



HAL
open science

Utilisation du modèle levure pour la recherche de voies thérapeutiques contre le syndrome de Barth

Maxence de Taffin de Tilques

► To cite this version:

Maxence de Taffin de Tilques. Utilisation du modèle levure pour la recherche de voies thérapeutiques contre le syndrome de Barth. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0876 . tel-01756397v1

HAL Id: tel-01756397

<https://theses.hal.science/tel-01756397v1>

Submitted on 2 Apr 2018 (v1), last revised 3 Apr 2018 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

Par Maxence de TAFFIN de TILQUES

**UTILISATION DU MODELE LEVURE POUR LA RECHERCHE DE VOIES
THERAPEUTIQUES CONTRE LE SYNDROME DE BARTH**

Sous la direction de : Jean-Paul LASSERRE

Soutenue le 15 décembre 2017

Membres du jury :

Mme CAMOUGRAND Nadine, Directeur de Recherche
Mme PAQUIS-FLUCKLINGER Véronique, Professeur, Université de Nice
Mme DELAHODDE Agnès, Directeur de Recherche, CNRS
M. PROCACCIO Vincent, Professeur, CHU d'Angers
M. LASSERRE Jean-Paul, Maître de Conférences, Université de Bordeaux

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Titre : UTILISATION DU MODELE LEVURE POUR LA RECHERCHE DE VOIES THERAPEUTIQUES CONTRE LE SYNDROME DE BARTH

Résumé :

Les cardiolipines (CL) sont des phospholipides possédant de nombreux rôles dans la structure et le fonctionnement des mitochondries. Elles sont, par exemple, impliquées dans la stabilisation des complexes des oxydations phosphorylantes, la fusion/fission des membranes mitochondriales, l'import de protéines mitochondriales, la biogénèse des centres fer-soufre (Fe-S), l'apoptose, la protection des mitochondries contre le stress oxydatif...L'ensemble de ces fonctions nécessitent que les chaînes d'acides gras de la CL soient majoritairement insaturées.

Le maintien de cette composition en chaînes insaturées requiert une activité acyltransférase portée par la protéine tafazzine, qui est codée par le gène nucléaire TAZ. Des mutations dans ce gène sont la cause du syndrome de Barth (BTHS), qui se caractérise notamment par des myopathies cardiaques et squelettiques, une neutropénie (responsable de nombreuses infections) et des défauts de la chaîne respiratoire. Malgré des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes conduisant à la pathogénicité, il n'existe toujours aucune thérapie pour traiter cette maladie.

Nous avons donc utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae*, chez qui la voie de remodelage des CL par la tafazzine est bien conservée, pour modéliser le BTHS et, ainsi non seulement étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette maladie, mais aussi identifier différentes voies thérapeutiques potentielles (suppresseurs génétiques et molécules pharmacologiques). Nous avons tout d'abord construit une levure délétée pour le gène orthologue TAZ (*TAZ1* chez la levure), la souche $\Delta taz1$. En accord avec des études précédentes, la souche $\Delta taz1$ présente une diminution quantitative de la CL accompagnée d'un changement qualitatif des chaînes d'acides gras^{1,2} (plus d'acides gras saturés et moins d'insaturés). Nous montrons aussi que cette levure mutante a un défaut de croissance en milieu respiratoire à température élevée (36°C) ainsi que des défauts dans plusieurs composants impliqués dans les oxydations phosphorylantes².

De façon intéressante, alors que le défaut primaire (diminution des CL et changement qualitatif des chaînes d'acide gras) est toujours présent, nous montrons que les oxydations phosphorylantes sont restaurées dans la souche $\Delta taz1$ surexprimant *Odc1p*², un transporteur mitochondrial d'intermédiaires du cycle de Krebs, ou par plusieurs composés chimiques. Plusieurs de ces drogues sauvant le mutant, dont la cycloheximide, sont des inhibiteurs partiels de la synthèse protéique cytosolique. Cet effet a été confirmé génétiquement par des mutations affectant les ribosomes cytosoliques. L'ensemble des résultats suggère qu'un défaut au niveau des CL provoquerait un stress protéostatique probablement impliqué dans le processus pathologique.

Références

- 1- Testet, E., et al., *Ypr140wp*, 'the yeast tafazzin', displays a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochem J*, 2005. **387**(Pt 3): p. 617-26.
- 2- de Taffin de Tilques M, Tribouillard-Tanvier D, Tetaud E, Testet E, di Rago JP, Lasserre JP (2017) *Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome*. *Disease models & mechanisms* **10**: 439-450

Mots clés : Syndrome de Barth ; maladie mitochondriale humaine ; tafazzine ; cardiolipines ; modèles levure et cellules humaines ; cibles thérapeutiques ; cycloheximide ; synthèse protéique ; transporteur d'oxo-dicarboxylates.

Title : Exploration of potential therapeutic pathways against the Barth syndrome using yeast as a model

Abstract :

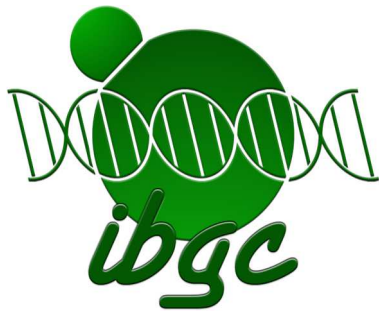
The phospholipid cardiolipin (CL) has many roles in mitochondrial structure and function, ranging from assembly/stability and functioning of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system, fusion and fission of mitochondrial membranes, mitochondrial protein import, iron-sulfur (Fe-S) biogenesis, apoptosis, and protection of mitochondria against oxidative damage. The maintenance of a proper unsaturated acyl chain composition of CL involves the acyltransferase tafazzin in which mutations cause Barth syndrome (BTHS), resulting in cardiac and skeletal myopathy, cyclic neutropenia and respiratory chain defects.

Despite considerable progress in the understanding of the underlying pathogenic mechanisms, there are still no effective therapies to treat this disease. We are using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the tafazzin-based cardiolipin remodeling pathway is conserved, as a model system for the exploration of potential therapeutic pathways against BTHS, by way of genetic suppressors and chemical screening. We first constructed a yeast strain lacking the orthologous tafazzin gene ($\Delta taf1$). Consistent with previous studies, our $\Delta taf1$ yeast failed to grow on non-fermentable carbon sources at elevated temperatures (36°C) and exhibited defects in several components of the mitochondrial respiratory system.

Interestingly, we found that oxidative phosphorylation was fully restored in $\Delta taf1$ yeast by overexpressing Odc1p^[1]-a mitochondrial carrier that transports Krebs cycle intermediates- and by a number of chemical compounds. Some of the rescuing drugs, especially cycloheximide, act by partially inhibiting cytosolic protein synthesis leading to a full recovery of oxidative phosphorylations. Our findings identify potential cellular components and pathways for the pharmacological treatment of BTHS patients.

1. M. de Taffin de Tilques, D. Tribouillard-Tanvier, E. Tetaud, E. Testet , J.P. di Rago, J.P. Lasserre, Disease models & mechanisms (2017) **10**: 439-450

Keywords : Barth syndrome ; human mitochondrial disease ; tafazzin ; cardiolipin ; yeast and human cells models ; therapeutic targets ; cycloheximide ; protein synthesis ; oxodicarboxylate transporter.



Thèse préparée à

l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires

UMR 5095 CNRS/Université de Bordeaux

Equipe « Génétique Moléculaire des Systèmes Mitochondriaux »

1, rue Camille Saint Saëns

CS 61390

33077 Bordeaux cedex

Remerciements...

A Jean-Paul Lasserre tout d'abord. Il y a trois ans tu as osé miser sur moi...j'espère avoir été à la hauteur de tes espérances...Je te suis en tout cas très reconnaissant pour tout ce que tu m'as appris, pour ta gentillesse, pour ta patience (que j'ai dû pourtant parfois mettre à rude épreuve !) et ton implication (en particulier ces dernières semaines...) dans cette thèse. Merci !

A Nadine Camougrand, au Professeur Véronique Paquis-Flucklinger, au Docteur Agnès Delahodde, au Professeur Vincent Procaccio, au Docteur Rodrigue Rossignol qui me faites l'honneur de participer à mon jury de thèse. Vous avez accepté cette tâche avec beaucoup de spontanéité malgré vos emplois du temps chargés et je vous en remercie. J'espère maintenant que la lecture de ce mémoire sera à la hauteur de vos attentes.

A Jean-Paul di Rago. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir fait partager un peu de votre impressionnante culture scientifique !

A Déborah Tribouillard-Tanvier, ma « seconde directeur de thèse » et colloc de bureau pour ta gentillesse et ton aide précieuse.

A tous les membres de l'équipe : Elodie, Marine, François et Kéwin. Merci de m'avoir supporté pendant trois ans, malgré mes rengaines...Merci pour votre aide, vos conseils, votre bonne humeur, pour les discussions à la pause café...Je n'oublie pas non plus les « anciens » : Manu, Stéphane, Krystyna et Natalia !

Merci à tous ceux de l'IBGC avec qui j'ai eu le plaisir de discuter ou travailler, notamment à Bénédicte Salin pour m'avoir fait découvrir la beauté de la cellule à travers un microscope électronique. Merci aussi aux membres de l'ancienne équipe de Christophe Cullin et plus particulièrement à Christelle Marchal. Merci aussi Marion pour tes conseils et ton amitié.

A Eric Testet qui m'a initié avec beaucoup de patience à la lipidomique.

A Papa et Maman. Vous avez toujours tout fait pour que je puisse faire les études de mon choix, allant jusqu'à relire un mémoire entier sur les mitochondries...Merci.

A mes frères et sœurs, belles-sœurs et nièces : Amaury & Anne, Isaure et Philippine.....Mathilde/sœur Gaëtane, Bertrand & Véronique, Colombar et Clémence. Notre esprit de famille m'a toujours été d'un grand réconfort...merci.

A ma famille « plus large » : Bonne-Maman des Gauthiers et tante Poucette, mes oncles et tantes, cousins et cousines « dont l'énumération serait longue et fastidieuse » ;-)) Il faut quand même que je cite plus particulièrement Alix-Marie, ma super binôme de TP, Nolwenn, Servane, Quitterie, Amandine, Nicolas, Jean, Vincent, Etienne, Clo et Germain, MAM et Sébastien et Emmeline et Guillemette, mes premières collocs. Grâce à vous ma vie bordelaise a été bien agréable.

A tante Eliane qui m'a soigné comme un coq en pâte pendant quatre ans...

A mes amis, notamment Joseph pour tes coups de fils réconfortants depuis le grand Nooord !

Je pourrais continuer encore longtemps mais il me faudrait doubler le volume de ce mémoire, ce qui entraînerait des difficultés pour la reliure...alors merci à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé dans ce travail.

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS	1
--	---

CHAPITRE I : La Mitochondrie

I.1. Découverte des mitochondries	4
I.2. Structure mitochondriale	4
I.2.1. Membrane mitochondriale externe (MME)	5
I.2.2. Membrane mitochondriale interne (MMI)	5
I.2.3. La matrice	6
I.3. Génome mitochondrial	6
I.3.1. Un ADN circulaire double brin	7
I.3.2. Un système de réplication de l'ADNmt autonome	7
I.3.3. Quel système de réparation de l'ADNmt ?	8
I.3.4. Des tailles variables	8
I.3.5. Comment expliquer ces différences de taille ?	9
I.4. Les fonctions mitochondriales	11
I.4.1. Les mitochondries impliquées dans de nombreuses fonctions	11
I.4.1.1. Le cycle de Krebs	11
- Cycle de Krebs	
- Les réactions anaboliques associées au cycle de Krebs	
I.4.1.2. La β -oxydation	12
I.4.1.3. La néoglucogénèse	13
I.4.1.4. Autres fonctions	13
I.4.2. Les oxydations phosphorylantes	13
I.4.2.1. Les complexes impliqués dans la chaîne respiratoire	14
I.4.2.2. Le complexe V ou ATP synthase	15
I.4.2.3. Les transporteurs ADP/ATP et P_i/H^+	16
I.4.2.4. Le fonctionnement des OXPHOS	16
I.5. La théorie endosymbiotique	17
I.5.1. Le concept de l'endosymbiose	17
I.5.2. ...et la mitochondrie	18
I.5.3. Les nombreuses théories de l'endosymbiose	19
I.5.3.1. Quelle est l'origine de l'endosymbiote ?	19
I.5.3.2. Quelle est l'origine de la cellule hôte ?	19
I.5.3.3. Quand a eu lieu l'endosymbiose ?	20
I.5.3.4. Qu'est-ce qui a favorisé l'endosymbiose et en a assuré la pérennité ?	21

CHAPITRE II : Les maladies rares

II.1. Les maladies rares	24
II.1.1. Epidémiologie	24
II.1.2. Des plans nationaux	25
II.2. Les maladies mitochondriales	26
II.2.1. Les signes cliniques	26
II.2.2. Gènes responsables de maladies mitochondriales	28
II.2.3. Maladies mitochondriales primaires	29
II.2.3.1. Généralités	29
II.2.3.2. Transmission des maladies mitochondriales primaires	29
- Héritage maternel	
- Mutations <i>de novo</i>	
II.2.3.3. Notions d'homoplasmie et d'hétéroplasmie.....	30
II.2.3.4. Mutations de gènes mitochondriaux codant pour des protéines.....	31
II.2.3.5. Mutations de gènes mt codant pour des ARNt ou ARNr	32
- Les gènes codant les ARNt-mt	
- Les gènes codant les ARNr-mt	
II.2.3.6. Espèces réactives de l'oxygène et ADN mitochondrial	34
- Formation des ROS	
- Systèmes de détoxification des ROS	
- Impacts des ROS	
II.2.3.7. Facteurs aggravants des maladies mitochondriales primaires	37
II.2.4. Maladies mitochondriales secondaires	37
II.2.4.1. Mutations dans des gènes nucléaires	37
- Gènes nucléaires impliqués dans les OXPHOS	
- Gènes impliqués dans les autres fonctions mitochondriales	
II.2.4.2. Maladies avec implication indirecte de la mitochondrie	40
II.2.4.3. Influence de facteurs environnementaux	40
- Facteurs médicamenteux	
- Autres facteurs	
II.3. Modèles d'étude des maladies mitochondriales	42
II.3.1. Les cellules humaines	43
II.3.2. La souris	44
II.3.3. La drosophile	46
II.3.4. Le nématode	47
II.3.5. La levure	49
II.3.6. Conclusion	52
II.4. Traitement des maladies mitochondriales	53
II.4.1. Peu de traitements disponibles	53
II.4.2. Thérapie génique	53
II.4.3. Prise en charge des symptômes des patients	55
II.4.4. Fécondation <i>in vitro</i> à « trois parents »	55

