectively. **(E)** Isolated mitochondria from HeLa cells (lanes 1 and 2) were incubated in presence (+) or in absence (-) of digitonin or proteinase K before analysis by immunoblotting using antibodies against CHCHD10, MFN2 (outer membrane protein), mitofilin (inner membrane protein mainly facing the intermembrane space, now known as IMMT), SMAC (intermembrane space protein) or Hsp60 (mitochondrial matrix protein, HSPD1).

Discussion

In this study, we first identified a new gene involved in mitochondrial DNA instability disease. We describe a large family in which affected individuals carry a missense mutation in the *CHCHD10* gene. The clinical phenotype associated with this *CHCHD10* mutation is unusual because patients developed a late-onset disease,

which begins around age 50, with highly variable clinical presentations. Affected individuals presented with either isolated or associated symptoms including ataxia, dementia and ALS-like presentation; the only element common to all patients being the presence of a mitochondrial myopathy with numerous ragged-red and COX-negative fibres associated with multiple mitochondrial DNA deletions. None of the affected individuals presented with

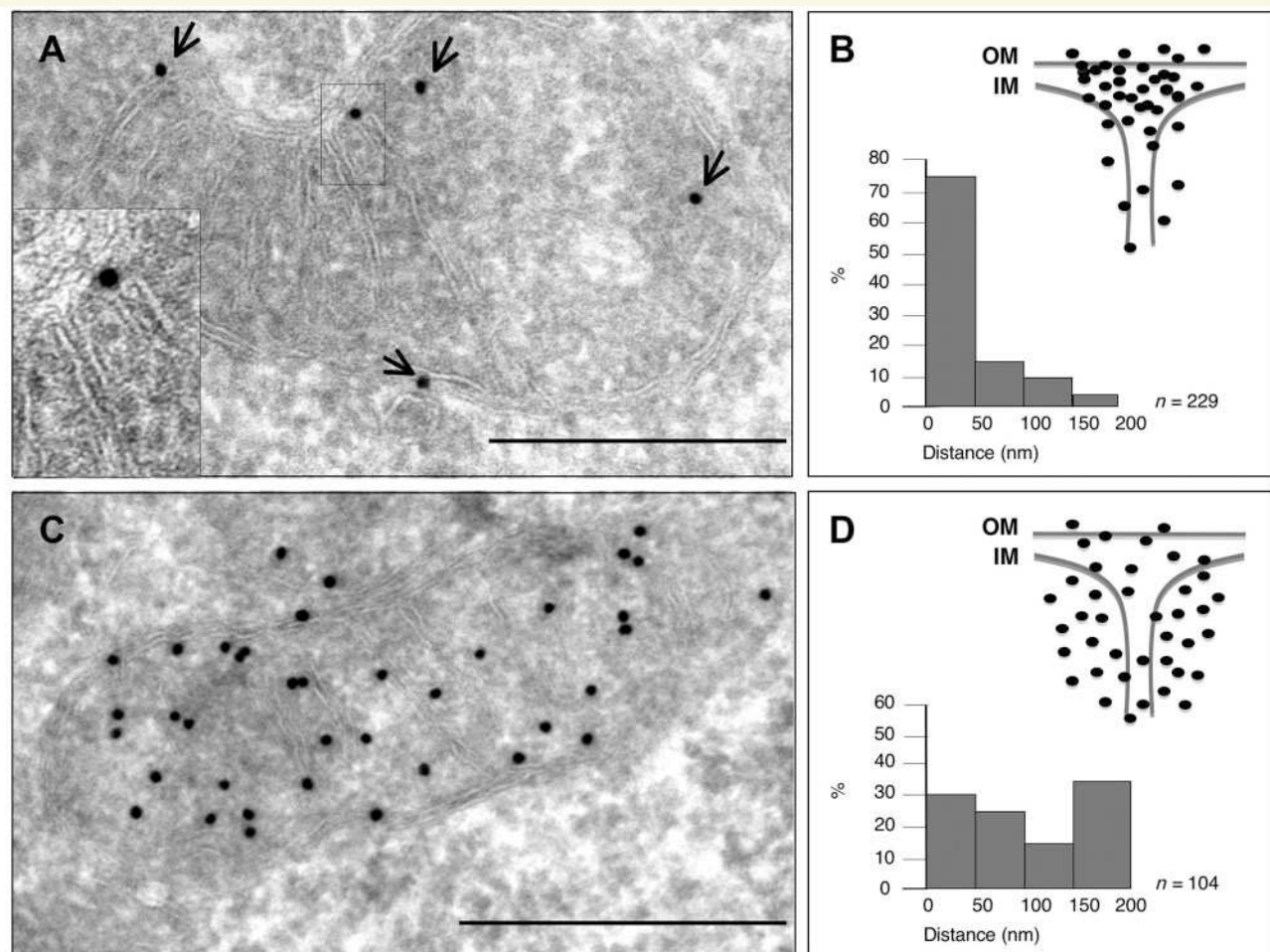


Figure 7 Submitochondrial localization of CHCHD10 using immunoelectron microscopy. (A) Immunogold labelling of CHCHD10 in HeLa cells. Arrows point to the position of gold particles. Enlarged details of the areas are indicated by black boxes. Scale bar = 500 nm. (B) Localization of the gold particles as determined by immunogold labelling of CHCHD10 plotted on a scheme representing a part of a mitochondrion. OM = outer membrane; IM = inner membrane. The histogram shows the fraction of gold particles within the indicated distance to the cristae junction. The histogram and the graphical representation are based on the same measured gold particle localizations. (C) Control immunogold labelling of Hsp60 in HeLa cells. Scale bar = 500 nm. (D) Localization of the gold particles as determined by immunogold labelling of Hsp60 plotted on a scheme representing a part of a mitochondrion. The histogram shows the fraction of gold particles within the indicated distance to the cristae junction. The histogram and the graphical representation are based on the same measured gold particle localizations.

an external ophthalmoplegia. One patient (Patient IV-15) only presented with a ptosis associated with facial palsy, probably due to motor neuron disease. In this family, the phenotype is really particular compared to those reported in mitochondrial DNA instability disorders. The course of the disease was highly variable, ranging from 1 to >15 years of evolution before death. However, it was more severe than the progressive external ophthalmoplegia phenotypes classically observed in pedigrees with autosomal dominant transmission of multiple mitochondrial DNA deletions (Copeland, 2012). Cerebellar ataxia is exceptionally observed in the absence of progressive external ophthalmoplegia in mitochondrial DNA instability disease, except in MIRAS (mitochondrial recessive ataxic syndrome) or MSCAE (mitochondrial spinocerebellar ataxia and epilepsy) phenotypes (Copeland, 2012), secondary to *POLG* mutations, or in IOSCA (infantile onset spinocerebellar ataxia) (Hakonen *et al.*, 2007), secondary

to *C10orf2* (twinkle) mutations. Motor neuron disease with ALS-like symptoms is even rarer with exceptional cases associated with *POLG*, *TK2* or *DGUOK* mutations (Ronchi *et al.*, 2012). The cognitive impairment observed in our family resembles FTD usually observed in patients with ALS. This observation led us to analyse *CHCHD10* in FTD-ALS families with a dominant mode of transmission and to identify the same missense p.Ser59Leu mutation in one of these families. FTD-ALS is a genetically heterogeneous disorder and a hexanucleotide repeat expansion in a non-coding region of the *C9orf72* gene, the function of which is unknown, has been recently identified as a common cause of FTD-ALS (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011). Patients with a *C9orf72* expansion present with FTD, ALS, or both. Parkinsonism is common and the phenotype of our second family was highly evocative of a *C9orf72* expansion. However, *C9orf72* screening and the analysis of other candidate genes for