CHAPITRE III : Le syndrome de Barth

III.1. Historique	58
III.2. Epidémiologie	58
III.3. Description clinique de la maladie.....	59
III.4. Conséquences à l'échelle cellulaire	60
III.4.1. TAZ et tafazzine	60
III.4.1.1. Quelle est la fonction de la protéine ?	60
III.4.1.2. Plusieurs isoformes de la tafazzine	60
III.4.1.3. Localisation cellulaire de la tafazzine	61
III.4.1.4. Complexes protéiques impliquant la tafazzine	61
III.4.2. Les cardiolipines (CL)	63
III.4.2.1. Structure des cardiolipines.....	63
- Description de la cardiolipine	
- Variabilité de la composition en chaînes acyles	
III.4.2.2. Synthèse des cardiolipines	64
III.4.2.3. Remodelage des cardiolipines.....	65
- Mécanisme	
- Comment expliquer les spécificités des chaînes acyles	
III.4.2.4. Dégradation des cardiolipines.....	70
III.4.2.5. Fonctions des cardiolipines	70
- Cardiolipines et structure mitochondriale	
✓ Formation des crêtes mitochondriales	
✓ Sites de contacts	
- Cardiolipines et oxydations phosphorylantes	
✓ CL et supercomplexes de la chaîne respiratoire	
✓ CL et le transporteur ADP/ATP	
✓ CL et le transporteur Pi/H ⁺	
✓ CL et ATP synthase (complexe V)	
- Cardiolipines et dynamique mitochondriale	
✓ La fusion	
✓ La fission	
- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales	
✓ CL et homéostasie du Fer	
✓ CL et mitophagie	
✓ CL et apoptose	
III.5. Modèles d'études du syndrome de Barth	87
III.5.1. Les cellules « <i>human induced Pluripotent Cells</i> »	87
III.5.2. Modélisation chez la souris.....	89
III.5.3. Modélisation chez la drosophile	90
III.5.4. Modélisation chez le poisson zèbre.....	90
III.5.5. Modélisation chez le nématode.....	91
III.5.6. Modélisation chez la levure	91
III.5.7. Conclusion.....	92
III.6. Approches thérapeutiques du syndrome de Barth	92

RÉSULTATS

ARTICLE I

I. Résultats préliminaires à l'article : modélisation chez la levure.....	96
I.1. Recherche du phénotype sur milieu solide	96
I.2. Recherche des conditions de croissance en milieu liquide	97
I.3. Construction des souches avec plasmides.....	97
II. Résultats principaux de l'article.....	98
II.1. Vérification des souches.....	98
II.2. Caractérisation du mutant	98
II.3. <i>ODC1</i> , un gène suppresseur	99
II.3.1. Choix du gène <i>ODC1</i>	99
II.3.2. Qui est <i>ODC1</i> ?.....	99
III. Article I : <i>Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome</i>	100
IV. Résultats complémentaires	113
IV.1. Analyse lipidomique.....	113
IV.2. Analyse des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET)	114
IV.3. Estimation de la biogénèse mitochondriale.....	114
IV.4. Mitophagie	115
IV.5. Respiration sur cellules entières.....	116
IV.6. Implication de la voie rétrograde	116
V. Discussion	117
V.1. Défauts des OXPHOS	117
V.1.1. Résultats similaires avec d'autres études	118
V.1.2. Des résultats légèrement différents	119
V.1.3. Des études très différentes.....	120
V.2. Perte de l'ADNmt	120
V.3. Composition lipidique des membranes mitochondriales	121
V.3.1. Le défaut en CL : un phénotype robuste.....	121
V.3.2. Qu'en est-il des autres phospholipides ?	121
V.3.3. La composition des chaînes d'acides gras de la CL	123
V.4. Morphologie mitochondriale.....	123
V.5. Abondance mitochondriale	124
V.6. Sauvetage du mutant $\Delta taz1$ par la surexpression du gène <i>ODC1</i> et par l'oléate	127
V.6.1. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant $\Delta fmc1$ par la surexpression du gène <i>ODC1</i>	127
V.6.2. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant $\Delta sym1$ par la surexpression du gène <i>ODC1</i>	130
- V.6.2.1. La voie rétrograde est-elle impliquée ?	131
- V.6.2.2. Lien entre le transporteur Odc1p et la voie rétrograde	131
- V.6.2.3. Sauvetage par l'oléate	133
VI. Conclusions.....	135

ARTICLE II

I. Introduction	138
II. Article II : <i>Decreasing cytosolic translation is beneficial to yeast and human Tafazzin-deficient cells</i>	140
III. Résultats complémentaires.....	162
III.1. Comptage des mitochondries par microscopie électronique à transmission	162
III.2. Suivi de la biogénèse mitochondriale.....	162
III.3. Respiration sur cellules entières.....	163
III.3.1. Restauration de la respiration par les doubles délétions $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$	163
III.3.2. Restauration de la respiration par la cycloheximide.....	164
III.4. Suivi de la synthèse protéique cytosolique et mitochondriale par pulse	164
IV. Discussion	165
IV.1. Qu'est-ce que le stress protéostatique ?.....	166
IV.1.1. La réponse UPRmt.....	167
IV.1.2. Les réponses à un stress protéostatique chez la levure	167
- IV.1.2.1. Réponse au stress mPOS.....	168
- IV.1.2.2. Réponse UPRam	168
IV.2. Un défaut en tafazzine induit-il un stress protéostatique.....	169
IV.3. Bénéfices d'une diminution de la synthèse protéique cytosolique en cas de dysfonctions mitochondriales	171
IV.4. Toxicité de la cycloheximide	175
V. Conclusion	176

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Souches, milieux de culture et plasmides	181
A.1. Culture des levures	181
A.1.1. Souches de levures.....	181
A.1.2. Milieux de culture	181
A.1.3. Culture et conservation des souches	182
A.1.4. Tests de drogues	183
A.2. Culture cellulaire HeLa	183
A.2.1. Conditions de culture.....	183
A.2.2. Mesure de la prolifération en temps réel par xCELLigence	184
B. Techniques de biologie moléculaire	185
B.1. Construction des souches de levures	185
B.1.1. Construction de la souche <i>Δtaz1</i>	185
B.1.2. Construction des souches <i>taz1Δ/rpl6bΔ</i> et <i>taz1Δ/rei1Δ</i>	185
B.1.3. Construction des souches <i>Δrtg1</i> et <i>Δtaz1/Δrtg1</i>	186
B.2. Plasmides utilisés	187
C. Techniques de biochimie	187
C.1. Préparation de mitochondries par digestion enzymatique	187
C.2. Analyses biochimiques des souches de levure	189
C.2.1. Mesure de la respiration sur cellules entières.....	189
C.2.2. Mesure de la respiration mitochondriale	189
C.2.3. Mesure du potentiel mitochondrial $\Delta\psi$	189
C.2.4. Mesure de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase	190
C.2.5. Hydrolyse sur gel d'ATP	191
C.2.6. Activité complexe II	192
C.2.7. Activité complexe IV.....	192
C.2.8. Mesure de la production de ROS	192
C.2.9. Estimation de la biogenèse mitochondriale.....	192
C.3. Préparation d'échantillons protéiques	193
C.3.1. Préparation des protéines à partir de mitochondries isolées.....	193
C.3.2. Extraits cellulaires totaux	193
C.4. Dosage colorimétrique des protéines	194
C.5. Extraction à la digitonine des complexes membranaires mitochondriaux	194
C.6. Radiomarquage des protéines <i>in vivo</i>	195
C.7. Electrophorèse	195
C.7.1. En conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	195
C.7.2. En conditions non dénaturantes (BN-PAGE ou CN-PAGE)	196
C.8. Western blot	196
C.8.1. Migration des protéines.....	196
C.8.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose avec l'iBlot™	197
C.8.3. Immuno-détection	197
C.8.4. Liste des anticorps utilisés.....	198
C.9. Analyse des lipides	198
D. Techniques de biologie cellulaire	198
D.1. Analyse ultrastructurale	198
Bibliographie	200

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn : ADN nucléaire

ADP : Adénosine DiPhosphate

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : ARN interférence

ARNm : ARN messenger

ARNmt-r : ARN ribosomique mitochondrial

ARNmt-t : ARN de transfert mitochondrial

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BER : système de réparation par excision de base

BN-PAGE : *Blue Native–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition native et en bleu de Coomassie

BTBS : syndrome de Barth

C16:0 : acide palmitique

C16:1 : acide palmitoléique

C18:0 : acide stéarique

C18:1 : acide oléique

C18:2 : acide linoléique

C18:3 : acide linoléinique

C22:6 : acide docosahéxaénoïque

(C18:2)₄ : Cardiolipine tétralinéique

CCCP : Carbonyl Cyanide m-ChloroPhényl hydrazone

CHX : cycloheximide

CI : complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase)

CII : complexe II (succinate-déshydrogénase)

CIII : complexe III (Complexe b-c1 ou ubiquinol-cytochrome c réductase)

CIV : complexe IV (cytochrome c oxydase)

CV : complexe V (complexe de l'ATP synthase)

CL : cardiolipines

CN-PAGE : *Clear Native–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition native

CoQ₁₀ : coenzyme Q₁₀

CR : chaîne respiratoire

CRISPR/Cas9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées »/*CRISPR associated protein 9*

CSM : Complete Synthetic Medium/Complete Supplement Mixture, milieu minimum

Cytc : cytochrome c

DO : Densité Optique

EIM : Espace Inter-Membranaire

FADH/FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide oxydée/réduite

Fe-S : centre fer-soufre

FIV : Fécondation *in vitro*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GTP : Guanosine triphosphate

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

iPSC : induced Pluripotent Stem Cells

KD : *knock-down*, diminution de l'expression d'un gène

KO : *knock-out*, inactivation totale d'un gène

LHON : *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*

MEF : *Mouse Embryonic Fibroblast*, cellules embryonnaires de souris

MELAS : *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episode*, ou Myopathie mitochondriale, Encéphalopathie, Acidose Lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux

MERRF : *Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers* ou épilepsie myoclonique avec fibres rouges déchiquetées (ou « en lambeaux »)

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MIA : *Mitochondrial Intermembrane-space Assembly machinery*

MIDD : *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*, ou diabète avec surdité de transmission maternelle

MLCL : MonoLysoCardioLipines

MME : Membrane Mitochondriale Externe

MMI : Membrane Mitochondriale Interne

mPOS : *mitochondrial Precursor Over-Accumulation Stress*

NAD⁺/NADH : Nicotinamide Adénine DiNucléotide oxydé/réduit

NARP : syndrome Neuropathie, Ataxie, Rétinite Pigmentaire

OXPHOS : oxydations phosphorylantes

PA : acide phosphatidique

pb : paires de bases

PC : phosphatidylcholine

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, Réaction de Polymérisation en Chaîne

PE : phosphatidylethanolamine

PG : phosphatidylglycérol

PI : phosphatidylinositol

Pi : Phosphate inorganique

PS : phosphatidylsérine

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SAM : *Sorting and Assembly Machinery*

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate/*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

shARN : *Small Hairpin ARN*, petits ARN en épingle à cheveux

TALEN : *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

Tet-On : *Tetracyclin-On*, système inductible par la doxycycline

TIM : *Translocator of the Inner Membrane*

TMPD : Tri Méthyl Phénylène Diamide

TOM : *Translocator of the Outer Membrane*

UDO : Unité de Densité Optique

UPR : *Unfolded Protein Response*

UPR^{am} : *Unfolded Protein Response activated by protein mistargeting*

UPR^{mt} : *mitochondrial Unfolded Protein Response*

WT : *Wild Type*, sauvage

YPDA : *Yeast Peptone Dextrose Adenine*, milieu riche complétement en glucose et adénine

YPE : *Yeast Peptone Ethanol*, milieu riche complétement en éthanol

YPEGal : *Yeast Peptone Ethanol/ Galactose*, milieu riche complétement en galactose et en éthanol

$\Delta\Psi$: potentiel de membrane mitochondrial

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS

L'une des thématiques majeures pour l'équipe du docteur Jean-Paul di Rago est la modélisation de pathologies mitochondriales chez la levure. En effet, dès 2003, Jean-Paul di Rago a eu l'idée d'utiliser la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour modéliser la pathologie NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire) et trouver des molécules actives pour essayer de traiter et soigner les patients. Les résultats ont permis effectivement d'identifier des molécules actives validant ainsi la méthodologie. De plus, ces résultats ont aussi permis de mettre en lumière certains mécanismes moléculaires sous-jacents de cette pathologie (Couplan *et al.*, 2011). Afin d'étendre cette stratégie à d'autres pathologies et d'avoir accès à d'autres compétences ainsi qu'à d'autres modèles d'étude, Jean-Paul di Rago a mis en place un consortium « Mitoscreen » regroupant plusieurs laboratoires. De plus, dans le même temps, l'équipe s'est intéressée à d'autres pathologies mitochondriales humaines telles que la neurohépatopathie de type Navajo par exemple.

J'ai été recruté, pour ma thèse, afin de participer à l'un des projets de l'équipe : l'étude du syndrome de Barth (BTHS). Cette pathologie, bien que décrite dès les années 80, reste mal comprise et ne bénéficie toujours pas de thérapie. L'objectif de l'équipe était donc de modéliser le BTHS dans le modèle levure *Saccharomyces cerevisiae* dans un premier temps. Le modèle levure étant un eucaryote plus simple que des cellules humaines dont les processus biologiques principaux sont conservés, il semble plus aisé pour comprendre et décortiquer les mécanismes aboutissants à la pathologie. De plus, comme présenté dans l'introduction, cet organisme unicellulaire permet de rechercher, assez simplement, des pistes thérapeutiques. J'ai donc travaillé, au cours de ma thèse, sur un modèle levure du BTHS.

Mon premier objectif a été de trouver les conditions de cultures optimales pour l'expression phénotypique de la délétion du gène *TAZ1*. Une fois les conditions de cultures mises au point, j'ai pu mettre en évidence chez le mutant $\Delta taz1$ un certain nombre de défauts phénotypiques, caractéristiques des symptômes de patients atteints du BTHS : défauts lipidiques, défauts respiratoires, défaut de maintenance de l'ADN mitochondrial...

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS

Ces défauts caractérisés ont servi, dans un second temps, de critères pour la recherche de pistes thérapeutiques potentielles. Nous avons alors pu mettre en évidence un sauvetage du mutant *Δtaz1* par la surexpression du gène *ODC1*, un transporteur d'intermédiaires du cycle de Krebs. De même, la diminution partielle de la synthèse protéique cytosolique amène aussi, comme nous avons pu le montrer par une approche génétique ainsi que par l'utilisation d'inhibiteurs de la traduction cytosolique, une amélioration de la croissance respiratoire du mutant *Δtaz1*. Ces deux voies thérapeutiques semblant différentes, nous avons essayé de comprendre quels mécanismes moléculaires pouvaient bien être mis en jeu. À ce jour, nous n'avons que quelques données préliminaires qui nous donnent des pistes discutées dans la thèse. Dans ce mémoire, je présente donc les deux articles concernant chacune des voies thérapeutiques avec leurs résultats complémentaires et nos hypothèses sur les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Un autre challenge était de vérifier si les molécules trouvées actives sur le modèle *Saccharomyces cerevisiae* pouvaient aussi être actives sur des modèles eucaryotes supérieurs. Des premiers résultats sur des cellules HeLa semblent très prometteurs.

CHAPITRE I : La Mitochondrie

Sommaire

I.1. Découverte des mitochondries	4
I.2. Structure mitochondriale	4
I.2.1. Membrane mitochondriale externe (MME)	5
I.2.2. Membrane mitochondriale interne (MMI)	5
I.2.3. La matrice	6
I.3. Génome mitochondrial	6
I.3.1. Un ADN circulaire double brin	7
I.3.2. Un système de réplication de l'ADNmt autonome	7
I.3.3. Quel système de réparation de l'ADNmt ?	8
I.3.4. Des tailles variables	8
I.3.5. Comment expliquer ces différences de taille ?	9
I.4. Les fonctions mitochondriales	11
I.4.1. Les mitochondries impliquées dans de nombreuses fonctions	11
I.4.1.1. Le cycle de Krebs	11
- Cycle de Krebs	
- Les réactions anaboliques associées au cycle de Krebs	
I.4.1.2. La β -oxydation	12
I.4.1.3. La néoglucogénèse	13
I.4.1.4. Autres fonctions	13
I.4.2. Les oxydations phosphorylantes	13
I.4.2.1. Les complexes impliqués dans la chaîne respiratoire	14
I.4.2.2. Le complexe V ou ATP synthase	15
I.4.2.3. Les transporteurs ADP/ATP et P_i/H^+	16
I.4.2.4. Le fonctionnement des OXPHOS	16
I.5. La théorie endosymbiotique	17
I.5.1. Le concept de l'endosymbiose	17
I.5.2. ...et la mitochondrie	18
I.5.3. Les nombreuses théories de l'endosymbiose	19
I.5.3.1. Quelle est l'origine de l'endosymbiote ?	19
I.5.3.2. Quelle est l'origine de la cellule hôte ?	19
I.5.3.3. Quand a eu lieu l'endosymbiose ?	20
I.5.3.4. Qu'est-ce qui a favorisé l'endosymbiose et en a assuré la pérennité ?	21

Selon certains scientifiques, notamment Lane et Martin (Lane et Martin, 2010), si nous sommes ce que nous sommes aujourd'hui, à savoir des êtres eucaryotes supérieurs, nous le devons principalement à un organe, qui a été capital au cours de l'évolution par son apport d'énergie : la mitochondrie. Au cours de cette introduction, nous décrirons cet organe essentiel, puis nous montrerons que des déficiences mitochondriales peuvent avoir de lourdes conséquences, en nous intéressant aux pathologies associées, et plus particulièrement à l'une d'elles : le syndrome de Barth.

I.1. Découverte des mitochondries

Les premières mentions de mitochondries remontent aux années 1840, soit quelques années après la description du noyau. Plus tard, en 1890, Altmann a remarqué que ces structures étaient ubiquitaires. Du fait de la présence de ces structures dans toutes les cellules, il a postulé que ces « organismes élémentaires » étaient vitaux. C'est pourquoi, le nom de « bioplastes », du grec *βίος* (la vie), et *βλαστός* (le germe) a été choisi. Ce n'est qu'en 1898 que le nom définitif de « mitochondries » leur a été donné. Ce nom leur vient de l'observation, au cours de la spermatogénèse, de mitochondries sous forme filamenteuse (du grec « *μίτος* », fil) ou sous forme de granules (du grec « *χόνδρος* », granules). Puis, les progrès de la science ont permis l'accumulation de nombreuses connaissances (structure, génome, fonctions, origines...) sur cet organe mystérieux, grâce notamment aux progrès techniques de la microscopie, et de la biochimie...

I.2. Structure mitochondriale

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes nos cellules, à l'exception des hématies. Le nombre de mitochondries varie de 500 à 2000 par cellule, en fonction des besoins énergétiques de celle-ci. Ainsi, les mitochondries représentent 80% du volume cellulaire des cellules de la rétine, 40% pour les cellules cardiaques, alors qu'on ne retrouve, en moyenne, que deux à six mitochondries dans les thrombocytes. La taille et la forme des mitochondries est, elle aussi, dépendante des besoins énergétiques des cellules, ainsi que de leur état physiologique : par le jeu de l'alternance fusion/fission, les mitochondries pourront

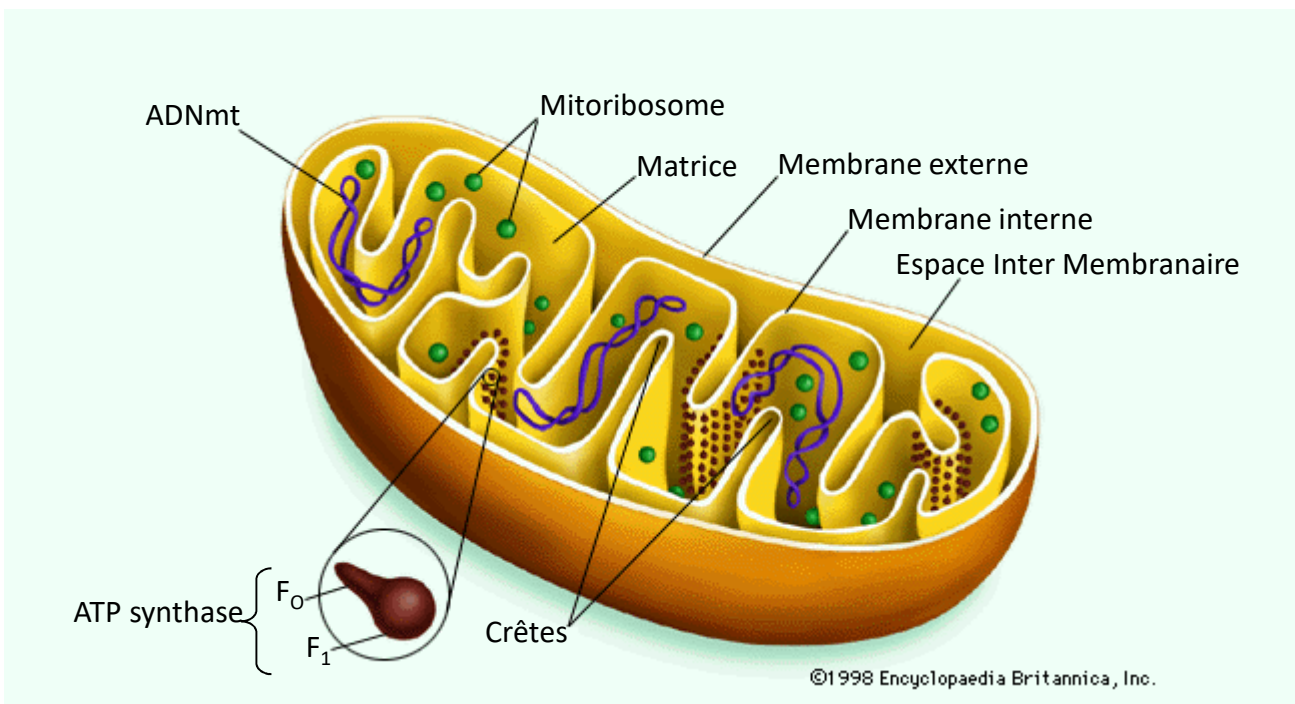


Figure 1 : Structure globale de la mitochondrie. Les mitochondries possèdent deux membranes, l'une interne (MMI) et l'autre externe (MME). Ces deux membranes délimitent deux compartiments qui sont l'espace intermembranaire (EIM) et la matrice. La membrane interne forme des invaginations (crêtes) qui portent de nombreux complexes protéiques et notamment les complexes des oxydations phosphorylantes. L'un de ces complexes, l'ATP synthase, est schématisé ici, et est composé de deux domaines : Le domaine transmembranaire FO et le domaine catalytique F1 tourné vers la matrice. La matrice contient aussi de l'ADNmt qui code pour, notamment, 13 protéines impliquées dans les oxydations phosphorylantes.

être individualisées en granules ou fusionnées en réseau, leur diamètre variant alors entre 0,5 et 1 μm , et leur taille pouvant varier entre 1 et 10 μm .

Du fait de leur origine endosymbiotique (I.5. La théorie endosymbiotique), les mitochondries ont la particularité de posséder une double membrane, l'une interne (membrane mitochondriale interne, MMI), l'autre externe (membrane mitochondriale externe, MME), qui délimitent un espace inter-membranaire (EIM) et une matrice (Fig.1).

I.2.1. Membrane mitochondriale externe (MME)

La MME est composée d'environ 60% de protéines et 40% de lipides. Les porines représentent une grande partie de ces protéines (environ 10% des protéines totales de la mitochondrie !), et sont impliquées dans la forte perméabilité de la MME. En effet, les porines forment des canaux voltage-dépendants très peu sélectifs, puisqu'ils laissent passer toutes les molécules inférieures à 5kDa. Les propriétés de la porine font donc de la MME une membrane non sélective.

I.2.2. Membrane mitochondriale interne (MMI)

La MMI, quant à elle, est beaucoup plus sélective que la MME. En effet, même des petites molécules telles que les ions ou les substrats métaboliques nécessitent des transporteurs protéiques pour le passage de cette membrane. Une autre particularité de cette membrane est son fort enrichissement en protéines (75% de protéines pour 25% de lipides environ), supérieur à toutes les autres membranes (Vogel *et al.*, 2006). La composition en phospholipides de cette MMI est aussi très particulière et caractéristique de la mitochondrie. Cette particularité est surtout due à la présence d'un phospholipide particulier, la cardiolipine (CL), trouvé exclusivement dans les membranes mitochondriales et essentiellement au niveau de cette MMI. Par la suite, Nous nous intéresserons plus en détail à ces CL lors du chapitre concernant le syndrome de Barth. La MMI est organisée en deux domaines morphologiques et fonctionnels :

- la « membrane frontière interne » (IBM, *inner boundary membrane*), qui fait face à la MME, et peut s'y associer au niveau de points de contact. Cette membrane constitue une seconde enveloppe. Il existe aussi une interaction fonctionnelle entre MME et IBM

pour le transport de protéines *via* les complexes TIM et TOM (*Translocator of the Inner/Outer Membrane*) ou de l'ATP par son transporteur *ANT2*,

- les crêtes mitochondriales, qui sont formées par invagination de la MMI et représentent généralement la majeure surface de cette membrane. Ces crêtes portent les différents complexes protéiques des oxydations phosphorylantes (OXPHOS, comprenant la chaîne respiratoire, l'ATP synthase et les transporteurs de l'ADP/ATP et du Phosphate inorganique), mais aussi différentes protéines impliquées dans la biogénèse des centres fer/soufre (Fe/S), par exemple.

Comme dit précédemment, les CL sont majoritairement retrouvées à la MMI, mais une faible quantité peut être observée à la MME. Quantitativement, la répartition des phospholipides des membranes mitochondriales se fait comme suit : 40% de phosphatidylcholine (PC), 30% de phosphatidyléthanolamine (PE), 10-15% de cardiolipines (CL), 10-15% de phosphatidylinositol (PI), 5% d'acide phosphatidique (PA) et 5% de phosphatidylsérine (PS).

1.2.3. La matrice

La MMI délimite aussi un espace matriciel, ou « matrice », contenant de nombreuses protéines, notamment des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, la β -oxydation ou la synthèse d'hormones. La matrice mitochondriale est aussi très importante pour l'homéostasie du calcium puisqu'elle peut servir de compartiment de stockage de ce cation divalent et contenir de 20 à 50% d'ions Ca^{2+} . C'est aussi dans ce compartiment matriciel qu'est retrouvé non seulement l'ADN mitochondrial (ADNmt), mais aussi les ARNs et les ribosomes mitochondriaux (mitoribosomes) nécessaires à l'expression de ce génome mitochondrial.

1.3. Génome mitochondrial

La mitochondrie, tout comme les chloroplastes, possède son propre génome. Le séquençage de cet ADNmt en 1981 par Anderson *et al.* (Anderson *et al.*, 1981) a permis une meilleure compréhension de son organisation.