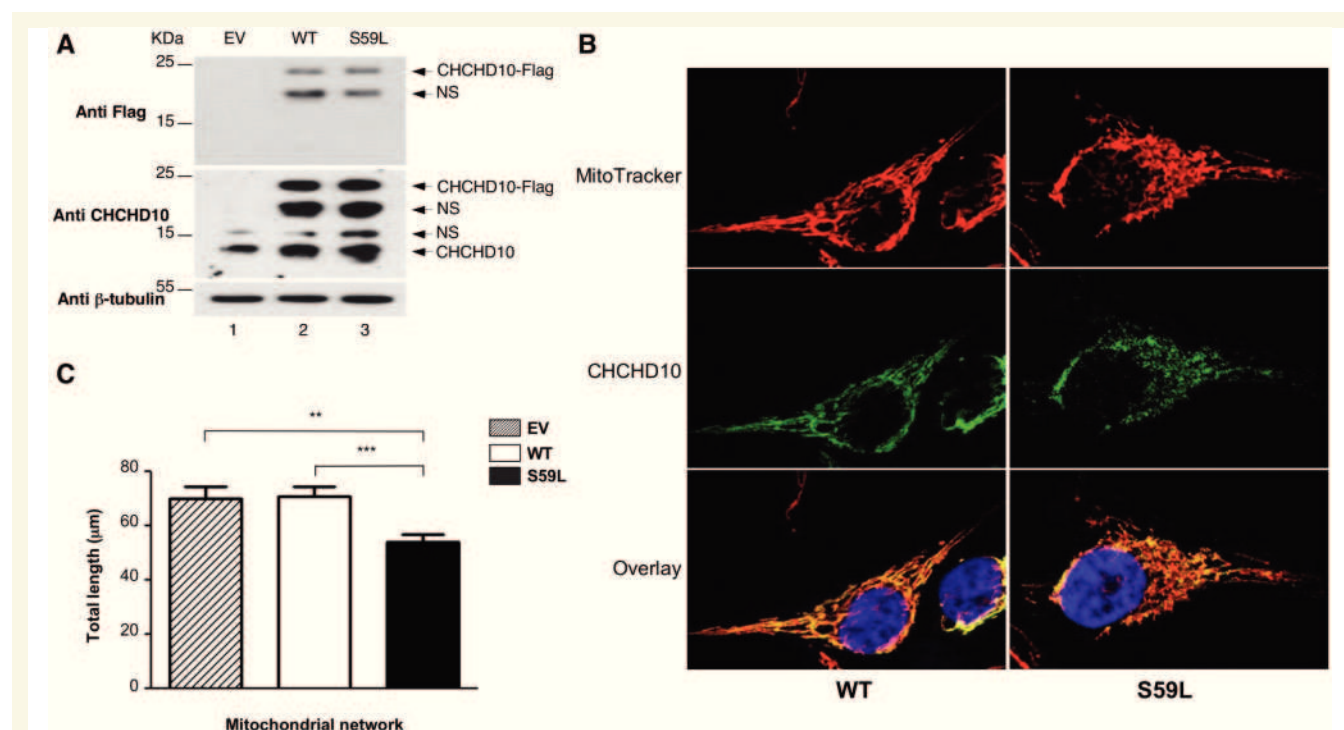


Figure 8 Effects of overexpression of wild-type and pathogenic *CHCHD10* alleles on mitochondrial network in HeLa cells. Transfections were performed with empty vector (EV) or vectors encoding either wild-type *CHCHD10*-Flag (WT) or mutant *CHCHD10*-Flag (S59L). (A) Western blot of HeLa cell extracts using antibodies against Flag, *CHCHD10* or β -tubulin. NS = non-specific. (B) Analysis of DAPI (blue), MitoTracker[®] (red) staining and *CHCHD10* (green) immunolabelling by fluorescence microscopy in HeLa cells transfected with either wild-type *CHCHD10*-Flag (WT) or mutant *CHCHD10*-Flag (S59L). (C) Quantification of mitochondrial phenotypes of cells transfected with empty vector (EV) or vectors encoding either wild-type *CHCHD10*-Flag (WT) or mutant *CHCHD10*-Flag (S59L). Thirty-five randomly-selected individual cells per each transfection were analysed from two independent experiments. The data obtained were used to calculate the total length of the mitochondrial network per cell. Differences between the two cell lines were analysed by Student's *t*-test: very significant (**: 0.01 > *P* > 0.001) or extremely significant (***: *P* < 0.001).

ALS and FTD were negative in this family (*TARDBP*, *FUS/TLS*, *SOD1*, *VCP*, *CHMP2B*, *ANG*, *SQSTM1*, *UBQLN2*, *PFN1*). No patient had a muscle biopsy, but it is likely that sensorineural hypoaacusia and muscle weakness observed in the index case were related to mitochondrial dysfunction. Our study clearly shows that *CHCHD10* is a novel gene responsible for ALS-FTD clinical spectrum, which raises the intriguing prospect of an underlying mitochondrial basis for this group of disorders.

The function of *CHCHD10* is unknown. However, it belongs to a family of mitochondrial proteins characterized by conserved CX_nX motifs (Banci *et al.*, 2009) and it is expected to be involved in oxidative phosphorylation (Martherus *et al.*, 2010). These proteins are incorporated into the intermembrane space and are then trapped through a redox-dependent protein machinery through the intermembrane space protein Mia 40 (*CHCHD4*) (Stojanovski *et al.*, 2012). *CHCHD3* is a member of this family predominantly localized to the inner membrane, facing toward the intermembrane space (Darshi *et al.*, 2012). It is part of the large protein complex called MINOS and plays a role in maintaining mitochondrial function and cristae integrity (Darshi *et al.*, 2011; van der Laan *et al.*, 2012). OPA1 has been shown to be involved in regulating cristae remodelling independently of its role in mitochondrial fusion (Frezza *et al.*, 2006). *CHCHD3* interacts both with

OPA1 and mitofilin suggesting that it is a scaffolding protein that stabilizes complexes involved in maintaining cristae architecture (Darshi *et al.*, 2011). Another member of this family, *CHCM1/CHCHD6*, is critical for maintaining the cristae morphology, ATP production and oxygen consumption. It has the same localization than *CHCHD3* and strongly interacts with IMMT (An *et al.*, 2012). Here, we show that *CHCHD10* is a mitochondrial protein, located in the intermembrane space. Unlike *CHCHD3* and *CHCHD6* (also known as *CHCM1*), which are inner membrane-associated proteins, *CHCHD10* is a soluble protein. By electron microscopy, we also show that it is enriched at cristae junctions, like IMMT, suggesting that it could be another factor in maintaining cristae morphology. The cristae alterations found both in patient fibroblasts and HeLa cells overexpressing *CHCHD10*^{S59L} mutant are also in favour of this hypothesis. There is strong evidence that the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, apart from its enzymatic activity, plays a major role in determining the structure of cristae (Zick *et al.*, 2009). The regular arrangement of this highly abundant protein complex might serve as a kind of backbone stabilizing tubular cristae structures. On the contrary, we could ask whether the abnormal pattern observed for F₁F₀-ATP synthase by blue native-PAGE analysis in the muscle of patients is not secondary to an abnormal organization of cristae

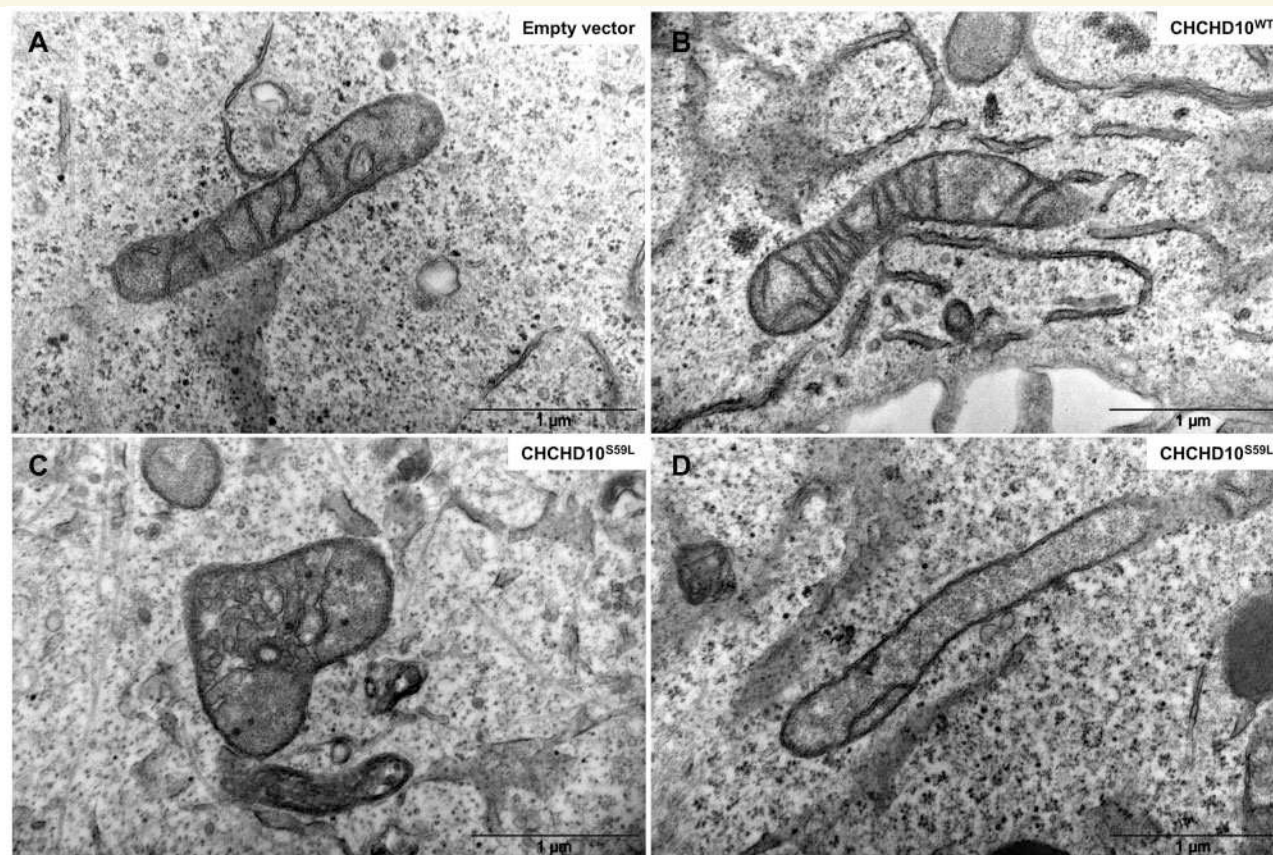


Figure 9 Effects of overexpression of wild-type and pathogenic CHCHD10 alleles on cristae morphology in HeLa cells. (A) Representative image of mitochondria after transfection with the empty vector. (B) Representative image of mitochondria in cells overexpressing the wild-type CHCHD10 allele. (C and D) Representative images of mitochondria in cells overexpressing the mutant CHCHD10 allele (S59L).

linked to the p.Ser59Leu mutation. Furthermore, this mutation leads to a respiratory chain deficiency both in muscle and fibroblasts of patients suggesting that CHCHD10 is critical for maintaining ATP production and oxygen consumption. It has been shown that cristae shape regulates respiratory chain supercomplexes' stability and assembly with an impact on mitochondrial respiratory efficiency, thus suggesting that shape of biological membranes can influence membrane protein complexes (Cogliati *et al.*, 2013). Further experiments will be necessary to determine whether these effects of CHCHD10 mutant are linked to destabilization of cristae morphology.