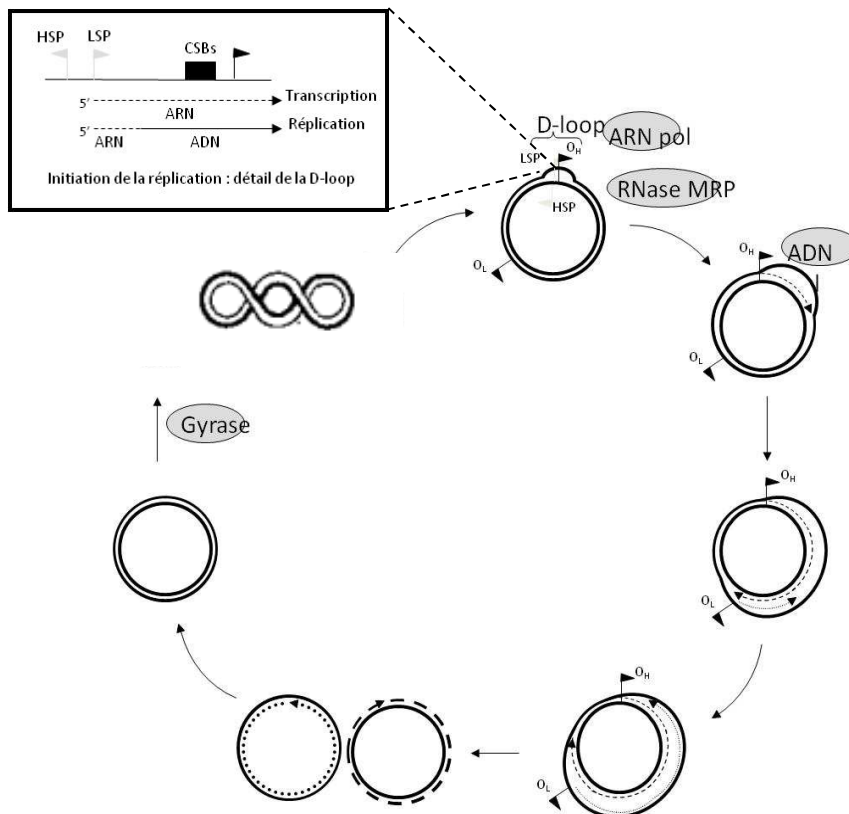


Figure 2 : Mécanisme de réplication du génome mitochondrial animal. Modèle proposé par Clayton (Clayton, 1982) pour le mécanisme de réplication du génome mitochondrial des mammifères. Les brins en cours de réplication sont représentés en lignes pointillées. HSP, LSP : Heavy et Light Strand Promoter (origines de transcription) O_H , O_L : Origine de réplication des brins lourd et léger. CSBs : Blocks de Séquence Conservé. L'encart contient une représentation schématique de la D-loop (« displacement loop »)

1.3.1. Un ADN circulaire double brin

Le génome mitochondrial est circulaire double brin (Sinclair & Stevens, 1966), avec un brin dit « lourd » (H, *heavy*) composé principalement de purines, et un brin « léger » (L, *light*), composé, quant à lui, essentiellement de pyrimidines. L'estimation du nombre de copies d'ADNmt est très difficile, en raison de la grande variabilité d'une cellule à l'autre. Cependant, ce nombre est de l'ordre du millier chez l'Homme (Bogehagen, 2012). Chez la levure, les scientifiques considèrent qu'il y a environ 50 à 100 copies d'ADNmt par cellule (Williamson, 2002) organisées, non pas en chromosomes, mais en « nucléoïdes » (Bogehagen, 2012).

1.3.2. Un système de réplication de l'ADNmt autonome

Bien que très petit par rapport au génome nucléaire, la réplication est un phénomène très complexe qui fait intervenir de nombreux facteurs.

Les nombreux travaux concernant le mécanisme de la réplication de l'ADN mitochondrial des animaux ont été réalisés chez les mammifères, particulièrement sur l'homme et la souris (Clayton, 1982 # 1991 # 1992). Le génome mitochondrial des animaux possède deux origines de réplifications : l'origine de réplication du brin lourd (OH) et l'origine de réplication du brin léger (OL). La polymérisation du brin lourd est initiée à partir d'une amorce ARN synthétisée soit par une ARN polymérase soit par une primase. L'extrémité 3'OH libre de cette amorce est utilisée par l'ADN polymérase gamma, et la synthèse du brin lourd H peut commencer. Cette synthèse est unidirectionnelle. Arrivé au deux tiers du génome mitochondrial, l'origine de réplication du brin léger L est alors exposée, ce qui permet le début de la synthèse de ce brin L dans la direction opposée à celle de la réplication du brin H. La synthèse du brin léger étant initiée beaucoup plus tard, c'est une réplication asymétrique. Les deux molécules filles se séparent et la synthèse est achevée afin d'obtenir la formation de deux molécules filles contenant chacune les deux brins d'ADN (Fig. 2).

Comme dit ci-dessus, c'est l'ADN polymérase gamma qui permet la réplication de cet ADNmt. De manière générale, l'ADN polymérase γ est la seule ADN polymérase présente dans la mitochondrie. Son gène est nucléaire et, la protéine est importée dans la mitochondrie grâce à une séquence N-terminale à adressage mitochondrial (Bolden, 1977 # Hubscher, 1979 # Insdorf, 1989 # Knopf, 1976 # Matsukage, 1975 # Wernet, 1986). En plus de l'activité ADN

polymérase, elle possède une activité exonucléase 3'→ 5' (Matsukage, 1990). Cette activité permet de corriger des erreurs d'incorporation de nucléotides lors de la synthèse d'ADN, ce qui explique leur relative fidélité au cours de la réplication (moins de 1 erreur tous les 260 000 nucléotides chez l'embryon de poulet et moins de 1 erreur tous les 500 000 nucléotides chez le porc) (Insdorf et Bogenhagen, 1989 # Kaguni et Olson, 1989 # Kunkel et Mosbaugh, 1989 # Kunkel et Soni, 1988 # Lim, 1999).

I.3.3. Quel système de réparation pour l'ADNmt ?

Les systèmes de réparation de l'ADN sont essentiels pour la maintenance de l'information génétique. La proximité de l'ADNmt et de la chaîne respiratoire qui est le lieu principal de production des espèces réactives oxygénées (ROS) (II.2.3.6. Espèces réactives de l'oxygène et ADN mitochondrial) oblige la mitochondrie à mettre en place des systèmes pour se protéger de ces dommages oxydatifs. En plus des systèmes de protection tels que les catalases ou le glutathion, la mitochondrie possède un système de réparation de l'ADN. Le seul système de réparation bien décrit au niveau de la mitochondrie est le système de réparation par excision de base (BER) (Akbari *et al.*, 2008). Le processus est identique au BER bien connu au niveau du noyau. En effet, il a été montré que certaines protéines impliquées dans ce système de réparation pouvaient avoir une double localisation à la fois nucléaire et mitochondriale (Tell *et al.*, 2005). Brièvement, ce processus permet l'excision de la base endommagée par une glycosylase pour former un site abasique. Puis l'enzyme APE1 excise le sucre au niveau du site abasique. À partir de l'extrémité 3'OH générée, l'ADN polymérase gamma réalise la polymérisation de l'ADN.

I.3.4. Des tailles très variables

La taille du génome mitochondrial est très variable selon les organismes (Gray *et al.*, 1999). Ainsi, elle est comprise entre 13 503 pb chez les animaux (*Taenia crassiceps*) et 2 424 242 pb chez les plantes (*Cucumis melo*) (Ward, 1981). Ces variations de taille sont essentiellement dues à la présence de séquences non codantes plus ou moins grandes entre les gènes, ainsi qu'à la présence de nombreux introns dans les génomes mitochondriaux considérés grands. À l'inverse, les génomes mitochondriaux plus condensés ne contiennent

	Gène		Fonction
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Gènes codants pour des protéines	ND1		NADH déshydrogénase, sous-unité 1 du complexe I
	ND2		NADH déshydrogénase, sous-unité 2 du complexe I
	ND3		NADH déshydrogénase, sous-unité 3 du complexe I
	ND4L		NADH déshydrogénase, sous-unité 4L du complexe I
	ND4		NADH déshydrogénase, sous-unité 4 du complexe I
	ND5		NADH déshydrogénase, sous-unité 5 du complexe I
	ND6		NADH déshydrogénase, sous-unité 6 du complexe I
	CYB	COB	Cytochrome b, sous-unité du complexe III
	CO1	COX1	Cyt c oxydase, sous-unité 1 du complexe IV
	CO2	COX2	Cyt c oxydase, sous-unité 2 du complexe IV
	CO3	COX3	Cyt c oxydase, sous-unité 3 du complexe IV
	ATP6	ATP6	Sous-unité 6 du domaine F ₀ de l'ATP synthase
	ATP8	ATP8	Sous-unité 8 du domaine F ₀ de l'ATP synthase
		ATP9	Sous-unité 9 du domaine F ₀ de l'ATP synthase
	VAR1	Protéine de la petite sous-unité du mitoribosome	
Gènes codants pour des ARNt	MT-TA	ARNt-ala	ARNt-alanine
	MT-TR	ARNt-arg1	ARNt-arginine
		ARNt-arg2	ARNt-arginine
	MT-TN	ARNt-asn	ARNt-asparagine
	MT-TD	ARNt-asp	ARNt-acide aspartique
	MT-TC	ARNt-cys	ARNt-cystéine
	MT-TE	ARNt-glu	ARNt-acide glutamique
	MT-TQ	ARNt-gln	ARNt-glutamine
	MT-TG	ARNt-gly	ARNt-glycine
	MT-TH	ARNt-his	ARNt-histidine
	MT-TI	ARNt-ile	ARNt-isoleucine
	MT-TL1	ARNt-leu	ARNt-leucine (UUR)
	MT-TL2		ARNt-leucine (CUN)
	MT-TK	ARNt-lys	ARNt-lysine
	MT-TM	ARNt-met	ARNt-méthionine
		ARNt-f met	ARNt-N-formylméthionine, Met initiateur mito.
	MT-TF	ARNt-phe	ARNt-phénylalanine
	MT-TP	ARNt-pro	ARNt-proline
	MT-TS1	ARNt-ser1	ARNt-sérine (UCN)
	MT-TS2	ARNt-ser2	ARNt-sérine (AGY)
	MT-TT	ARNt-thr1	ARNt-thréonine
	ARNt-thr2	ARNt-thréonine	
MT-TW	ARNt-trp	ARNt-tryptophane	
MT-TY	ARNt-tyr	ARNt-tyrosine	
MT-TV	ARNt-val	ARNt-valine	
Gènes pour ARNr	MT-RNR1		ARNr de la petite sous-unité du mitoribosome (12S)
		ARNr 15S	ARNr de la petite sous-unité du mitoribosome (15S)
	MT-RNR2		ARNr de la grande sous-unité du mitoribosome (16S)
		ARNr 21S	ARNr de la grande sous-unité du mitoribosome (21S)
Autre		ARN 9S	Intervient dans la maturation des ARNt et des introns

Tableau 1 : Ensemble des gènes codés par les ADNmt humains et de levure. Les données pour l'Homme proviennent de Mitomap (www.mitomap.org) et celles pour *S. cerevisiae* proviennent de Foury *et al.*, 1998.

que peu d'introns. Malgré une très grande différence dans la taille, les génomes mitochondriaux ont, pour la plupart, le même contenu en gènes (tableau 1). Pour optimiser la quantité d'information malgré une taille petite, les deux brins de l'ADN sont codants, et les introns sont très peu présents voire absents. Il y a aussi très peu de régions intergéniques.

1.3.5. Comment expliquer ces différences de tailles ?

Chez l'Homme, le génome mitochondrial est composé de 16 569 paires de bases (pb). Cet ADNmt humain est considéré comme le vestige de l'ADN d'une α -protéobactérie (1.5.3.1. Quelle est l'origine de l'endosymbiote ?). Mais comment est-on passé d'un génome de 1 111 523 pb chez *Rickettsia prowazekii*, la plus proche cousine de cette α -protéobactérie à l'origine de la mitochondrie, à un ADNmt de 16 569 pb chez l'Homme (Andersson *et al.*, 1998) ?

Plusieurs évènements simultanés et/ou successifs peuvent expliquer ce résultat de l'évolution. Tout d'abord, suite à l'endocytose de l' α -protéobactérie, de nombreuses fonctions de celle-ci, sont devenues inutiles. C'est, par exemple, le cas de la synthèse de la paroi, censée protéger la bactérie de chocs physiques et osmotiques. Ces fonctions étant désormais assurées par l'hôte, les gènes assurant cette synthèse ont été perdus. De même, il n'est pas nécessaire de maintenir les gènes redondants entre l'ADN nucléaire (ADNn) et l'ADNmt, une seule copie du gène étant suffisante. Cependant, avant de perdre la copie du gène mitochondrial, il est nécessaire de pouvoir amener la protéine codée par le génome nucléaire dans la mitochondrie. Cet évènement doit conférer un avantage à la cellule pour pouvoir être sélectionné. Un premier avantage à transférer le gène mitochondrial au noyau est la présence des ROS mitochondriaux qui agressent l'ADNmt et provoquent des mutations (Wallace, 2005). En plus de ces agressions, il faut y associer une réparation de l'ADNmt (Mandavilli *et al.*, 2002), certes un peu méconnue, mais surtout moins efficace que celle du noyau. Conserver la copie du gène nucléaire plutôt que la copie mitochondriale pourrait éviter des problèmes de mutations. Enfin, un certain nombre de gènes mitochondriaux, inexistant dans le génome nucléaire, ont été transférés au noyau. Là aussi, ces transferts doivent apporter des avantages à la cellule pour être sélectionnés. Pour les mêmes raisons que précédemment, la relocalisation d'un gène mitochondrial au niveau nucléaire pourrait être une protection de ce gène contre les ROS. Aujourd'hui, seuls quelques gènes irréductibles sont maintenus dans le génome mitochondrial. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer ce maintien : i) le

transfert est en cours (Palmer *et al.*, 1997) mais n'est pas observable à notre échelle de temps. Pour appuyer cet argument, il est à noter que, selon les organismes, certains gènes peuvent être soit nucléaire, soit mitochondrial, soit avoir la double appartenance. C'est très exactement le cas du gène ATP9. En effet, alors que ce gène est nucléaire chez l'Homme, il est mitochondrial chez la levure et à la fois nucléaire et mitochondrial chez *Neurospora crassa* (Bittner-Eddy *et al.*, 1994) ; ii) Les différences de codes génétiques entre noyau et mitochondrie pourraient aussi être un frein à ce transfert de gène. En effet, la protéine obtenue à partir du gène transféré pourrait être différente de la protéine originelle et ainsi éliminée avant même de pouvoir être adaptée. Cependant, il faut remarquer que ce frein n'est pas un obstacle insurmontable au transfert des gènes mitochondriaux puisque quelques gènes ont pu être transférés (Dequard-Chablat *et al.*, 2011) ; iii) l'import, donc le retour des protéines codées par ces gènes transférés au noyau, compliquerait et ralentirait le transfert de ces gènes. Il est assez remarquable de constater que les protéines impliquées dans les OXPHOS et codées par les gènes mitochondriaux sont toutes des protéines membranaires hydrophobes. L'expression de ces protéines depuis des gènes nucléaires pourrait poser des problèmes. Tout d'abord ces protéines hydrophobes pourraient s'agréger dans le cytosol qui est un compartiment plutôt aqueux, donc hydrophile. Elles pourraient aussi s'insérer dans la membrane externe au lieu de la membrane interne. Récemment, il a effectivement été montré que l'hydrophobicité de ces protéines pouvait être un problème. En effet, des gènes mitochondriaux de la levure *S. cerevisiae* ont pu être artificiellement relocalisés au noyau à la condition de diminuer leur hydrophobicité (Bietenhader *et al.*, 2012) ; iv) la proximité de ces gènes avec la chaîne respiratoire permet d'ajuster rapidement leur expression en fonction des besoins de la mitochondrie (Bietenhader *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données permet de mieux comprendre non seulement les différences de tailles du génome mitochondrial entre différents organismes, mais aussi la relative constance du contenu en gènes de cet ADN mitochondrial malgré les divergences évolutives. Par exemple, bien que leur contenu en gène soit assez homogène, le génome mitochondrial humain est de 16 kpb contre 78 kpb chez la levure *S. cerevisiae*. En effet, l'ADNmt humain code pour 13 protéines toutes impliquées dans les OXPHOS, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiaux (ARNr) alors que l'ADNmt de levure code pour 8 protéines dont 7 impliquées dans les OXPHOS, 24 ARNt et 3 ARNr. Parmi les gènes codant pour des protéines, 6 sont communs entre l'homme et la levure. La principale différence est due à l'absence d'un

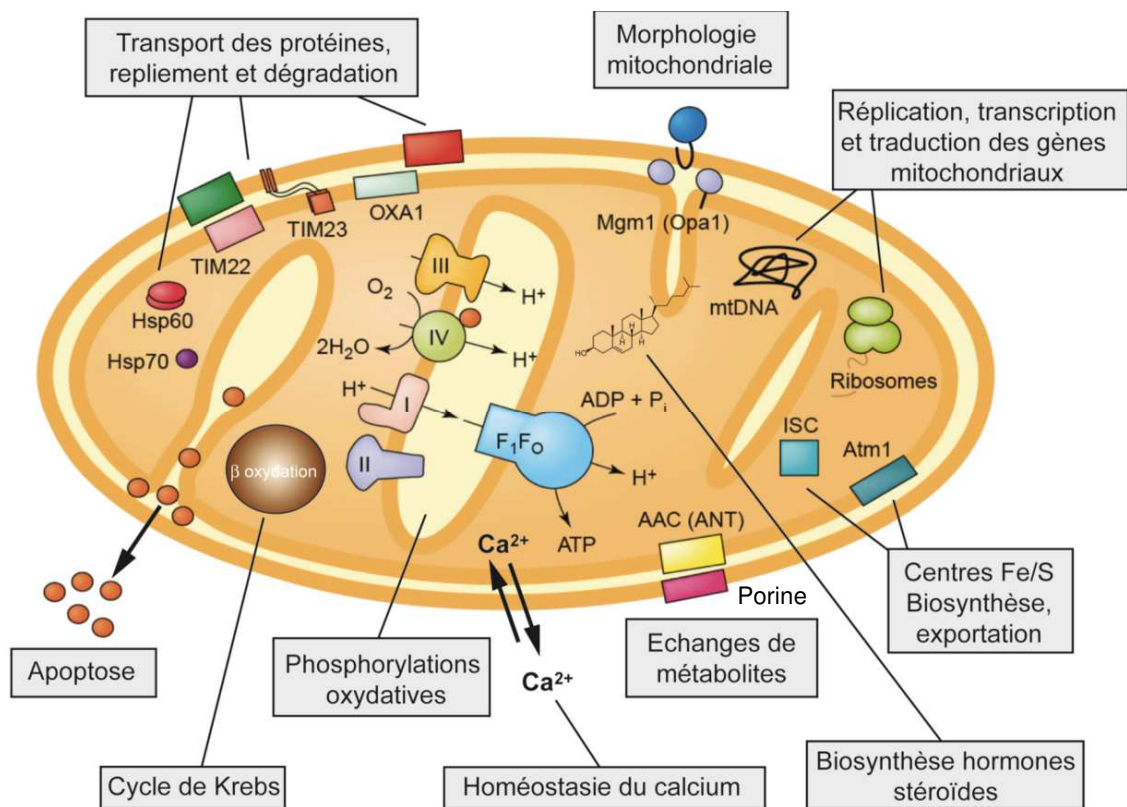


Figure 3 : Fonctions mitochondriales. Schéma d'une mitochondrie montrant quelques protéines impliquées dans les différentes fonctions mitochondriales. Les processus mitochondriaux comme le métabolisme des acides aminés, le métabolisme des lipides, et la synthèse de l'hème ne sont pas indiqués (d'après Reichert et Neupert, 2004).

véritable complexe I chez la levure (I.4.2.1. Les complexes impliqués dans la chaîne respiratoire). En effet, l'ADNmt humain possède 7 gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le complexe I et qui ne sont donc pas présents dans le génome mitochondrial de levure (tableau 1).

I.4. Les fonctions mitochondriales

I.4.1. Les mitochondries impliquées dans de nombreuses fonctions

Les mitochondries remplissent de nombreuses fonctions très diverses et utiles à la cellule (Fig. 3). Elles sont notamment impliquées dans de nombreuses voies métaboliques (Galluzzi *et al.*, 2012).

I.4.1.1. Le cycle de Krebs

- Cycle de Krebs

Décrit en 1937 par Hans Adolf Krebs (Krebs, 1937), le cycle de Krebs ou « cycle de l'acide citrique », est une voie métabolique amphibolique (à la fois catabolique et anabolique) exclusivement de la matrice mitochondriale comportant 9 réactions dont 3 irréversibles catalysées par 8 enzymes (Fig. 3). Au cours de ce cycle, 3 Nicotinamide Adénine DiNucléotide réduit (NADH), 1 Flavine Adénine Dinucléotide réduite (FADH₂) et 1 GTP sont produits à partir d'acetyl-CoA. Ce cycle est donc nécessaire à la réduction des coenzymes NADH et FADH₂, qui alimentent la chaîne respiratoire. Le lien entre ce cycle et la chaîne respiratoire ne se limite pas à la fourniture en substrat. En effet, la succinate déshydrogénase, qui catalyse la conversion du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs, est aussi une sous-unité de la chaîne respiratoire.

Le cycle de Krebs étant la voie de dégradation finale pour de nombreuses molécules telles que le glucose et les acides gras, de nombreuses voies métaboliques comme la glycolyse et la β -oxydation aboutissent à l'acétyl-CoA qui alimente le cycle. De plus, le cycle de Krebs peut participer aux étapes finales de la dégradation des acides aminés.

VOIES CATABOLIQUES LIEES AU CYCLE DE KREBS
VOIES ANABOLIQUES LIEES AU CYCLE DE KREBS

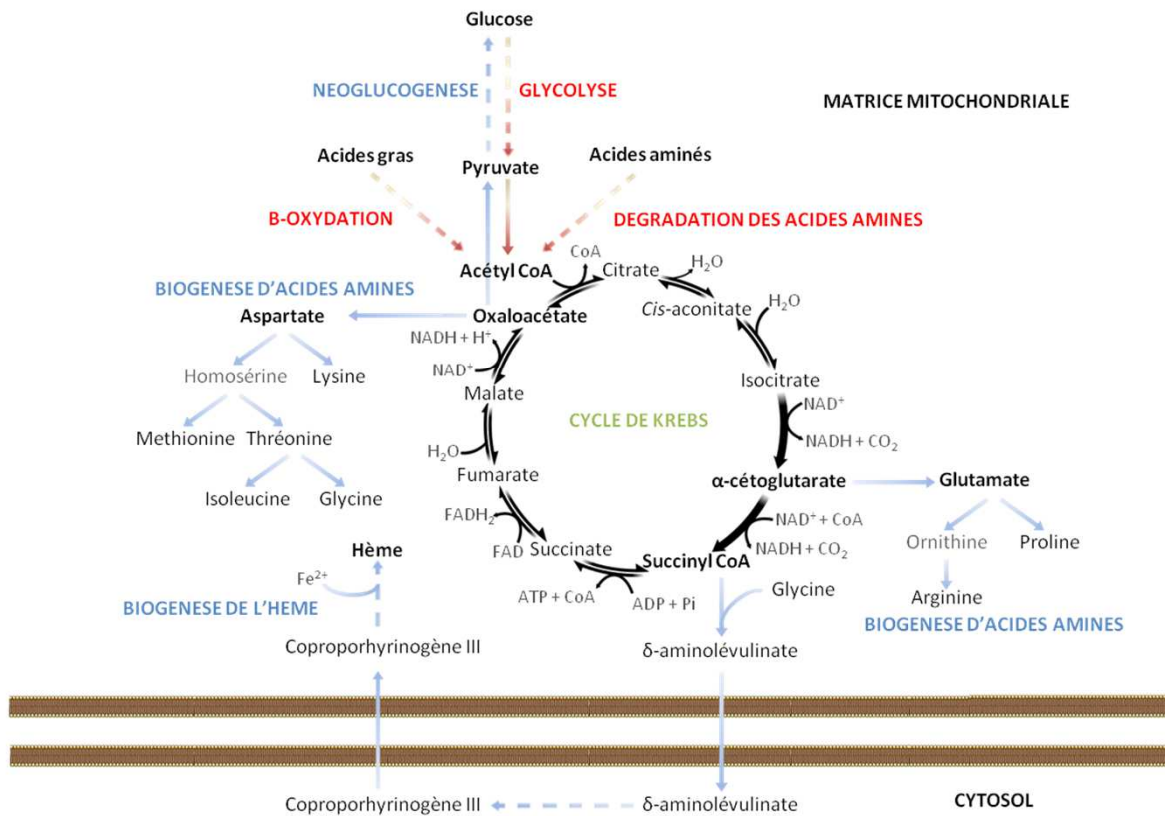


Figure 4 : Rôle amphibolique du cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est amphibolique, c'est-à-dire qu'il est aussi bien impliqué dans des voies de catabolisme (en rouge : glycolyse, β -oxydation des acides gras ou dégradation des acides aminés), que dans des voies anaboliques (en bleu : néoglucogénèse, biogénèse des hèmes ou des acides aminés).

- Les réactions anaboliques associées au cycle de Krebs

Le cycle de Krebs n'a pas seulement un rôle catabolique, il a aussi un rôle anabolique (Fig. 4). En effet, en fournissant le succinyl-CoA, les mitochondries sont impliquées dans la synthèse de l'hème. Le succinyl-CoA permet ensuite la formation de l'acide D-aminolevulinique. Celui-ci servira de substrat à d'autres enzymes cytosoliques puis mitochondriales qui catalyseront les réactions permettant la synthèse de l'hème, absolument indispensable aux complexes de la chaîne respiratoire.

Le cycle de Krebs permet aussi la fabrication de glutamate et d'aspartate à partir de l' α -cétoglutarate et de l'oxaloacétate, respectivement (Fig. 4). À partir du glutamate, la cellule est capable de synthétiser l'arginine et la proline ainsi que la glutamine. L'aspartate permet de fabriquer la lysine, la méthionine, la thréonine, l'isoleucine et l'asparagine.

I.4.1.2. La β -oxydation

Les mitochondries participent à la β -oxydation qui permet la dégradation des acides gras dits « court » (Fig. 5). Dans un premier temps, l'acide gras est activé sous forme d'acyl-CoA puis importé grâce à la carnithine acyl-carnithine. La dégradation de l'acide gras par β -oxydation permet la formation de NADH, de FADH₂ et d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA sera à son tour dégradé dans le cycle de Krebs pour produire un GTP, 3 NADH et un FADH₂ (Fig. 4). L'ensemble de ces équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) permet d'alimenter la chaîne respiratoire qui va créer un gradient de proton utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP (Fig. 6). La β -oxydation est donc un processus qui permet de produire de l'énergie dans presque toutes les cellules. En effet, les cellules du tissu adipeux brun constituent une exception. Dans les adipocytes, le potentiel de membrane et le gradient de protons, créés grâce à la chaîne respiratoire (CR) alimentée par les équivalents réducteurs issus du cycle de Krebs et/ou de la β -oxydation, peuvent être dissipés par la protéine UCP1 (Fig. 6). En fait, cette protéine découple la CR de l'ATP synthase et génère de la chaleur. La mitochondrie est donc impliquée dans la thermogénèse et l'adaptation au froid (Shabalina *et al.*, 2013).

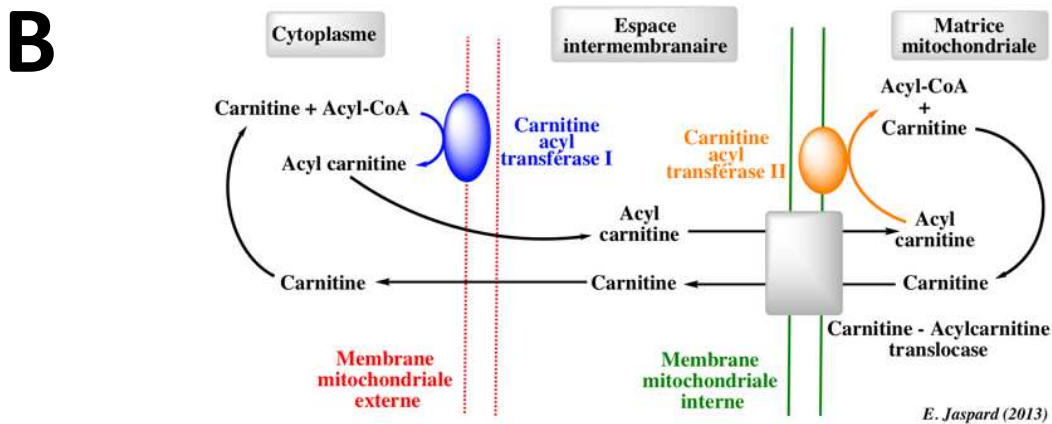
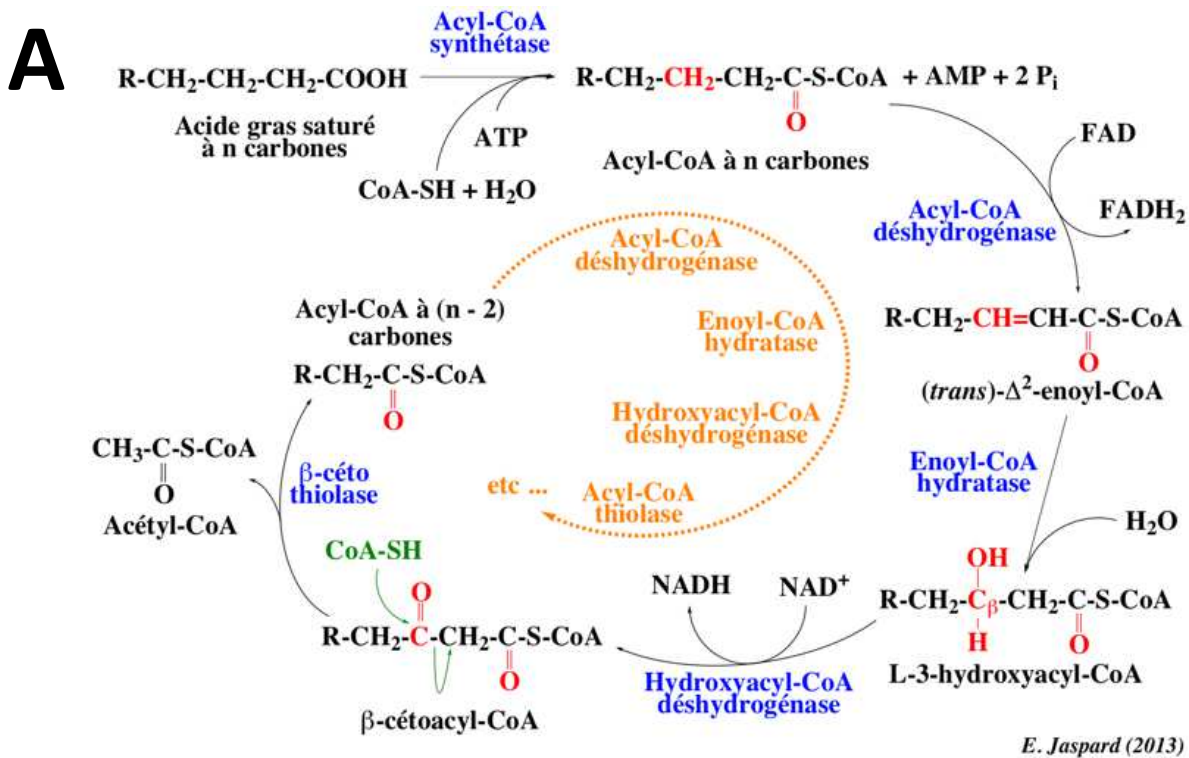