Downregulation of both CHCHD3 and CHCHD6 in HeLa cells resulted in fragmentation and clustering of the mitochondrial network (Darshi *et al.*, 2011; An *et al.*, 2012). This could indicate either increased fission or decreased fusion in knock-out cells. Studies with the dominant negative mutant of Drp1, DRP1^{K38A}, which blocks fission, suggested that the mitochondria in CHCHD3 knock-out cells have impaired fusion activity (Darshi *et al.*, 2011). Fibroblasts of patients carrying the CHCHD10 mutated allele presented a fragmentation of the mitochondrial network and less connected mitochondria. However, a direct assay with a photo-activatable mitochondrial form of GFP did not find a mitochondrial fusion defect in patient fibroblasts. The accumulation of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle can be secondary to an

increase in mitochondrial DNA damage, a defect in mitochondrial DNA repair and/or a failure to clear mitochondria with damaged DNA (Chen and Chan, 2010). Recently, we have shown that fibroblasts bearing a MFN2 mutation, responsible for optic atrophy 'plus' phenotype with mitochondrial DNA multiple deletions, have a lower capacity to repair stress-induced mitochondrial DNA lesions compared to control cells (Rouzier *et al.*, 2012). It is likely that the defect in mitochondrial DNA repair that we observed is due to defective fusion, which leads to a variability in repair protein content across the mitochondrial population, thus contributing to mitochondrial DNA instability. Mitochondrial DNA instability found in patients carrying the p.Ser59Leu CHCHD10 mutation cannot be explained by a fusion deficiency. However, mammalian cells contain thousands of copies of mitochondrial DNA assembled into hundreds of nucleoids that are closely associated with the inner membrane and often appear to be wrapped around cristae or crista-like inner membrane invaginations (Brown *et al.*, 2011). One cannot exclude that cristae alterations secondary to CHCHD10^{S59L} expression lead to nucleoid structure disorganization and contribute to defect of mitochondrial DNA maintenance.

In conclusion, our study has provided strong supporting evidence that the CHCHD10 protein plays a role in the maintenance of mitochondrial cristae morphology and mitochondrial DNA stability. Additional work will be needed to clarify the pathogenic

mechanisms linking *CHCHD10* mutations with these downstream deleterious consequences and ultimately, the observed neurodegenerative phenotype. Moreover, this work opens a novel field to explore the pathogenesis of FTD-ALS clinical spectrum by showing that mitochondrial disease may be at the origin of some of these phenotypes. The analysis of *CHCHD10* also needs to be performed in patients presenting with ALS or FTD in both sporadic and familial cases.

Acknowledgements

We acknowledge Pasteur-IRCAN Cellular and Molecular Imaging platform (PICMI). We also acknowledge Pr François Tison (CHU Bordeaux), Cyril Goizet (CHU Bordeaux) and Pr Olivier Rascol (CHU Toulouse).

Funding

This work was made possible by grants to V.P-F from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), to H.S from National Institutes of Health (GM089853) and to A.B by the program 'Investissements d'avenir' ANR-10-IAIHU-06, 'The Programme Hospitalier de Recherche Clinique' (to I.L.B.) and the 7th framework program of the European Union (FP7, E12009DD, Neuromics). P.YWM is supported by a Clinician Scientist Fellowship Award (G1002570) from the Medical Research Council (UK).

References

- Amati-Bonneau P, Valentino M, Reynier P, Gallardo M, Bornstein B, Boissière A, *et al.* *OPA1* mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 2008; 131: 338–51.
- An J, Shi J, He Q, Lui K, Liu Y, Huang Y, *et al.* CHM1/CHCHD6, a novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 2012; 287: 7411–26.
- Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Tokatlidis K. The coiled coil-helix coil-helix proteins may be redox proteins. *FEBS Lett* 2009; 583: 1699–702.
- Banci L, Bertini I, Coffi-Baffoni S, Jaiswal D, Peruzzini R, Winkelman J. Structural characterization of CHCHD5 and CHCHD7: two atypical twin CX9C proteins. *J Struct Biol* 2012; 180: 190–200.
- Bannwarth S, Figueroa A, Fragaki K, Destrois-maisons L, Lacas-Gervais S, Lespinasse F, *et al.* The human *MSH5* (MutS Homolog 5) gene localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. *Mitochondrion* 2012; 12: 654–65.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 251: 69–72.
- Brown TA, Tkachuk AN, Shtengel G, Kopek BG, Bogenhagen BF, Hess HF, *et al.* Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits and membrane interaction. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 4494–5010.
- Cavallo G. Genome-wide analysis of eukaryotic twin CX9C proteins. *Mol Biosyst* 2010; 6: 2459–70.
- Chen H, Chan D. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 21–5.
- Cogliati S, Frezza C, Soriano M, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, *et al.* Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes and respiratory efficiency. *Cell* 2013; 155: 160–71.
- Copeland W. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012; 47: 64–74.
- Darshi M, Mendiola V, Mackey M, Murphy A, Koller A, Perkins G, *et al.* ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* 2011; 286: 2918–32.
- Darshi M, Trinh K, Murphy A, Taylor S. Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 2012; 287: 39480–91.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–56.
- Delettre C, Laeners G, Griffon J, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, *et al.* Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000; 26: 207–10.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G, Rudka T, *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126: 177–89.
- Hakonen A, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonngvist T. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain* 2007; 130: 3032–40.
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely E, Stewart J, He L, Schaefer A, *et al.* Mutation of *OPA1* causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness, and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 2008; 131: 329–37.
- Jans D, Wurm C, Riedel D, Wenzel D, Stagge F, Deckers M, *et al.* STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. *PNAS* 2013; 110: 8936–41.
- Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ. Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 2004; 164: 493–9.
- Kelley L, Sternberg M. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009; 4: 363–71.
- Kim JS, Xu X, Li H, Solomon D, Lane WS, Jin T, *et al.* Mechanistic analysis of a DNA damage-induced, PTEN-dependent size checkpoint in human cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 2756–71.
- Koshiba T, Detmer S, Kaiser J, Chen H, McCaffery M, Chan D. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004; 305: 858–62.
- Longen S, Bien M, Bihlmaier K, Kloeppel C, Kauff F, Hammermeister M, *et al.* Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol* 2009; 393: 356–68.
- Martherus RS, Sluiter W, Timmer ED, VanHerle SJ, Smeets HJ, Ayoubi TA. Functional annotation of heart enriched mitochondrial genes GBAS and CHCHD10 through guilt by association. *Biochem Biophys Res Com* 2010; 402: 203–8.
- Meeusen S, McCaffery M, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*. *Science* 2004; 305: 1747–52.
- Moraes C, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda A, *et al.* Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 18: 1293–9.
- Naimi M, Bannwarth S, Procaccio V, Pouget J, Desnuelle C, Pellissier J, *et al.* Molecular analysis of *ANT1*, *TWINKLE* and *POLG* in patients with multiple deletions or depletion of mitochondrial DNA by dHPLC-based assay. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 917–22.
- Paul R, Santucci S, Saunières S, Desnuelle C, Paquis-Flucklinger V. Rapid mapping of mitochondrial DNA deletions by large-fragment PCR. *Trends Genet* 1996; 12: 131–2.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–68.

- Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Rios PG, Calvo SE, Ripolone M, et al. Next-generation sequencing reveals *DGUOK* mutations in adult patients with mtDNA deletions. *Brain* 2012; 135: 3404–15.
- Rouzier C, Bannwarth S, Chaussenot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, et al. The *MFN2* gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 2012; 135: 23–34.
- Rouzier C, Le Guédard-Méreuze S, Fragaki K, Serre V, Miro J, Tuffery-Giraud S, et al. The severity of phenotype linked to *SUCLG1* mutations could be correlated with residual amount of *SUCLG1* protein. *J Med Genet* 2010; 47: 670–6.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray J. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chem Acta* 1994; 228: 31–51.
- Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I–IV in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2001; 276: 37861–7.
- Shapira A. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379: 1825–34.
- Song Z, Ghochani M, McCaffery M, Frey T, Chan D. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3525–32.
- Stojanovski D, Bragozewski P, Chacinska A. The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 1142–50.
- Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes—many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord* 2010; 20: 429–37.
- Tokuyasu T. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 1973; 57: 551–65.
- van der Laan M, Bohnert M, Wiedemann N, Pfanner N. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol* 2012; 22: 185–92.
- Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, et al. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 2009; 186: 805–16.
- Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial disease. *Ann Med* 2012; 44: 41–59.
- Zanna C, Ghelli A, Porcelli A, Karbowski M, Youle R, Schimpf S, et al. *OPA1* mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 2008; 131: 352–67.
- Zick M, Rabl R, Reichert A. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 5–19.
- Zuchner S, Mersyanova I, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali E, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; 36: 459–1.

IV. DISCUSSION

Indépendamment de son rôle dans la fusion mitochondriale, la protéine MFN2 est impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial. Une étude menée à partir de fibroblastes de patients atteints de CMT2A et porteurs de mutations du gène *MFN2* a permis de mettre en évidence une diminution de la phosphorylation oxydative et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial dans ces cellules (Loiseau et al., 2007). Une autre étude a montré que 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 complexes 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 des 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. L'expression du gène *MFN2* est régulée par des coactivateurs transcriptionnels (PGC1 α et β) et des facteurs de transcriptions (ERR α) 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 du CMT2A.

MFN2 joue également un rôle dans l'homéostasie calcique. En effet, elle est enrichie au niveau des sites de contacts entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008). Ainsi, des cellules HeLa et des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvus de MFN2 ou exprimant une forme mutante de la protéine présentent une altération de la morphologie du réticulum endoplasmique, qui est dilaté. Dans des conditions physiologiques normales, cette interaction entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie est importante pour l'homéostasie du calcium. La désorganisation structurale due au défaut d'interaction entre les deux organites entraîne 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., 2014) ; (de Brito and Scorrano, 2009)). L'une des principales voies de signalisation 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 abolissent les contacts entre mitochondries et réticulum endoplasmique et que les cellules dépourvues de MFN2 présentent une activation de la voie ERK/MAPK (de Brito and Scorrano, 2009).

Le transport mitochondrial est également très important pour le maintien des fonctions neuronales. Plusieurs éléments semblent indiquer qu'un défaut du transport axonal mitochondrial pourrait être impliqué dans le CMT2A. Tout d'abord, des auteurs 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) ; (Zhao et al., 2001)). 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, porteuses de la mutation p.T105M dans le domaine GTPase de MFN2, induit une agrégation mitochondriale péri-nucléaire avec diminution du nombre de mitochondries axonales ((Baloh et al., 2007) ; (Detmer and Chan, 2007b)). Contrairement à ces travaux, 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 sans aggrégation 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. Mais l'ensemble de ces données montre qu'un phénotype CMT associé à une mutation dans *MFN2* résulte vraisemblablement de l'abolition de différentes fonctions liées à cette mitofusine.