Figure 5: β -oxydation des acides gras. A) La première étape de la β -oxydation correspond à l'activation des acides gras sous forme d'acyl-CoA dans le cytosol. Les acyl-CoA ainsi générés passent directement à la matrice mitochondriale si leur chaîne carbonée est courte, ou sont importés par le système acyl carnitine-carnitine si les chaînes carbonées sont trop longues (B). Une fois dans la matrice, l'acyl-CoA subit les quatre étapes de la β -oxydation (en bleu) à proprement parler, aboutissant à la formation d'un acétyl-CoA et donc à la perte de deux carbones pour l'acide gras initial. L'hydrolyse des carbones continue avec l'hélice de Lynen (en orange), jusqu'à ce que cet acide gras n'ait plus que quatre carbones, hydrolysés en deux acétyl-CoA. Chaque cycle de la β -oxydation génère, en plus de l'acétyl-CoA qui servira de substrat au cycle de Krebs, des molécules de NADH et de FADH₂ qui serviront de substrat à la chaîne respiratoire. (<http://biochimej.univ-angers.fr>)

I.4.1.3. La néoglucogénèse

La mitochondrie des cellules hépatiques est aussi utilisée lors de la néoglucogénèse. En effet, afin de fabriquer du glucose, la néoglucogénèse à partir de précurseurs glucoformateurs tel que l'alanine requiert une étape mitochondriale indispensable. Cette étape est catalysée par la pyruvate carboxylase (PC), une protéine exclusivement mitochondriale (Fig. 7).

I.4.1.4. Autres fonctions

Les mitochondries sont aussi le siège de la synthèse des centres Fe/S (Lill & Mühlenhoff, 2005) qui sont essentiels au fonctionnement de nombreuses enzymes telles que l'aconitase impliquée dans le cycle de Krebs ou les complexes I et II de la chaîne respiratoire.

La mitochondrie hépatique est aussi impliquée dans la cétogénèse qui permet la fabrication des corps cétoniques (3 hydroxybutyrate, acétoacétate), une autre forme de transport d'énergie dans le corps, de la cellule hépatique vers les autres cellules.

Outre les voies métaboliques précédemment décrites, les mitochondries participent à d'autres fonctions importantes pour la cellule telles que le stockage du calcium (Galluzzi *et al.*, 2012) mais aussi l'apoptose, ou la synthèse des hormones stéroïdiennes tel que le cortisol (Fig. 3).

I.4.2. Les oxydations phosphorylantes

Il est considéré que, chaque jour, nous consommons et régénérons notre propre poids en ATP ! La majeure partie de cette énergie est produite par la mitochondrie. Ainsi, par exemple, 90% des 6 kg d'ATP nécessaires quotidiennement, juste pour le cœur, sont produits par cet organe. Le rôle majeur de la mitochondrie est donc la production d'énergie sous forme d'ATP.

Cet ATP est produit par les oxydations phosphorylantes (OXPHOS) selon le modèle décrit par Mitchell en 1961 (Mitchell, 1961). Ce processus fait intervenir les complexes des OXPHOS, à savoir, la chaîne respiratoire, l'ATP synthase et les deux transporteurs qui sont le transporteur ATP/ADP et le transporteur Pi/H⁺ (Fig. 8). Cette voie est approvisionnée en

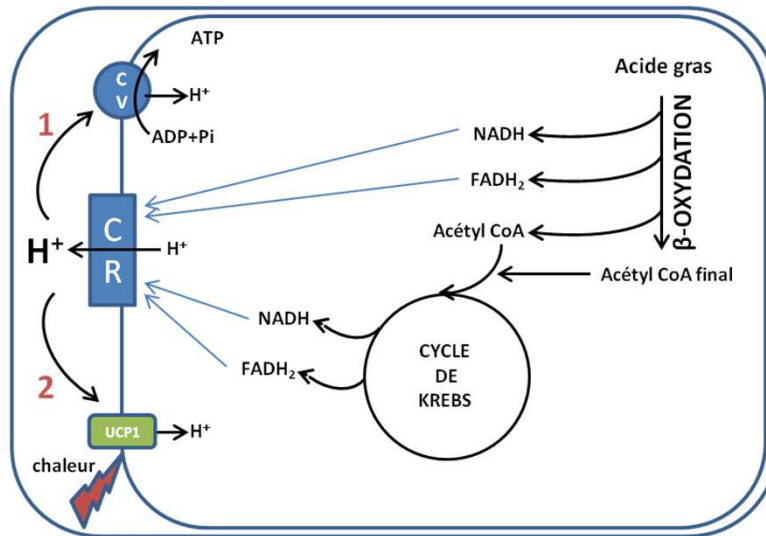


Figure 6 : Implication de la mitochondrie dans la synthèse d'ATP et la thermogénèse.

A chaque cycle de la β -oxydation, l'acide gras métabolisé perd deux carbones sous forme d'acétyl CoA, jusqu'à ce qu'il ne lui reste plus que deux carbones, soit un acétyl CoA « final ». Chaque cycle permet aussi la génération de NADH et de $FADH_2$. L'acétyl CoA va quant à lui intégrer le cycle de Krebs, générant ainsi du NADH et de la $FADH_2$. Ces équivalents réducteurs alimentent alors le chaîne respiratoire, qui permet de pomper des électrons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire, générant ainsi un gradient de protons. **1)** Dans la majorité des cellules, ce gradient est utilisé par l'ATP synthase, ou complexe V (CV sur le schéma), pour synthétiser de l'ATP. **2)** En cas de faible température, certaines cellules comme les adipocytes bruns ont la capacité de détourner ce gradient en découplant la membrane mitochondriale interne par la protéine UCP1. Les protons ne passent donc plus par l'ATP synthase mais par UCP1, ce qui génère de la chaleur.

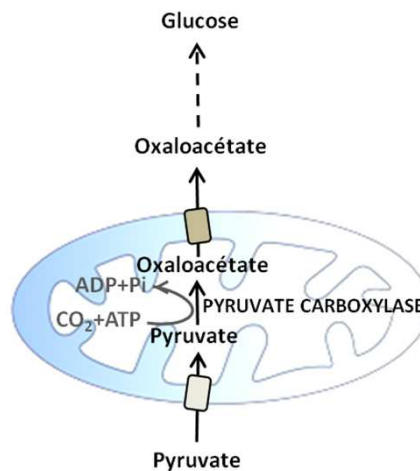


Figure 7 : Implication de la mitochondrie dans la néoglucogénèse. La néoglucogénèse nécessite la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate, qui est catalysée par la pyruvate carboxylase, une enzyme strictement mitochondriale.

amont par différentes voies métaboliques telles que la glycolyse, la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs, sous forme de NADH ou de FADH₂.

I.4.2.1. Les complexes impliqués dans la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes insérés dans la membrane mitochondriale interne et de deux « navettes » à électrons : l'ubiquinone et le cytochrome c (Guérin, 2004). Après leur synthèse et leur import, les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, codées soit par l'ADN nucléaire (ADNn) soit par l'ADNmt (tableau 1), doivent s'assembler entre elles et à leurs groupements prosthétiques. Ceci est un mécanisme très complexe qui fait appel à de nombreux facteurs d'assemblage décrits, pour la plupart, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Lasserre *et al.*, 2015).

Le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase) est le plus grand complexe des OXPHOS avec 44 sous-unités différentes. Son assemblage nécessite au moins 11 facteurs d'assemblages. Sa conformation dans l'espace ressemble à celle d'un « L » avec une partie hydrophile matricielle qui réceptionne les électrons provenant du NADH et les transfère à l'ubiquinone. Ce complexe I possède aussi un domaine transmembranaire qui permet la translocation des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire (EIM), participant ainsi à la mise en place d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (MMI).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* le complexe I n'existe pas. Il est en effet remplacé par des NADH déshydrogénases localisées au feuillet interne de la membrane mitochondriale interne (Ndi1p) ou au feuillet externe de cette même membrane (Nde1 et 2p) (Fig. 8).

Inversement, le complexe II (succinate-déshydrogénase) est le plus petit des complexes des OXPHOS, avec seulement 4 sous-unités toutes codées par le génome nucléaire, dont l'assemblage est facilité par au moins quatre facteurs d'assemblage. Ce complexe porte cinq groupes prosthétiques dont une flavine adénine dinucléotide, trois centres Fe/S et un hème b. Ce complexe n'étant pas transmembranaire, il ne participe pas directement à la création du gradient de proton.

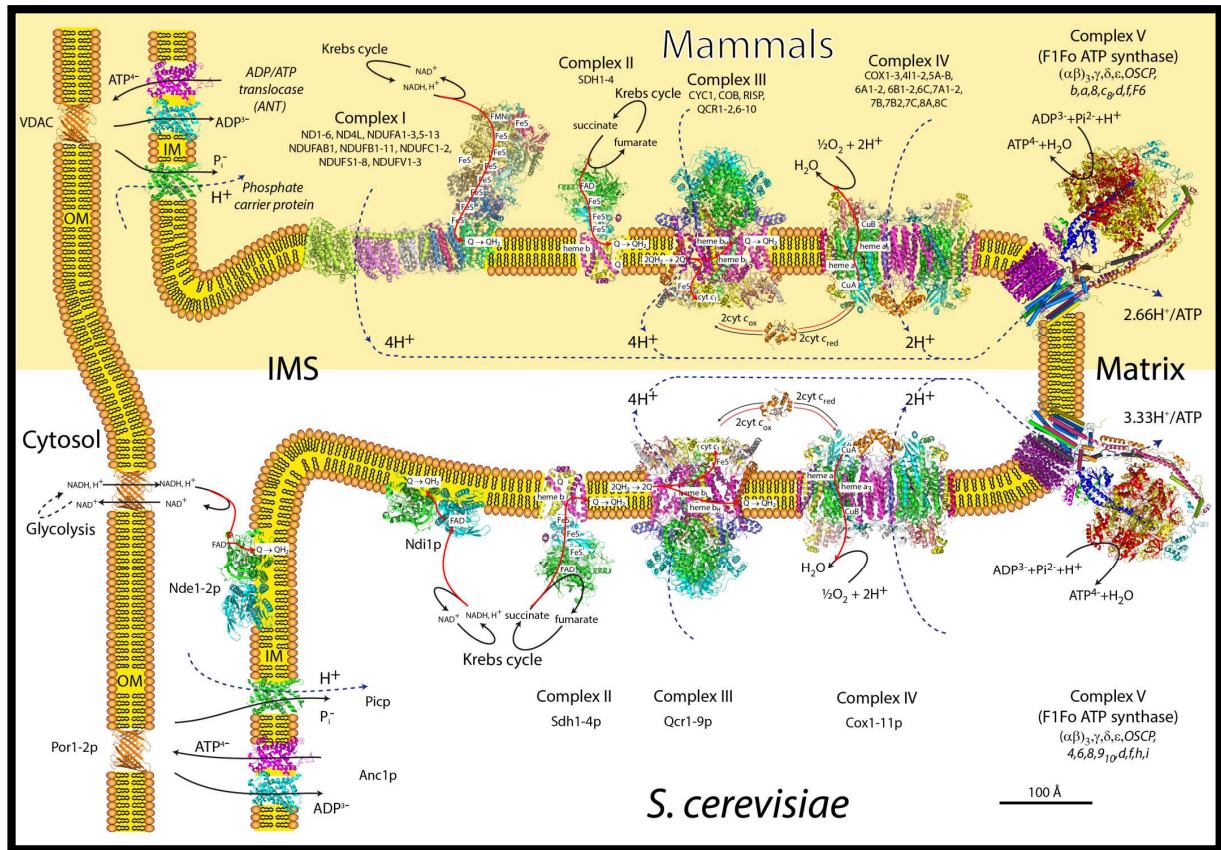


Figure 8: Comparaison des systèmes des oxydation phosphorylantes chez les mammifères et la levure. Cette figure représente les principales enzymes nécessaires aux oxydations phosphorylantes chez les mammifères ou la levure. Chez les mammifères, les complexes I à IV ainsi que l'ubiquinone (Q) et le cytochrome c (cyt c) transfèrent des électrons depuis le NADH ou le FADH₂ jusqu'à l'oxygène. Au niveau des complexes I, III et IV, ces transferts d'électrons sont couplés à la translocation de protons depuis la matrice jusqu'à l'espace inter-membranaire (IMS). Le gradient de protons ainsi généré de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (MI) est utilisé par le complexe V pour produire de l'ATP. Cette production d'ATP nécessite un phosphate inorganique (Pi), importé dans la matrice par le transporteur Pi/H⁺, et une molécule d'ADP, importée dans la matrice grâce à l'échangeur ADP/ATP (ANT). Le système des OXPHOS est très fortement conservé chez la levure, à l'exception du complexe I qui est remplacé par des NADH déshydrogénases (Ndi1p, Nde1p et Nde2p) qui ont la capacité de transférer les électrons mais pas celle de transloquer les protons. Les structures protéiques sont à l'échelle (barre d'échelle en bas à droite) et sont issues de la Protein Data Bank (PDB) (d'après Lasserre *et al.*, 2015).