La fusion contrôle la morphologie mitochondriale et un défaut de fusion est à l'origine de maladies neurodégénératives chez l'homme et dans des modèles murins. Le lien entre inactivation des mitofusines et pathologies musculaires a été démontré dans un modèle de souris (Chen et al., 2010). L'inactivation conditionnelle de MFN1 et MFN2 dans le muscle

provoque une myopathie avec une prolifération mitochondriale compensatoire et un dysfonctionnement mitochondrial sévère. Les souris présentent aussi une instabilité de l'ADNmt avec accumulation de mutations ponctuelles et de délétions. Les mécanismes par lesquels les mutations du gène *MFN2* entraînent une dégénérescence axonale responsable d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth ne sont pas connus. Nous avons récemment montré que *MFN2* est un gène impliqué dans les maladies avec instabilité de l'ADNmt en décrivant une grande famille avec atrophie optique, neuropathie axonale et myopathie mitochondriale (Rouzier et al., 2012). La mutation p.D210V retrouvée dans cette famille est responsable d'un phénotype sévère avec accumulation de délétions multiples dans le muscle des patients. Ce phénotype de type AOD « plus » est proche de celui associé à certaines mutations du gène *OPA1* ((Amati-Bonneau et al., 2009) ; (Züchner et al., 2006)).

Nous avons voulu comparer les effets de la mutation p.D210V à ceux d'une mutation associée à un phénotype CMT2A classique (p.A166T) dans les fibroblastes des patients. Les fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} ne présentaient pas de déficit de la chaîne respiratoire contrairement à ceux des patients avec mutation p.D210V. Les résultats des autres analyses : anomalies structurales des mitochondries, fragmentation du réseau mitochondrial, diminution de nombre et augmentation de taille des nucléoïdes et défaut de réparation de l'ADNmt après stress oxydatif étaient identiques quelque soit la mutation exprimée. Le résultat le plus intéressant concerne l'analyse de la fusion que j'ai retrouvée défectueuse dans les fibroblastes *MFN2*^{D210V/+} à la différence des fibroblastes *MFN2*^{A166T/+} dans lesquels elle est normale. La fusion de différents allèles *MFN2* CMT2A a été préalablement testée dans des cellules embryonnaires de souris porteuses d'un double KO (Detmer and Chan, 2007b). Ces cellules, dans lesquelles *MFN1* et *MFN2* sont inactivées, sont totalement déficientes pour la fusion mitochondriale et présentent un réseau mitochondrial très fragmenté ((Chen et al., 2005) ; (Chen et al., 2003)). L'expression de *MFN2* dans ces cellules restaure leur capacité de fusion et leur permet de retrouver un réseau mitochondrial filamenteux et connecté. Les auteurs ont testé différents allèles mutants responsables de CMT2A : certains complètent le défaut de fusion alors que d'autres en sont incapables. Ce travail montre clairement que certaines mutations responsables d'une dégénérescence axonale entraînent un défaut de fusion mitochondriale alors que d'autres agissent vraisemblablement par d'autres mécanismes. Les résultats obtenus avec la mutation p.A166T confirment qu'un allèle *MFN2* muté peut être responsable d'un CMT2A en l'absence de défaut de fusion. En revanche, les résultats obtenus avec la mutation p.D210V sont en faveur du lien entre défaut de fusion et

instabilité de l'ADNmt. L'accumulation de délétions de l'ADNmt dans les tissus post-mitotiques peut être liée à une augmentation des dommages à l'ADN, à un défaut de réparation de l'ADN ou à déficit d'élimination des mitochondries porteuses d'ADNmt endommagé. En analysant le protéome mitochondrial de souris, Chen et ses collègues ont montré que l'inactivation des protéines MFN provoque une hétérogénéité d'une mitochondrie à l'autre pouvant expliquer l'instabilité de l'ADNmt observée ; un défaut de stoechiométrie des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADNmt et/ou dans la mitophagie pouvant entraîner un déficit dans les mécanismes correspondants (Chen et al., 2010). Les résultats de la littérature montrent aussi qu'un défaut de fusion n'est pas le seul élément responsable d'une instabilité de l'ADNmt puisque d'autres mutations que la p.D201V, responsables d'un défaut de fusion, sont associées à un CMT2A sans instabilité de l'ADNmt. D'autres études à partir de cellules de patients exprimant d'autres mutations et de modèles animaux seront nécessaires pour comprendre quels défauts parmi les différentes fonctions de MFN2 sont responsables des phénotypes observés.

Culture cellulaire

Lignées cellulaires utilisées :

1) Fibroblastes primaires de patients

Afin d'étudier les effets des mutations $MFN2^{D210V/+}$ et $MFN2^{A166T/+}$, nous avons utilisé des fibroblastes obtenus à partir de biopsie cutanée de patients : fibroblastes isolés des patients II-5 et II-8 de la famille portant la mutation $MFN2^{D210V/+}$ (Figure 27) et d'un patient présentant la mutation $MFN2^{A166T/+}$. Nous avons également utilisé deux lignées de fibroblastes de peau isolés de deux patients contrôles.

2) Cellules HEK 293T : cellules embryonnaires de rein humain, ATCC : CRL-3216

Nous avons utilisé des cellules HEK 293T pour la production de particules virales nécessaires à l'expression de la GFP photo-activable mito-PA-GFP (pour réaliser le test de fusion mitochondriale (voir fiche technique test de fusion mitochondriale)).

Milieu de culture :

-Milieu de prolifération : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose 4,5g/L (Gibco Life Technologies 41965-039) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco Life Technologies 10270-106) et en présence d'antibiotiques ([10 000] unités/ml de pénicilline et [10 000] µg/ml de streptomycine] à diluer au 1/100ème PAA P11-010).

-Milieu Galactose : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium no glucose Gibco Life Technologies 11966-025) auquel est ajouté du galactose (5mM final - Sigma G5388). Le milieu est complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco Life Technologies 10270-106) et avec des antibiotiques ([10 000] unités/ml de pénicilline et [10 000] µg/ml de streptomycine] à diluer au 1/100ème (PAA P11-010).

Méthodes de culture :

Les fibroblastes des patients sont cultivés en milieu de prolifération et sont maintenus à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité dans un incubateur (HERAEUS Hera cell 240).

Comme pour les fibroblastes, les cellules HEK293 sont cultivées en milieu de prolifération et sont maintenus à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité dans un incubateur (HERAEUS Hera cell 240).

Congélation des lignées :

- Préparer le milieu de congélation :
 - 10% DMSO (Sigma D2438), 90% SVF (Gibco Life Technologies 10270-106).
- Trypsiner et compter les cellules (0,05% Trypsine-EDTA) (Gibco Life Technologies 25300-054).
- Mettre le nombre approprié de cellules dans de nouveaux tubes.
- Centrifuger 5 min à 1000 g et retirer le surnageant.
- Resuspendre délicatement les cellules avec 800 µL de milieu de congélation.
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube.
- Placer les cryotubes dans la boîte de congélation contenant de l'alcool isopropylique qui permet une congélation progressive des cellules.
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide

Décongélation des lignées :

- Sortir le cryotube de l'azote liquide et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C.
- Transférer le contenu du cryotube dans une boîte de culture contenant du milieu de prolifération.
- Changer le milieu dès que les cellules ont adhéré à la surface de la flasque de culture (entre 6h-24h maximum) pour l'élimination du DMSO.

Marquage Mitotracker Red CMXRos[®] et Immunofluorescence Fibroblastes de patients

Réactifs et matériels nécessaires :

- **Mitotracker Red CMXRos[®]**: PM : 531,52 g/mol Invitrogen M7512
- **PFA 32%**: Paraformaldehyde solution 32%: EM grade 15714 – Electron Microscopy Sciences
- **BSA**: Bovin serum albumin Fraction V: MP Biomedicals 160069
- **TritonX100**: Sigma T8787
- **PBS**: Gibco Life Technologies 14190-094
- **Milieu de montage**: ProLong Gold antifade reagent with DAPI: Invitrogen P36935
- **Anticorps**:
 - Anti-DNA (Mouse monoclonal Progen Biotechnik GmbH AC-30-10)
 - Anti-TFAM (Mouse polyclonal VWR ABNOH00007019-B01P)
 - Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) Life Technologies A11029

Jour 1 : Culture cellulaire

- Placer des lamelles en verre stériles dans des boîtes de Pétri (BP) diamètre 60.
- Ensemencer les fibroblastes dans les boîtes de Pétri à 250.000 cellules/BP dans 4mL de milieu de prolifération.

Jour 2 : Marquage Mitotracker Red CMXRos[®] et Immuno-marquage

Remarque : Le Mitotracker Red CMXRos[®] marque spécifiquement les mitochondries fonctionnelles (en fonction du potentiel de membrane mitochondrial).

1) Marquage Mitotracker Red CMXRos[®]

- Rincer les cellules avec du milieu de prolifération.
- Diluer le Mitotracker à 100nM dans le milieu de prolifération.
- Mettre 4ml de la dilution contenant le Mitotracker à 100nM sur les cellules.
- Incuber 15 min dans l'incubateur (37°C - 5% de CO₂).

- Aspirer le milieu et remettre en milieu de prolifération.
- Incuber 2h à 37°C.
- Faire un lavage en PBS.

2)Fixation

- Diluer le PFA à 4% final (stock 32%) dans du milieu de prolifération chaud.
- Mettre sur les cellules le milieu contenant le PFA à 4% final.
- Incuber 20 min (37°C - 5% de CO₂).
- Rincer 3 fois en PBS.

Passer directement au montage des lamelles pour visualiser le réseau mitochondrial uniquement (étape 6).

Si l'expérience nécessite un immuno-marquage d'autres protéines, continuer par l'étape 3.

3)Perméabilisation des membranes

- Incuber avec du PBS + 2% TritonX100 pendant 10 minutes (Température ambiante).
- Rincer 3 fois avec du PBS (Température ambiante).

4)Saturation

- Incuber avec du PBS + BSA 5% entre 45 et 60 minutes (Température ambiante).

5)Immuno-marquage

1)Hybridation avec l'anticorps primaire

- Dilution des anticorps primaires dans la solution de saturation PBS/BSA 5% :
 - Anti-DNA (Mouse monoclonal Progen Biotechnik GmbH AC-30-10) : 1/200
 - Anti-TFAM (Mouse polyclonal VWR ABNOH00007019-B01P) : 1/500
- Déposer 200µl d'anticorps primaire correspondant sur les cellules.
- Déposer la lamelle face cellules sur la goutte d'anticorps (après avoir enlevé le surplus de liquide).
- Incubation 1heure (Température ambiante).
- Rincer les lamelles dans du PBS 3X5 minutes.

2)Hybridation avec l'anticorps secondaire

- Dilution des anticorps secondaires dans la solution de saturation PBS/BSA 1% :

Anticorps secondaire : Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) Life Technologies A11029

- Secondaire anti-mouse pour l'anti-DNA = 1/1000

- Secondaire anti-mouse pour l'anti-TFAM = 1/1000

- Déposer 200µl d'anticorps secondaire correspondant sur les cellules.
- Incubation 1 heure à l'abri de la lumière à température ambiante.
- Rincer dans du PBS 3X5 minutes.
- Rincer dans de l'eau.

6)Montage des lamelles

- Monter les lamelles sur une lame préalablement nettoyée à l'Ethanol avec du Milieu de montage.
- Laisser sécher dans une étuve à 55°C (entre 6 à 24h).

Cinétique de réparation des dommages à l'ADN induits par H₂O₂

Références :

- Yakes F, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 514-519.
- Ballinger S, Van Houten B, Jin G, Conklin C, Godley B (1999) Hydrogen peroxide causes significant mtDNA damage in human RPE cells. Exp Eyes Res 68 : 765-772.

Réactifs et matériels nécessaires :

1) Solution stock de H₂O₂ à 30% (Sigma H1009)

La concentration de la solution stock H₂O₂ doit être vérifiée juste avant son utilisation, par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à partir d'une dilution en PBS (1/300)
1,31 Abs à 260nm = 30mM

2) Lignées cellulaires utilisées :

Les fibroblastes primaires sont préparés à partir d'une biopsie cutanée réalisées chez des patients contrôles et porteurs de la mutation *MFN2*^{D210V/+} (patients II-5 et II-8) ou *MFN2*^{A166T/+}

3) Milieu de culture :

- Milieu de prolifération (DMEM High Glucose, 10% SVF, Penicilline/Streptomycine)

- Traitement H2O2 : DMEM High Glucose contenant H2O2 (150µM finale, à ajouter extemporanément)
- Cinétique de récupération : DMEM High Glucose, 10% SVF, Penicilline/Streptomycine

Jour 1 : Culture cellulaire

- Ensemencer les cellules à 80% de confluence dans des boîtes de culture (boîte de pétri diamètre 100 - 4 boîtes/condition) en milieu de prolifération

Différentes conditions :

- 1-Non traité (NT) (incubation 30min en milieu sans sérum),
- 2-Traitement H2O2 150µM 30min,
- 3-Traitement H2O2 150µM 30min puis 1h de récupération,
- 4- Traitement H2O2 150µM 30min puis 2h de récupération,
- 5- Traitement H2O2 150µM 30min puis 4h de récupération.

Jour 2 : Traitement H2O2 et cinétique de réparation

- Vérifier la concentration de la solution de H2O2.

Pour une solution de H2O2 à 30% faire une dilution au 1/300 en PBS.

Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm.

Déterminer la concentration de la solution diluée (1,31 Abs à 260nm = 30mM)

- Préparer la quantité nécessaire de milieu (DMEM sans SVF) pour le traitement H2O2 à 150µM (10ml/condition)
- Remplacer le milieu de culture avec :
 - 10 ml/par diamètre100 de milieu à 150µM H2O2 pour les points à traiter
 - 10 ml/par diamètre100 de milieu sans sérum pour les points NT.
- Incuber les cellules 30min (37°C- 5% de CO2 - 95% d'humidité dans un incubateur)
- Aspirer la totalité du milieu de culture puis :
 - soit congeler immédiatement en plaçant les boîtes de pétri sur de l'azote liquide (conditions 1 et 2) pour stopper la réaction.
 - soit ajouter du milieu de culture de prolifération et incuber à 37°C- 5% CO2 - 95% d'humidité (conditions 3, 4 et 5)
- Après incubation 1h, 2h, ou 4h ; aspirer le milieu de culture et congeler les boîtes de pétri sur azote liquide.

Jour 3 : Extraction ADN génomique

Pour l'extraction d'ADN génomique utiliser le kit Qiagen Genomic Tip 20/G (Ref. 19060 + 10223) qui permet d'extraire spécifiquement les fragments d'ADN génomique de haut poids moléculaire.

Jour 4 : Amplification PCR

Les PCR « grands fragments » permettent de quantifier les dommages induits par H2O2, les PCR « petits fragments » permettent de normaliser avec la quantité d'ADN génomique.

Taille des fragments PCR :

Large fragment 15,6kb

Small fragment 172bp

Primers :

Large Fragment Sens - Primer 20 : 5'-CCCACAGTTTATGTAGCTTACCTCCTCA-3'

Large Fragment Reverse – Primer 21 : 5'-TTGATTGCTGTACTTGCTTGTAAGCATG-3'

Small Fragment Sens – Primer 82 : 5'-CTACACAATCAAAGACGCCC-3'
 Small Fragment Reverse- Primer 55 : 5'-GAATTGTGTAGGCGAATAGG-3'

Pour chaque échantillon préparer 3 séries de tubes pour l'amplification PCR grands fragments et 3 séries de tubes pour l'amplification PCR. Prévoir le nombre de tubes nécessaires à l'essai sachant que les échantillons doivent être testés avec au moins 3 cycles différents.

PCR Grands Fragments :

Utilisation du kit Expand Long Template (Roche)

Attention : lors de la 1ère utilisation chauffer le Tampon 3 à 56°C jusqu'à ce que les cristaux soient complètement fondus.

Stocker ensuite à -20°C.

Avant utilisation équilibrer le tampon 3 à 37°C.

Préparer 2 mix séparés :

Tube	1	2	3	4	Témoin PCR Neg.
N° ADN					
H2O qsp 50ul					
Mix 1	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul
ADN (200ng)					0ul
Mix 2	5,75ul	5,75ul	5,75ul	5,75ul	5,75ul

Mix 1 :
 H2O 20,5ul
 dXTP (10mM each) 2,5ul
 Primer Sens (200ng/ul) 1ul
 Primer Revers (200ng/ul) 1ul

Mix 2: Tpon 3 5ul
 Enzyme 0,75ul

Dans les tubes PCR ajouter H2O (19,25 ul– Vol ADN)

Préparer le Mix 1 – Vortexer - Centrifuger

Ajouter le Mix 1 dans les Tubes PCR (25 ul /Tube)

Préparer le Mix 2 – Mélanger doucement - Centrifuger

Ajouter le Mix 2 dans les Tubes PCR (5,75 ul /Tube)

Ajouter l'ADN

Mélanger - Centrifuger

Programme PCR :

94°C	2min	
94°C	10sec	} 10 Cycles
67°C	30sec	
68°C	9min	
94°C	15sec	
67°C	30sec	} 11-12-13 Cycles
68°C	9min+20sec/cycle	
68°C	7min	
15°C	Pause	

Retirer les tubes du thermocycleur 5 secondes avant la fin de l'étape d'élongation.

PCR Petit Fragment :

Utiliser Taq Polymérase (Roche)

Mix PCR :	H2O qsp 50ul	20,5ul
	dXTP (10mM each)	1ul
	Primer 82 (200ng.ul)	1ul
	Primer 55 (100ng.ul)	2ul
	Taq Polymerase	0,25ul

Préparer le Mix PCR – Vortexer - Centrifuger

Dans les tubes PCR ajouter le mix (50ul – Vol ADN (200ng))

Ajouter l'ADN – Vortexer - Centrifuger

Programme PCR :

94°C	2min	
94°C	1min	
60°C	45sec	} 16-18-20 Cycles
72°C	45sec	
72°C	5min	
15°C	Pause	

Retirer les tubes du thermocycleur 5 secondes avant la fin de l'étape d'élongation.

Jour 5 : Quantification des produits PCR par picogreen

Réactif : Quanti-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Invitrogen-Ref P11496)

Préparer extemporanément :

TE 1X (Sol. Stock 20X)

PicoGreen 1X (la solution se conserve à l'abri de la lumière)

Le mélange PicoGreen / ADN doit être lu rapidement.

Prévoir une gamme étalon pour chaque dosage pour vérifier les solutions. Utiliser le plasmide fourni dans le kit (lambda DNA standard).

1. Préparer la solution de TE 1X :

1ml TE 20X qsp 20ml

2. Préparer la solution de PicoGreen :

50ul PicoGreen qsp 10ml en TE 1X.

3. Préparer la gamme étalon.

Diluer le plasmide stock (100ug/ml) : 4ul Plasmide + 196ul TE 1X (Final = 2ug/ml).

Préparer une solution diluée au 1/10. (10ul de la dilution précédente qsp 100ul en TE 1X)

Préparer une solution diluée au 1/100. (10ul de la dilution précédente qsp 100ul en TE 1X)

4. Préparer la plaque :

Utiliser une plaque opaque blanche à 96 puits.

Quantification des échantillons : 5ul PCR + 45ul TE 1X + 50ul PicoGreen.

Remplir les puits avec le TE 1X, ajouter l'ADN, en dernier le PicoGreen.

Dans les 2 1eres colonnes prévoir la gamme étalon : (2 puits / Point de gamme)

Vol TE 1X	Vol Plasmide	PicoGreen
0ul	50ul	50ul
45ul	5ul	50ul
45ul	5ul (1/10)	50ul
45ul	5ul (1/100)	50ul
50ul	0ul	50ul

Dans les colonnes suivantes, placer les PCR dans le même ordre que celui réalisé pendant les PCR.

(Une colonne / Cycle PCR)

4. Sceller la plaque, centrifuger

5. Lecture au Light Cycler 480.

Reporter les valeurs dans un tableau excel.

Pour choisir le nombre de cycle PCR à utiliser pour être en condition semi-quantitative, représenter sur un graphe : l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycle PCR pour chacune des PCR.