Quant au complexe III (Complexe b-c1 ou ubiquinol-cytochrome c réductase), il est constitué de onze sous-unités, dont trois sont catalytiques : les cytochromes b et c1 ainsi que la protéine Fe/S Rieske.

Enfin, le complexe IV (cytochrome c oxydase) est constitué de 13 sous-unités (seulement 11 chez *S. cerevisiae*) parmi lesquelles trois sont codées par des gènes mitochondriaux (COX1, COX2 et COX3). Ce complexe possède 4 groupes Red/Ox : les hèmes a et a₃ ainsi que deux centres cuivre Cu_A et Cu_B. L'assemblage de ce complexe nécessite plus de 20 facteurs d'assemblage.

I.4.2.2. Le complexe V ou ATP synthase

Ce complexe d'environ 600 kDa est composé de deux domaines principaux, l'un (F₀) étant transmembranaire alors que l'autre (F₁) est périphérique (Devenish *et al.*, 2008 # Ackerman & Tzagoloff, 2005). Ces deux domaines sont reliés entre eux par une tige centrale provenant du domaine F₁ interagissant avec le pied périphérique provenant du domaine F₀ donnant non seulement de la cohésion au complexe V mais permettant aussi un couplage fonctionnel entre les différentes parties. Chez l'Homme, le domaine F₀ est constitué d'une sous-unité a/6 associée à un anneau de 8 sous-unités c/9 (10 sous-unités chez *S. cerevisiae*) permettant le passage des protons de l'EIM vers la matrice. Le secteur globulaire F₁ est constitué de sous-unités α et β organisées en hétérohexamère (αβ)₃ et de trois autres protéines γ, δ et ε formant la tige centrale. Le secteur F₀ et la tige centrale de la partie F₁ forment un rotor qui utilise la force proto-motrice pour générer son mouvement de rotation. La rotation de la tige centrale induit un changement conformationnel de la tête catalytique (αβ)₃ fournissant l'énergie nécessaire à la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi).

I.4.2.3. Transporteurs ADP/ATP et Pi/H⁺

Pour que la synthèse de l'ATP soit effective, il est nécessaire de faire rentrer de l'ADP et du Pi dans la mitochondrie. L'import de l'ADP depuis l'EIM est réalisé par le transporteur ADP/ATP translocase (*ANT1*) constitué d'un homodimère de la protéine ANT1 qui forme un canal dans la MMI. Ce transporteur est un antiport puisqu'en échange de l'entrée de l'ADP, il fait sortir de l'ATP, permettant ainsi de coupler la synthèse de l'ATP à sa distribution extra-mitochondriale. Concernant l'import du Pi, c'est le transporteur Pi/H⁺ qui réalise un co-transport. En effet, en utilisant l'énergie du gradient de proton, ce transporteur fait rentrer le Pi.

I.4.2.4. Le fonctionnement des OXPHOS

Le complexe I (CI) assure le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone (Fig. 8). L'énergie libérée par ce transfert d'électrons permet le pompage de quatre protons vers l'espace inter-membranaire (EIM). *Saccharomyces cerevisiae* ne comportant pas de complexe I à proprement parler, des NADH deshydrogénases assurent cette fonction mais sans transférer de protons. Le complexe II (CII) permet, quant à lui, le transfert d'électrons du FADH₂ à l'ubiquinone sans transfert de protons au travers de la membrane. L'ubiquinone réduite (ou ubiquinol ou encore coenzyme Q réduit) liposoluble, ayant une grande mobilité dans les membranes, va transporter les électrons des CI et CII jusqu'au complexe III (CIII). L'oxydation de l'ubiquinol au niveau du CIII est corrélée au transfert d'électrons sur le cytochrome c ainsi qu'à la sortie de quatre protons vers l'EIM. Le cytochrome c, tout comme l'ubiquinol, est mobile et sert donc de navette pour les électrons entre les complexes III et IV. Le complexe IV (CIV) est le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Il oxyde quatre cytochromes c pour réduire une molécule d'O₂, l'accepteur final des électrons. L'O₂ réduit va interagir avec des protons pour former une molécule d'H₂O. Le complexe IV permet le pompage de deux protons vers l'EIM. Les protons déplacés vers l'EIM par la chaîne respiratoire (CI, CIII et CIV) génèrent un gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. Ce gradient de protons a une double composante. Il forme à la fois un gradient électrique ($\Delta\Psi$) et un gradient de pH qui permettent de créer une différence de potentiel de part et d'autre de la MMI. Ce potentiel de membrane est essentiel

non seulement pour la synthèse d'ATP, mais aussi pour d'autres fonctions comme l'import de nombreuses protéines depuis l'EIM vers la matrice mitochondriale. Le gradient de protons est « consommé » par l'ATP synthase pour générer de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) entrés respectivement grâce au transporteur ADP/ATP translocase et au transporteur Pi/H⁺ (Fig. 8).

Les complexes de la chaîne respiratoire sont organisés en larges structures, appelées « respirasomes ». Ces respirasomes impliquent les CI, CIII et CIV chez les mammifères, et les CIII et CIV chez la levure. Le premier avantage de ces multi-complexes est de stabiliser les complexes en les protégeant de la protéolyse. Un autre avantage est d'améliorer le flux d'électrons en les canalisant, et ainsi éviter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Murphy, 2009).

Comme nous venons de le voir, la mitochondrie est un organite particulier essentiel à la cellule. Du fait son importance, elle a été, et est toujours, très étudiée. Les multiples caractéristiques des mitochondries décrites précédemment sont le fruit d'une lente évolution. Afin de mieux cerner la mitochondrie, la compréhension de ses origines peut être déterminante.

I.5. La théorie endosymbiotique

Dès leur découverte, les mitochondries ont suscité de nombreuses interrogations : Comment se fait-il que ces organites aient une double membrane ? Comment se fait-il qu'ils aient leur propre génome ? Pourquoi ne se créent-ils pas *de novo* mais sont issus d'organites pré-existants qui se divisent sans suivre le cycle cellulaire ?...

I.5.1. Le concept de l'endosymbiose

Le concept de l'endosymbiose est très ancien puisqu'il est apparu dès le XIX^{ème} siècle (Archibald, 2015). En 1867, le suisse Simon Schwendener a décrit le premier cas de symbiose : les lichens, qui sont une association d'algues unicellulaires et de champignons. Puis Kamienski et Franck ont décrit les mycorhizes, symbioses entre des bactéries et les racines de plantes. En 1879, Anton de Bary a défini la symbiose (du grec *σύν* (*sýn*), *ensemble* et *βίος* (*bíos*) *vivre*) comme « la vie commune d'organismes différents ». La théorie de la symbiose a connu une grande avancée en 1905 avec les travaux de Constantin Mereschkowsky (Mereschkowsky,

1905). En effet, ce dernier a constaté une forte similitude entre les plastides (organites cellulaires présents chez les végétaux et pouvant contenir des pigments, notamment la chlorophylle) et des organismes autonomes tels que les cyanobactéries. Il a alors suggéré que ces plastides avaient eux aussi une origine autonome. Il pensait que ces plastides avaient pour origine une cyanobactérie endocytée par une cellule eucaryote primitive, contenant déjà un noyau issu d'une endosymbiose antérieure. Mais curieusement, Mereschkowsky n'a pas étendu son hypothèse à la mitochondrie...

1.5.2. ...et la mitochondrie ?

C'est en 1918, que le français Paul Portier étend cette hypothèse aux mitochondries :

« Tous les êtres vivants, tous les animaux (...), toutes les plantes (...) sont constitués par l'association, l'emboîtement de deux êtres différents. Chaque cellule vivante renferme (...) des formations que les cytologistes désignent sous le nom de « mitochondries ». Ces organites ne seraient pour moi autre chose que des bactéries symbiotiques, ce que je nomme des symbiotes. »

Curieusement, cette découverte n'a pas eu un grand retentissement et le concept de l'endosymbiose est tombé en désuétude.

Il y a maintenant 50 ans, le papier « *On the Origin of Mitosing Cells* » de Lynn Margulis-Sagan (Sagan, 1967) a marqué la renaissance de ce concept. Dans ce papier, elle suggère que la mitochondrie serait issue d'une endosymbiose entre une archéobactérie et une eubactérie. Ce travail s'appuie notamment sur la découverte, dans les années 1960, d'un génome mitochondrial (Yotsuyanagi & Guerrier, 1965) possédant son propre système de réplication. Bien que cette hypothèse ne soit pas révolutionnaire en 1967, car énoncée dès 1918, la théorie de l'endosymbiose n'a pas fait l'unanimité. En effet, Lynn Margulis a dû soumettre son article à une douzaine de journaux avant qu'il ne soit accepté ! (Gray, 2017).

Depuis, cette théorie est largement admise par l'ensemble de la communauté scientifique, mais les modalités de l'endosymbiose sont encore très débattues.

I.5.3. Les nombreuses théories de l'endosymbiose

Effectivement, de nombreuses théories ont été développées concernant les modalités exactes de l'endosymbiose (Martin *et al.*, 2015) présentant chacune des forces et des faiblesses. Parmi les nombreuses variantes, aucune de ces théories ne répond parfaitement à toutes les questions sous-jacentes à l'endosymbiose.

I.5.3.1. Quelle est l'origine de l'endosymbiote ?

L'identité du symbiote est maintenant assez généralement acceptée. En effet, des études de phylogénie basées sur les ARN ribosomiaux mitochondriaux de plantes, qui évoluent assez lentement, ont, en effet, permis d'identifier la bactérie à l'origine de la mitochondrie. Cette bactérie est une α -protéobactérie. Parmi ces α -protéobactéries, Andersson *et al.* ont montré que la bactérie *Rickettsia prowazekii* présente de fortes similitudes avec la mitochondrie et partagerait donc un ancêtre commun avec cet organite (Andersson *et al.*, 1998). Leurs résultats indiquent que de nombreuses protéines impliquées dans la production d'énergie (protéines du cycle de Krebs...), ou dans l'expression des gènes mitochondriaux, possèdent des protéines homologues chez *Rickettsia prowazekii*. Cette bactérie, qui a évolué vers un mode de vie « intracellulaire obligatoire », a perdu certains gènes devenus non essentiels, au cours du temps. Les mitochondries, qui, à l'image de cette bactérie, vivent aussi exclusivement à l'intérieur des cellules eucaryotes ont, elles aussi, perdu de nombreux gènes. Ainsi, par exemple, beaucoup de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés ont été perdus à la fois dans le génome mitochondrial et dans le génome de *Rickettsia prowazekii*. Pour ces raisons, *Rickettsia prowazekii* semble être très proche de l'endosymbiote originel.

I.5.3.2. Quelle est l'origine de la cellule hôte ?

D'après les données phylogénétiques, il est aujourd'hui pensé qu'il s'agit probablement d'une archéobactérie apparentée à la branche des *Lokiarchaeota*. Très récemment, Zaremba-Niedzwiedzka *et al.* ont identifié de nouvelles lignées apparentées aux *Lokiarchées* et aux *Thorarchées* : les *Odinarchées* et *Heimdallarchées*. Ils ont regroupés ces

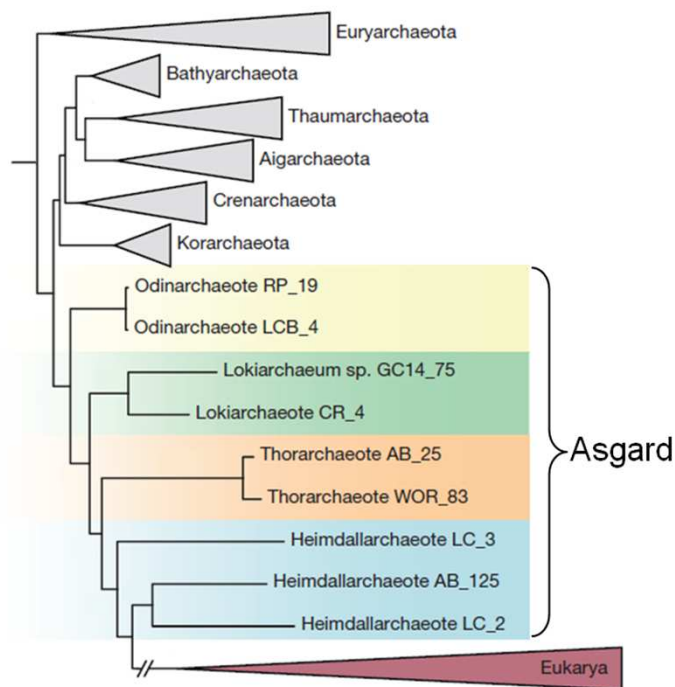


Figure 9 : Arbre phylogénomique des archées. Cet arbre met en évidence la proximité évolutive entre les archées de type Asgard et les eucaryotes (d'après Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017)

quatre embranchements dans le super-embranchement des « Asgard ». Des analyses phylogénétiques, basées notamment sur la comparaison des séquences des ARN ribosomiaux et des protéines ribosomiques communes aux procaryotes et aux eucaryotes, montrent que cette clade est la plus proche de l'embranchement des eucaryotes parmi toutes les autres archées connues (Fig. 9). Par ailleurs, plusieurs protéines présentes dans les cellules du super-embranchement des « Asgard » ont longtemps été considérées comme des protéines spécifiques des cellules eucaryotes. C'est, par exemple, le cas des protéines homologues de l'actine et de la tubuline, des petites protéines GTPases, des protéines de la voie ESCRT (impliquée dans le remodelage des membranes) ou encore des protéines impliquées dans les processus d'ubiquitinylation...

I.5.3.3. Quand a eu lieu l'endosymbiose ?

Il existe, comme nous l'avons dit précédemment, de nombreuses théories sur les modalités de l'endosymbiose. Elles peuvent être globalement réparties en deux grandes hypothèses. La première place le développement eucaryotique, c'est-à-dire l'acquisition du noyau, avant l'acquisition de la mitochondrie ; la seconde, donnant un rôle prépondérant à la mitochondrie dans le développement des eucaryotes, place l'acquisition de la mitochondrie avant celle du noyau (Embley & Martin, 2006 # Gray, 2012).