Pour être en condition semi-quantitative l'intensité de fluorescence doit être linéaire avec le nombre de cycle PCR. Choisir la valeur d'intensité de fluorescence correspondant au nombre de cycle PCR se situant au milieu de la droite.

Normaliser la valeur d'intensité de fluorescence des PCR « grands fragments » avec celle des PCR « petits fragments »

Test de fusion mitochondriale

Réactifs et matériels nécessaires :

1) Vecteurs pour la production de particules virales

-pHR-Sin-CSGW-mitoPA-GFP (mitoPA-GFP = GFP photo-activable présentant une séquence d'adressage à la mitochondrie)

-pCMV packaging (= pCMV-dR8.2 – Addgene 8455)

-pCMV enveloppe (= pCMV-VSV-G – Addgene 8454)

2) Réactifs et plastiques de culture spécifiques

-Lipofectamine 2000 : Life technologies 11668-019

-Polybrène : transfection reagent Millipore TR1003-G

-TMRE : tetramethylrhodamine, ethyl ester : Life technologies T669

-LabTek : Nunc 155409

3) Lignées cellulaires utilisées :

1. **Fibroblastes primaires de patients** porteurs des mutations *MFN2*^{D210V/+} et *MFN2*^{A166T/+} (fibroblastes isolés des patients II-5 et II-8 de la famille portant la mutation *MFN2*^{D210V/+} et d'un patient avec la mutation *MFN2*^{A166T/+}). Nous avons également utilisé une lignée de fibroblastes de peau isolés d'un patient contrôle.

2. Cellules HEK 293T ATCC LGC standard ATCC-CRL-3216

Nous avons utilisé des cellules HEK 293 pour la production de particules virales nécessaires à l'expression de la GFP photo-activable pour réaliser le test de fusion mitochondriale.

4) Milieux de culture :

-**Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM** High glucose: Gibco Life Technologies 41965-039

-**Milieu de culture L15**: Gibco Life Technologies 21083-027

-**Sérum de veau fœtal** : Gibco Life Technologies 10270-106

-**Antibiotiques** ([10 000] unités/ml de pénicilline et [10 000] µg/ml de streptomycine] à diluer au 1/100^{ème} PAA P11-010).

-**Milieu OPTIMEM** : Life Technologies 31985062

-**Milieu de prolifération** : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose 4,5g/L (Gibco Life Technologies 41965-039) complétement avec 10% de sérum de veau fœtal et en présence d'antibiotiques ([10 000] unités/ml de pénicilline et [10 000] µg/ml de streptomycine] à diluer au 1/100^{ème}).

Production des particules virales

Jour 1 : Culture cellulaire.

- Ensemencer $3 \cdot 10^6$ cellules HEK293T dans des flasques de 25cm² dans 4mL en milieu de prolifération (DMEM glucose, 10%SVF, voire fiche technique de culture cellulaire).

Jour 2 : Transfection des cellules HEK293T pour la production de particules virales.

- Transfection en Lipofectamine 2000 selon les recommandations du fournisseur des 3 vecteurs :

- pHR-Sin-CSGW-PA-GFP (3µg)

- pCMV-dR8.2 (3µg)

- pCMV-VSV-G (0,3µg)

- Les mix de transfection sont réalisés dans du milieu OPTIMEM :

- Mix 1 = vecteurs + OPTIMEM

- Mix 2 = Lipofectamine 2000 + OPTIMEM

- Incuber 5 minutes séparément les deux mix.

- Mettre goutte à goutte le mix 1 dans le mix 2.

- Incuber 30 minutes le mix final de transfection.

- Aspirer le milieu de culture des cellules à transfecter.

- Déposer goutte à goutte le mix de transfection sur les cellules.

- Incuber 24h les cellules avec le mix de transfection.

Jour 3 : Changer le milieu de transfection des cellules HEK293T par du milieu de prolifération (sans antibiotiques).

Jour 4 : Récupération et purification des particules virales mitoPA-GFP produites.

- Récupérer le surnageant des cellules transfectées dans un tube de 15mL.

- Centrifuger 5 minutes à 1000 rpm.

- Transférer le surnageant dans un tube de 50mL.

- Filtrer le surnageant avec un filtre de 0,45µm

- Aliquoter le surnageant filtré qui contient les virus produits dans des tubes de 1,5mL.

- Conservation des virus obtenus à -80°C ou procéder directement à la transduction des fibroblastes.

Transduction des fibroblastes primaires de patients

Jour 1 : Culture cellulaire (fibroblastes contrôle et des 3 patients mutants pour *MFN2*).

- Ensemencer les fibroblastes à 150.000 cellules dans un puits de plaque 6 puits.
- Les fibroblastes sont ensemencés en milieu de prolifération sans antibiotiques.

Jour 2 : Transduction des fibroblastes.

- Préparation du mix de transduction :
 - Surnageant contenant les particules virales exprimant la mitoPA-GFP (0,5ml)
 - Polybrène (8µg/ml)
 - Milieu de prolifération sans antibiotiques (1,5ml)
- Mélanger doucement le mix de transduction.
- Aspirer le milieu de culture des fibroblastes et le remplacer par le mix de transduction (2ml par puits). Mélanger doucement.
- Incuber 24h à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité dans un incubateur.

Jour 3 : Changer le milieu d'infection des fibroblastes par du milieu de prolifération (avec antibiotiques). Les fibroblastes infectés sont laissés en conditions de culture standard. L'analyse de la fusion mitochondriale peut être réalisée durant 10 à 12 jours après l'infection.

Analyse de la fusion mitochondriale

Jour 1 : Ensemencement des cellules pour visualiser la fusion mitochondriale.

- Trypsiner les fibroblastes transduits.
- Centrifuger les cellules 5 min à 1000 rpm.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 1mL de milieu de prolifération.
- Ensemencer 150µl de suspension cellulaire dans un puit de LabTek avec 150µl de milieu de prolifération.
- Incuber 24h à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité dans un incubateur.

Jour 2 : Visualisation de la fusion mitochondriale.

1. Marquage des mitochondries au TMRE (pour visualiser le réseau mitochondrial).

- Dilution du TMRE (14nM final) dans du milieu L15 complémenté avec 10% de SVF.
- Remplacer le milieu de culture par le milieu L15 contenant le TMRE (14nM).
- Incuber 30 minutes dans l'incubateur (37°C - 5%CO₂ - 95% d'humidité).

2. Prise d'image en imagerie confocale Logiciel ZEN.

- Définir des zones de 30X30 pixels du réseau mitochondrial où la mitoPA-GFP sera activée.
- Activer le mitoPA-GFP dans les zones définies par un laser 405nm du microscope confocal Zeiss LSM 5 (puissance 100%, 5 fois).
- Prendre des images toutes les 15 minutes pendant 1h à 488nm (visualisation de la diffusion de la fluorescence de la mitoPA-GFP) et à 543nm (visualisation du réseau mitochondrial).

3. Analyse des images obtenues Logiciel ImageJ.

- Mesurer la diffusion de la fluorescence dans chaque zone d'intérêt en fonction du temps à l'aide du logiciel ImageJ.

Bibliographie

- Acin-Perez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 444–450.
- Akbari, M., Sykora, P., and Bohr, V.A. (2015). Slow mitochondrial repair of 5'-AMP renders mtDNA susceptible to damage in APTX deficient cells. *Sci. Rep.* 5, 12876.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., 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.
- Altmann, K., Frank, M., Neumann, D., Jakobs, S., and Westermann, B. (2008). The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 181, 119–130.
- Amati-Bonneau, P., Milea, D., Bonneau, D., Chevrollier, A., Ferré, M., Guillet, V., Gueguen, N., Loiseau, D., de Crescenzo, M.-A.P., Verny, C., et al. (2009). OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1855–1865.
- Archibald, J.M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr. Biol. CB* 25, R911-921.
- Auranen, M., Ylikallio, E., Shcherbii, M., Paetau, A., Kiuru-Enari, S., Toppila, J.P., and Tynismaa, H. (2015). CHCHD10 variant p.(Gly66Val) causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurol. Genet.* 1, e1.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., et al. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190–17197.
- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., et al. (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, 2685–2693.
- 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 422–430.
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chaussenot, A., Genin, E.C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D.G., et al. (2014a). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain J. Neurol.* 137, 2329–2345.
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chaussenot, A., Genin, E.C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D.G., et al. (2014b). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain J. Neurol.* 137, 2329–2345.

Bannwarth, S., Berg-Alonso, L., Augé, G., Fragaki, K., Kolesar, J.E., Lespinasse, F., Lacas-Gervais, S., Burel-Vandenbos, F., Villa, E., Belmonte, F., et al. (2016). Inactivation of Pif1 helicase causes a mitochondrial myopathy in mice. *Mitochondrion*.

Barbot, M., Jans, D.C., Schulz, C., Denkert, N., Kroppen, B., Hoppert, M., Jakobs, S., and Meinecke, M. (2015). Mic10 oligomerizes to bend mitochondrial inner membranes at cristae junctions. *Cell Metab.* 21, 756–763.

Barnes, D.E., Lindahl, T., and Sedgwick, B. (1993). DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 424–433.

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., et al. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* 30, 21–22.

Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298–304.

van der Bliek, A.M., and Payne, G.S. (2010). Dynamin subunit interactions revealed. *Dev. Cell* 18, 687–688.

Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowlers, R.N., and Dietrich, A. (2011). DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 186–200.

Bohnert, M., Zerbes, R.M., Davies, K.M., Mühleip, A.W., Rampelt, H., Horvath, S.E., Boenke, T., Kram, A., Perschil, I., Veenhuis, M., et al. (2015). Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab.* 21, 747–755.

Bose, A., and Beal, M.F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*

Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127.

de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 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, 222–226.

Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., and Clayton, D.A. (2005). Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev.* 19, 2466–2476.

Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., DeLong, B., McKenzie, D., Salamat, S., and Aiken, J.M. (2006). Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 469–480.

Budd, M.E., Reis, C.C., Smith, S., Myung, K., and Campbell, J.L. (2006). Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2490–2500.

- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S.A., Chang, B., Goldberger, O.A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A., and Mootha, V.K. (2006). Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat. Genet.* **38**, 576–582.
- Carrodeguas, J.A., Kobayashi, R., Lim, S.E., Copeland, W.C., and Bogenhagen, D.F. (1999). The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4039–4046.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M.B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J.-L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., et al. (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol.* **567**, 349–358.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 265–287.
- Chan, S.S.L., and Copeland, W.C. (2009a). DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 312–319.
- Chan, S.S.L., and Copeland, W.C. (2009b). Functional analysis of mutant mitochondrial DNA polymerase proteins involved in human disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **554**, 59–72.
- Chan, S.S.L., Naviaux, R.K., Basinger, A.A., Casas, K.A., and Copeland, W.C. (2009). De novo mutation in POLG leads to haplotype insufficiency and Alpers syndrome. *Mitochondrion* **9**, 340–345.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* **465**, 435–440.
- Chausseuot, A., Le Ber, I., Ait-El-Mkadem, S., Camuzat, A., de Septenville, A., Bannwarth, S., Genin, E.C., Serre, V., Augé, G., French research network on FTD and FTD-ALS, et al. (2014a). Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Aging* **35**, 2884.e1-4.
- Chausseuot, A., Le Ber, I., Ait-El-Mkadem, S., Camuzat, A., de Septenville, A., Bannwarth, S., Genin, E.C., Serre, V., Augé, G., French research network on FTD and FTD-ALS, et al. (2014b). Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Aging* **35**, 2884.e1-4.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No. 2**, R283-289.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R169-176.

- 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**, 189–200.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–26192.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* **141**, 280–289.
- Chen, K.-H., Dasgupta, A., Ding, J., Indig, F.E., Ghosh, P., and Longo, D.L. (2014). Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 382–394.
- 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**, 15927–15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., et al. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163–175.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693–705.
- Clayton, D.A. (2003). Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life* **55**, 213–217.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* **155**, 160–171.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 261–273.
- Cozzolino, M., Rossi, S., Mirra, A., and Carri, M.T. (2015). Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 31.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vélchez, 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**, 22–25.
- Czarnecka, A.M., Krawczyk, T., Plak, K., Klemba, A., Zdrozny, M., Arnold, R.S., Kofler, B., Golik, P., Szybinska, A., Lubinski, J., et al. (2010). Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition. *Oncol. Rep.* **24**, 1521–1534.
- Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H.D., and Kühlbrandt, W. (2013). Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15301–15306.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a

mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 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, 584–591.

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, 14503–14508.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007a). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870–879.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007b). Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176, 405–414.

DuBoff, B., Feany, M., and Götz, J. (2013). Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 36, 325–335.

Dudkina, N.V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.-P., and Boekema, E.J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 664–670.

Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.-G., et al. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 281, 37972–37979.

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1–61.

Faccenda, D., Tan, C.H., Seraphim, A., Duchon, M.R., and Campanella, M. (2013a). IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ.* 20, 686–697.

Faccenda, D., Tan, C.H., Duchon, M.R., and Campanella, M. (2013b). Mitochondrial IF₁ preserves cristae structure to limit apoptotic cell death signaling. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2530–2532.

Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2007a). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 679–699.

Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2007b). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 679–699.

Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M., and Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *J. Cell Biol.* 194, 473–488.

Foury, F., and Kolodnyski, J. (1983). pif mutation blocks recombination between mitochondrial rho⁺ and rho⁻ genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5345–5349.

- 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., et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177–189.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
- Friedman, J.R., Mourier, A., Yamada, J., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2015). MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *eLife* 4.
- 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, 683–692.
- Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502–506.
- Garg, P., and Burgers, P.M.J. (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 115–128.
- Genin, E.C., Plutino, M., Bannwarth, S., Villa, E., Cisneros-Barroso, E., Roy, M., Ortega-Vila, B., Fragaki, K., Lespinasse, F., Pinero-Martos, E., et al. (2016). CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol. Med.* 8, 58–72.
- Genova, M.L., and Lenaz, G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 427–443.
- Genova, M.L., and Lenaz, G. (2015). The Interplay Between Respiratory Supercomplexes and ROS in Aging. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 208–238.
- George, T., Wen, Q., Griffiths, R., Ganesh, A., Meuth, M., and Sanders, C.M. (2009). Human Pif1 helicase unwinds synthetic DNA structures resembling stalled DNA replication forks. *Nucleic Acids Res.* 37, 6491–6502.
- Geronimo, C.L., and Zakian, V.A. (2016). Getting it done at the ends: Pif1 family DNA helicases and telomeres. *DNA Repair* 44, 151–158.
- Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmüller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T.M., Prokisch, H., et al. (2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.* 41, 654–656.
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., and Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a011080.
- Goffart, S., Cooper, H.M., Tyynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A., and Spelbrink, J.N. (2008). Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum. Mol. Genet.* 18, 328–340.

- Gomes, L.C., and Scorrano, L. (2011). Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times. *Autophagy* 7, 1251–1253.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598.
- Grady, J.P., Murphy, J.L., Blakely, E.L., Haller, R.G., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Tuppen, H.A.L. (2014). Accurate measurement of mitochondrial DNA deletion level and copy number differences in human skeletal muscle. *PloS One* 9, e114462.
- Graziewicz, M.A., Longley, M.J., and Copeland, W.C. (2006). DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem. Rev.* 106, 383–405.
- 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, 18792–18798.
- Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M., and Lombès, A. (2008). Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. *Neuromuscul. Disord. NMD* 18, 319–330.
- Habib, S.J., Neupert, W., and Rapaport, D. (2007). Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. *Methods Cell Biol.* 80, 761–781.
- Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 30, 269–297.
- Hance, N., Ekstrand, M.I., and Trifunovic, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1775–1783.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 30, 4356–4370.
- Holt, I.J. (2010). Zen and the art of mitochondrial DNA maintenance. *Trends Genet. TIG* 26, 103–109.
- Holt, I.J., and Reyes, A. (2012). Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988a). Mitochondrial DNA polymorphism in mitochondrial myopathy. *Hum. Genet.* 79, 53–57.
- Holt, I.J., Cooper, J.M., Morgan-Hughes, J.A., and Harding, A.E. (1988b). Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1462.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515–524.
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751–780.
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Maejima, Y., Zhai, P., Sciarretta, S., Toli, J., Nomura, M., Mihara, K., Egashira, K., Ohishi, M., et al. (2015). Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ. Res.* 116, 264–278.

- Imoto, M., Tachibana, I., and Urrutia, R. (1998). Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 10), 1341–1349.
- 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, 6535–6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977.
- Jokela, M.E., Jääskeläinen, S.K., Sandell, S., Palmio, J., Penttilä, S., Saukkonen, A., Soikkeli, R., and Udd, B. (2015). Spontaneous activity in electromyography may differentiate certain benign lower motor neuron disease forms from amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 355, 143–146.
- Jones, B.A., and Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6, 380–389.
- Kageyama, Y., Hoshijima, M., Seo, K., Bedja, D., Sysa-Shah, P., Andrabi, S.A., Chen, W., Höke, A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., et al. (2014). Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. *EMBO J.* 33, 2798–2813.
- Kaguni, L.S. (2004). DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 293–320.
- Kamimoto, T., Nagai, Y., Onogi, H., Muro, Y., Wakabayashi, T., and Hagiwara, M. (1998). Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273, 1044–1051.
- Kasahara, A., Ishikawa, K., Yamaoka, M., Ito, M., Watanabe, N., Akimoto, M., Sato, A., Nakada, K., Endo, H., Suda, Y., et al. (2006). Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNAs with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Hum. Mol. Genet.* 15, 871–881.
- Kasamatsu, H., and Vinograd, J. (1973). Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nature. New Biol.* 241, 103–105.
- Kasiviswanathan, R., Longley, M.J., Chan, S.S.L., and Copeland, W.C. (2009). Disease mutations in the human mitochondrial DNA polymerase thumb subdomain impart severe defects in mitochondrial DNA replication. *J. Biol. Chem.* 284, 19501–19510.
- Kaufman, B.A., Durisic, N., Mativetsky, J.M., Costantino, S., Hancock, M.A., Grutter, P., and Shoubridge, E.A. (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol. Biol. Cell* 18, 3225–3236.
- Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 659–671.
- Kearns, T.P., and Sayre, G.P. (1958). Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch. Ophthalmol.* 60, 280–289.

- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 505–518.
- Kogelnik, A.M., Lott, M.T., Brown, M.D., Navathe, S.B., and Wallace, D.C. (1996). MITOMAP: a human mitochondrial genome database. *Nucleic Acids Res.* 24, 177–179.
- Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J.* 23, 2423–2429.
- Kornblum, C., Nicholls, T.J., Haack, T.B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., et al. (2013). Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat. Genet.* 45, 214–219.
- 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, 858–862.
- Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., and Turnbull, D.M. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40, 275–279.
- Ku, C., Nelson-Sathi, S., Roettger, M., Sousa, F.L., Lockhart, P.J., Bryant, D., Hazkani-Covo, E., McInerney, J.O., Landan, G., and Martin, W.F. (2015). Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature* 524, 427–432.
- Kujoth, G.C., Leeuwenburgh, C., and Prolla, T.A. (2006). Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging. *Cancer Res.* 66, 7386–7389.
- Kunkel, T.A., and Wilson, S.H. (1998). DNA polymerases on the move. *Nat. Struct. Biol.* 5, 95–99.
- Kuznetsov, A.V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., and Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1928–1939.
- Labbé, K., Murley, A., and Nunnari, J. (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 357–391.
- Larsson, N.G., Eiken, H.G., Boman, H., Holme, E., Oldfors, A., and Tulinius, M.H. (1992). Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome to her child. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 360–363.
- Lee, Y.-S., Lee, S., Demeler, B., Molineux, I.J., Johnson, K.A., and Yin, Y.W. (2010). Each monomer of the dimeric accessory protein for human mitochondrial DNA polymerase has a distinct role in conferring processivity. *J. Biol. Chem.* 285, 1490–1499.
- Liesa, M., and Shrihail, O.S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 17, 491–506.
- Liesa, M., Borda-d'Água, 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-1 β . *PLoS One* 3, e3613.

- 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. FEBS* 242, 171–185.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihi, O., and Hajnóczky, G. (2009). Mitochondrial “kiss-and-run”: interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J.* 28, 3074–3089.
- Logan, D.C. (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57, 1225–1243.
- Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M.-A., Ferré, M., Malinge, M.-C., Guichet, A., Nicolas, G., et al. (2007). Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann. Neurol.* 61, 315–323.
- Longley, M.J., Clark, S., Yu Wai Man, C., Hudson, G., Durham, S.E., Taylor, R.W., Nightingale, S., Turnbull, D.M., Copeland, W.C., and Chinnery, P.F. (2006). Mutant POLG2 Disrupts DNA Polymerase γ Subunits and Causes Progressive External Ophthalmoplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 1026–1034.
- Lopez, M.F., Kristal, B.S., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Shestopalov, A.I., Bogdanova, A., and Robinson, M. (2000). High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* 21, 3427–3440.
- Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., and Lightowlers, R.N. (2016). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res.*
- von der Malsburg, K., Müller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., et al. (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell* 21, 694–707.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 542–548.
- Mao, C.-C., and Holt, I.J. (2009). Clinical and molecular aspects of diseases of mitochondrial DNA instability. *Chang Gung Med. J.* 32, 354–369.
- Martin, W.F., Garg, S., and Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370, 20140330.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol. CB* 16, R551-560.
- McFarland, R., Elson, J.L., Taylor, R.W., Howell, N., and Turnbull, D.M. (2004). Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when “definitely maybe” is not good enough. *Trends Genet. TIG* 20, 591–596.
- McFarland, R., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2007). Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 77, 113–155.
- Meagher, M., and Lightowlers, R.N. (2014). The role of TDP1 and APTX in mitochondrial DNA repair. *Biochimie* 100, 121–124.

- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingberman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 20–26.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**, 1747–1752.
- Mokranjac, D., and Neupert, W. (2007). Protein import into isolated mitochondria. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **372**, 277–286.
- Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., and Servidei, S. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1293–1299.
- Nakada, K., Sato, A., and Hayashi, J. (2009). Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1907–1913.
- 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**, 1209–1220.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **183**, 795–803.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749.
- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159.
- Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 503–536.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., et al. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* **523**, 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**, 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**, 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., et al. (2007b). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* **211**, 423–430.

- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2011a). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell. Signal.* 23, 1534–1545.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011b). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* 12, 565–573.
- Park, J.-H., Zhuang, J., Li, J., and Hwang, P.M. (2016). p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett.* 590, 924–934.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., and Martinou, J.-C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3, e3257.
- Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., Trinkle-Mulcahy, L., et al. (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J.* 33, 2676–2691.
- Pearson, H.A., Lobel, J.S., Kocoshis, S.A., Naiman, J.L., Windmiller, J., Lammi, A.T., Hoffman, R., and Marsh, J.C. (1979). A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J. Pediatr.* 95, 976–984.
- Penttilä, S., Jokela, M., Bouquin, H., Saukkonen, A.M., Toivanen, J., and Udd, B. (2015a). Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann. Neurol.* 77, 163–172.
- Penttilä, S., Jokela, M., Bouquin, H., Saukkonen, A.M., Toivanen, J., and Udd, B. (2015b). Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann. Neurol.* 77, 163–172.
- Pernas, L., and Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 505–531.
- Phadke, M., Lokeshwar, M.R., Bhutada, S., Tampi, C., Saxena, R., Kohli, S., and Shah, K.N. (2012). Kearns Sayre Syndrome--case report with review of literature. *Indian J. Pediatr.* 79, 650–654.
- 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, 1405–1415.
- Pohjoismäki, J.L.O., Wanrooij, S., Hyvärinen, A.K., Goffart, S., Holt, I.J., Spelbrink, J.N., and Jacobs, H.T. (2006). Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic Acids Res.* 34, 5815–5828.
- 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, 1638–1643.

- Prachař, J. (2016). Ultrastructure of mitochondrial nucleoid and its surroundings. *Gen. Physiol. Biophys.* 35, 273–286.
- Praefcke, G.J.K., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133–147.
- Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 213–224.
- Richter, C. (1988). Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 241, 1–5.
- Rizzuto, R. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* 280, 1763–1766.
- Robinson, B.H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J.R., and Wallace, D.C. (1992). Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 48, 122–126.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115, 1663–1674.
- Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., Pagliarani, S., Rizzuti, M., Zheng, L., Filosto, M., et al. (2013a). Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 293–300.
- Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., Pagliarani, S., Rizzuti, M., Zheng, L., Filosto, M., et al. (2013b). Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 293–300.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussenot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., Cano, A., Pouget, J., Pellissier, J.-F., et al. (2012a). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotype. *Brain J. Neurol.* 135, 23–34.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussenot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., Cano, A., Pouget, J., Pellissier, J.-F., et al. (2012b). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy “plus” phenotype. *Brain J. Neurol.* 135, 23–34.
- Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 607–625.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D.C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–828.
- Sage, J.M., and Knight, K.L. (2013). Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress. *Mitochondrion* 13, 350–356.
- Samuels, D.C., Schon, E.A., and Chinnery, P.F. (2004). Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet. TIG* 20, 393–398.

- Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* **114**, 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**, 2763–2774.
- Schon, E.A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 878–890.
- Schrepfer, E., and Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol. Cell* **61**, 683–694.
- Schwarz, T.L. (2013). Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell* **2**, 55–67.
- Seligmann, H. (2010). Mitochondrial tRNAs as light strand replication origins: similarity between anticodon loops and the loop of the light strand replication origin predicts initiation of DNA replication. *Biosystems* **99**, 85–93.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* **147**, 699–706.
- Shin, H.W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K., and Nakayama, K. (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 525–530.
- Shutt, T.E., and Gray, M.W. (2006). Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **62**, 588–599.
- Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., Van Houten, B., Shuman, S., McKinnon, P.J., and Jasin, M. (2011). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* **471**, 245–248.
- Skidd, P.M., Lessell, S., and Cestari, D.M. (2013). Autosomal dominant hereditary optic neuropathy (ADOA): a review of the genetics and clinical manifestations of ADOA and ADOA+. *Semin. Ophthalmol.* **28**, 422–426.
- Skre, H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet.* **6**, 98–118.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliek, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* **143**, 351–358.
- Snow, B.E., Mateyak, M., Paderova, J., Wakeham, A., Iorio, C., Zakian, V., Squire, J., and Harrington, L. (2007). Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1017–1026.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., et al. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission

- GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* **17**, 377–382.
- 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**, 749–755.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3525–3532.
- 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**, 1783–1791.
- de Souza-Pinto, N.C., Mason, P.A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T.V., Rasmussen, L.J., and Bohr, V.A. (2009). Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair* **8**, 704–719.
- de Souza-Pinto, N.C., Aamann, M.D., Kulikowicz, T., Stevnsner, T.V., and Bohr, V.A. (2010). Mitochondrial helicases and mitochondrial genome maintenance. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 503–510.
- Spelbrink, J.N. (2010). Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life* **62**, 19–32.
- Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., et al. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* **28**, 223–231.
- Spiegel, R., Shaag, A., Shalev, S., and Elpeleg, O. (2016). Homozygous mutation in the APOA1BP is associated with a lethal infantile leukoencephalopathy. *Neurogenetics* **17**, 187–190.
- Sykora, P., Croteau, D.L., Bohr, V.A., and Wilson, D.M. (2011). Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7437–7442.
- Tadi, S.K., Sebastian, R., Dahal, S., Babu, R.K., Choudhary, B., and Raghavan, S.C. (2016). Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. *Mol. Biol. Cell* **27**, 223–235.
- Tann, A.W., Boldogh, I., Meiss, G., Qian, W., Van Houten, B., Mitra, S., and Szczesny, B. (2011). Apoptosis induced by persistent single-strand breaks in mitochondrial genome: critical role of EXOG (5'-EXO/endonuclease) in their repair. *J. Biol. Chem.* **286**, 31975–31983.
- Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423.

- Tyynismaa, H., and Suomalainen, A. (2009). Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO Rep.* 10, 137–143.
- Tyynismaa, H., and Suomalainen, A. (2010). Mouse models of mtDNA replication diseases. *Methods San Diego Calif* 51, 405–410.
- Tyynismaa, H., Mjosund, K.P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J.N., Paetau, A., and Suomalainen, A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 17687–17692.
- Vafai, S.B., and Mootha, V.K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374–383.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health Part C* 27, 120–139.
- 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, 1097–1102.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J.J., and Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.* 28, 211–212.
- Van Houten, B., Hunter, S.E., and Meyer, J.N. (2016). Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 21, 42–54.
- Vartak, R., Porras, C.A.-M., and Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4, 582–590.
- Verhoeven, K., Claeys, K.G., Züchner, S., Schröder, J.M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., et al. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain J. Neurol.* 129, 2093–2102.
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J. Cell Biol.* 186, 805–816.
- Wallace, D.C., Ye, J.H., Neckelmann, S.N., Singh, G., Webster, K.A., and Greenberg, B.D. (1987). Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr. Genet.* 12, 81–90.
- Wanrooij, S., and Falkenberg, M. (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1378–1388.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W.T., Mooyer, P.A.W., Wanders, R.J.A., and Leonard, J.V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736–1741.
- Westermann, B. (2010a). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.

- Westermann, B. (2010b). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–884.
- 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**, 341–352.
- Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J.A., Kisker, C., and Bogenhagen, D.F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J. Biol. Chem.* **281**, 374–382.
- Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* **111**, 495–505.
- Yoon, Y., Pitts, K.R., Dahan, S., and McNiven, M.A. (1998). A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **140**, 779–793.
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062–1065.
- Young, M.J., and Copeland, W.C. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **38**, 52–62.
- Young, M.J., Longley, M.J., Li, F.-Y., Kasiviswanathan, R., Wong, L.-J., and Copeland, W.C. (2011). Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3052–3066.
- Zhang, D.-H., Zhou, B., Huang, Y., Xu, L.-X., and Zhou, J.-Q. (2006). The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1393–1404.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., et al. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* **105**, 587–597.
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W.F., and Gould, S.B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr. Opin. Microbiol.* **22**, 38–48.
- Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 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., et al. (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann. Neurol.* **59**, 276–281.