La première hypothèse correspond au scénario de l'« archézoa ». Dans ce scénario, proche de la théorie de Margulis, l'hôte de l'endosymbiote serait une hypothétique cellule eucaryote amitochondriée, appelée « archezoa ». Cette hypothèse a été proposée en 1987 par Cavalier-Smith, suite à l'élaboration d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ARN de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial (Cavalier-Smith, 1987). Cet arbre phylogénétique mettait en évidence trois branches de protozoaires amitochondriés : Giardia, Trichomonas et Vairimorpha. L'évènement d'endosymbiose aurait donc eu lieu après l'acquisition du noyau. Effectivement, ces organismes ne présentent pas de mitochondries au sens propre du terme. Cependant, des études postérieures ont montré que ces organismes contiennent des organites dérivés des mitochondries : les hydrogénosomes et les mitosomes. La présence de ces organites remet donc fortement en question ce scénario.

Le second scénario, dans lequel une archée a englobé une α -protéobactérie avant le développement du noyau et la compartimentalisation de la cellule, est donc globalement

privilegié. Cependant, un argument semble en défaveur de cette théorie. En effet, pour réaliser cette endosymbiose, il est nécessaire que la cellule hôte ait la fonction d'endocytose, une fonction caractéristique des cellules eucaryotes. Toutefois, le poids de cet argument est aujourd'hui diminué car des bactéries contenant des endosymbiotes ont été mises en évidence (von Dohlen *et al.*, 2001). La façon dont la bactérie a pu intégrer cet endosymbiote est encore mystérieuse mais montre que la phagocytose ne serait aussi indispensable à l'endosymbiose. Quand bien même ce processus serait nécessaire, il semblerait que la cellule hôte originelle aurait pu posséder un système phagocytaire rudimentaire. En effet, les récents travaux de Zaremba-Niedzwiedzka (Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017) montrent que les archées du groupe « Asgard », qui seraient les plus proches « parentes » de la cellule hôte, présentent un certain nombre de protéines orthologues à des protéines eucaryotes. Parmi ces protéines communes, on retrouve l'actine, des petites protéines GTPases, des protéines ESCRT,... ce qui suggère que la cellule hôte pouvait posséder un système phagocytaire rudimentaire qui aurait donc pu faciliter l'endosymbiose.

Pour Lane et Martin (Lane, 2017), l'acquisition de la mitochondrie est une condition *sine qua non* pour la complexification de la cellule hôte en une cellule eucaryote. Selon eux, lorsque l'endosymbiote a commencé à perdre ses gènes non essentiels et à en relocaliser d'autres au noyau, l'énergie économisée par la diminution de protéines à synthétiser a été mise à profit pour l'augmentation de la taille des cellules, mais aussi pour la complexification de leur morphologie et l'acquisition de nouvelles familles de gènes. Selon cette hypothèse, le développement de la cellule eucaryotique n'a donc pu avoir lieu qu'après l'endosymbiose mitochondriale.

1.5.3.4. Qu'est-ce qui a favorisé l'endosymbiose et en a assuré la pérennité ?

Il est estimé que l'apparition des eucaryotes a eu lieu il y a environ 1,5 milliard d'années, au cours du Précambrien. A cette même période, suite à l'apparition de bactéries aquatiques photosynthétiques, les cyanobactéries, l'atmosphère terrestre s'est fortement enrichie en oxygène alors qu'elle était, jusque-là, essentiellement composée d'azote. Selon Margulis, une cellule non adaptée à cette nouvelle atmosphère a dû, pour survivre à l'effet toxique de l'O₂, ingérer une bactérie aérobie (Sagan, 1967). Cette bactérie aérobie intégrée aurait détoxifié l'O₂ pour la cellule hôte. Dans cette théorie, la « force motrice » de

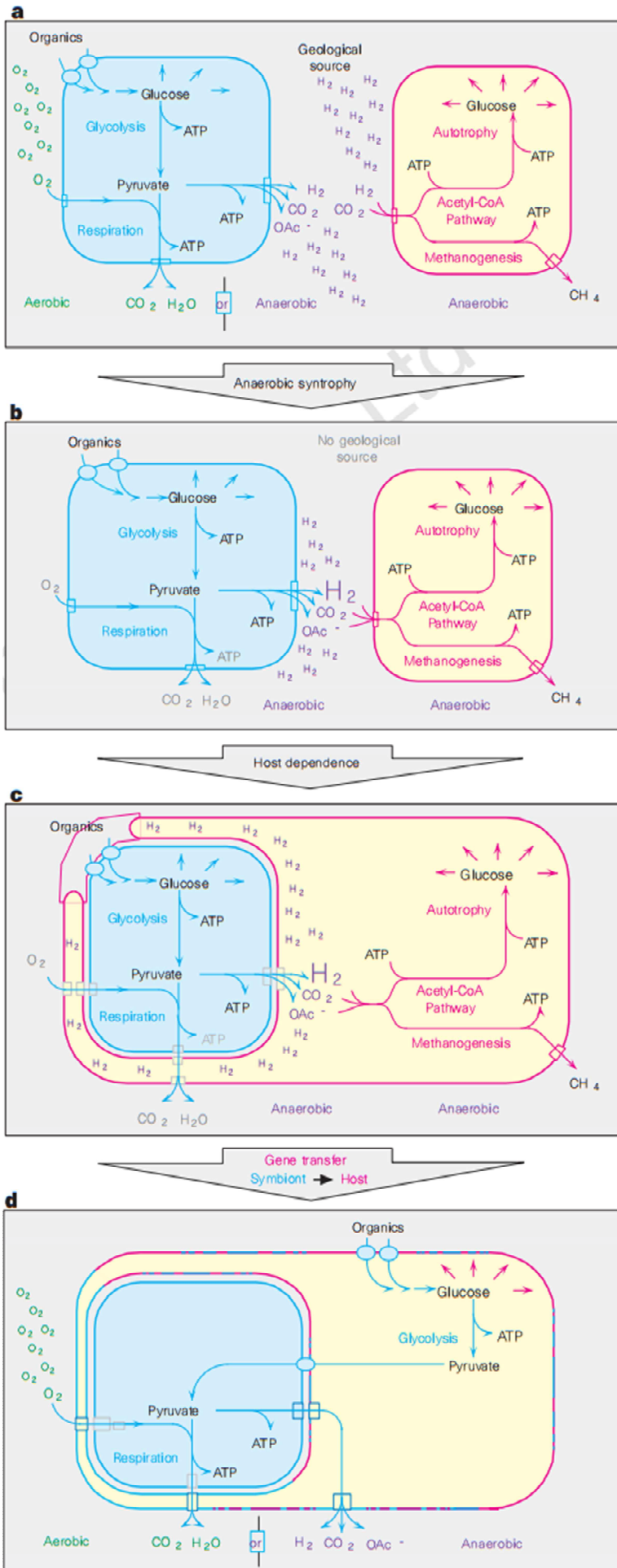


Figure 10 : Hypothèse de l'hydrogène de Martin et Müller .

rose : structures de l'hôte

bleu : structures de l'endosymbionte

vert : substrats et produits du

métabolisme aérobic

violet : substrats et produits du

métabolisme anaérobic

a) Des bactéries anaérobies facultatives génèrent, par dégradation du pyruvate, de l' H_2 . En parallèle, des archées utilisent de l' H_2 présent dans le milieu pour générer du méthanol. Les archées et les bactéries sont donc viables indépendamment.

b) Une diminution des ressources en H_2 du milieu rend l'archée dépendante de l' H_2 produit par les bactéries.

c) L'archée va donc progressivement entourer une bactérie pour capter le maximum d' H_2 .

d) Au cours du temps, la symbiose va se stabiliser, l'endosymbionte va modifier son génome en transférant notamment certains de ses gènes au génome de l'hôte. Des transferts de lipides entre les membranes de l'hôte et de l'endosymbionte vont aussi avoir lieu. L'augmentation de la concentration en oxygène dans le milieu va modifier le métabolisme de l'endosymbionte vers un métabolisme respiratoire, donnant naissance à la mitochondrie que l'on connaît actuellement.

(d'après Martin et Müller, 1998)

l'endosymbiose était donc la détoxification de l'O₂. Mais de nouvelles données suggèrent que, malgré la forte augmentation de la concentration en O₂ de l'atmosphère, les océans, dans lesquels se sont développés les premiers eucaryotes, ne se sont oxygénés que très lentement. La teneur en O₂ ne serait donc pas une contrainte suffisamment forte pour nécessiter sa détoxification. L'O₂ ne semble donc pas être l'élément clé de l'endosymbiose (Embley & Martin, 2006).

Martin et Müller ont proposé, en 1998, une hypothèse dans laquelle cette clé ne serait pas l'O₂ mais le dihydrogène (H₂) (Martin & Müller, 1998). Dans ce scénario, une bactérie aérobique facultative, dont le métabolisme génère des déchets sous forme de CO₂ et de H₂ à partir du pyruvate (le symbiote), serait entrée en symbiose avec une archée (l'hôte), produisant du méthane à partir de CO₂ et de H₂ (Fig. 10). En considérant un milieu dans lequel la concentration en H₂ se serait appauvrie, alors le métabolisme de l'hôte devient strictement dépendant de l'H₂ produit par le symbiote en devenir, conduisant à une symbiose pérenne. Au cours de l'évolution, le métabolisme de l'O₂, qui n'était au départ que facultatif, a pris peu à peu une importance majeure chez certains eucaryotes, conduisant à la mitochondrie actuelle. Aujourd'hui, l'hôte originel fournit le substrat à l'endosymbiote, et en contrepartie, l'endosymbiote fournit l'énergie sous forme d'ATP à son hôte : l'endosymbiose est donc réciproquement avantageuse pour les deux partenaires. Chez d'autres eucaryotes, la respiration ne s'est pas développée et l'endosymbiote a évolué en hydrogénosome, générant toujours de l'H₂. Cette hypothèse est donc plausible mais n'est toujours pas confirmée.

CHAPITRE II : Les maladies rares

Sommaire

II.1. Les maladies rares	24
II.1.1. Epidémiologie	24
II.1.2. Des plans nationaux	25
II.2. Les maladies mitochondriales	26
II.2.1. Les signes cliniques	26
II.2.2. Gènes responsables de maladies mitochondriales	28
II.2.3. Maladies mitochondriales primaires	29
II.2.3.1. Généralités	29
II.2.3.2. Transmission des maladies mitochondriales primaires	29
- Héritage maternel	
- Mutations <i>de novo</i>	
II.2.3.3. Notions d'homoplasmie et d'hétéroplasmie	30
II.2.3.4. Mutations de gènes mitochondriaux codant pour des protéines	31
II.2.3.5. Mutations de gènes mt codant pour des ARNt ou ARNr	32
- Les gènes codant les ARNt-mt	
- Les gènes codant les ARNr-mt	
II.2.3.6. Espèces réactives de l'oxygène et ADN mitochondrial	34
- Formation des ROS	
- Systèmes de détoxification des ROS	
- Impacts des ROS	
II.2.3.7. Facteurs aggravants des maladies mitochondriales primaires	37
II.2.4. Maladies mitochondriales secondaires	37
II.2.4.1. Mutations dans des gènes nucléaires	37
- Gènes nucléaires impliqués dans les OXPHOS	
- Gènes impliqués dans les autres fonctions mitochondriales	
II.2.4.2. Maladies avec implication indirecte de la mitochondrie	40
II.2.4.3. Influence de facteurs environnementaux	40
- Facteurs médicamenteux	
- Autres facteurs	
II.3. Modèles d'étude des maladies mitochondriales	42
II.3.1. Les cellules humaines	43
II.3.2. La souris	44
II.3.3. La drosophile	46
II.3.4. Le nématode	47
II.3.5. La levure	49
II.3.6. Conclusion	52
II.4. Traitement des maladies mitochondriales	53
II.4.1. Peu de traitements disponibles	53
II.4.2. Thérapie génique	53
II.4.3. Prise en charge des symptômes des patients	55
II.4.4. Fécondation <i>in vitro</i> à « trois parents »	55

La mitochondrie est un organe impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques, la plupart essentielles pour le bon fonctionnement de la cellule, comme nous l'avons vu précédemment. Pour cette raison, l'altération de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de la mitochondrie risque fortement d'aboutir à des problèmes au niveau cellulaire, se traduisant par le développement de maladies mitochondriales. Ces maladies mitochondriales font parties d'une plus grande famille de maladies : les maladies rares.

Dans ce chapitre, après avoir brièvement abordé les maladies rares, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux maladies impliquant directement ou indirectement les mitochondries.

II.1. Les maladies rares

L'élaboration du Règlement de l'Union Européenne concernant les médicaments orphelins (CE no 141/2000, 1999), a nécessité la mise en place d'une définition claire des maladies rares. Il a donc été défini qu'une maladie rare était une « affection entraînant une menace pour la vie ou une invalidité chronique ne touchant pas plus de cinq personnes sur 10 000 dans l'Union européenne (UE) », soit une maladie avec une prévalence inférieure à un sur 2 000. Ainsi, en France, cela correspondrait à une maladie touchant moins de 30 000 personnes.

II.1.1. Épidémiologie

À ce jour, environ 8 000 maladies rares ont été décrites, avec plus de 3 millions de personnes dépistées en France et 30 millions en Europe (<http://www.maladiesraresinfo.org> # <http://www.hopital.fr>). En moyenne, cinq nouvelles maladies rares sont découvertes tous les mois ! La répartition de ces maladies est très inégale. Ainsi, en France, une cinquantaine de maladies rares touchent des milliers de personnes, 500 autres ne touchent que quelques centaines de personnes et, enfin, des milliers de maladies n'atteignent que quelques dizaines de personnes. Le grand nombre de maladies rares différentes, leur grande diversité dans leur expression phénotypique et le faible nombre de patients pour chaque maladie rendent le

diagnostic de ces maladies extrêmement compliqué pour les médecins. Ce diagnostic est d'autant plus difficile à poser que, dans certains cas, les causes de ces maladies sont encore inconnues, surtout, si elles sont multifactorielles ou polygéniques ! Par conséquent, très peu de traitements curatifs ont été mis au point contre ces maladies. En effet, la plupart du temps, seuls les symptômes sont traités. Ces maladies ne bénéficiant pas de traitement sont dites « orphelines », et concernent la plupart des maladies rares.

Même si parmi les quelques 8 000 maladies décrites, la grande majorité a une cause génétique (environ 80%), il existe quelques cas de maladies rares non génétiques (<http://www.maladiesraresinfo.org>). Parmi ces maladies rares non génétiques, on retrouve notamment :

- Des maladies infectieuses telles que la légionellose (atteinte pulmonaire due à la bactérie *Legionella pneumophila*), ou l'aspergillose (infection pulmonaire par les champignons de la famille des *Aspergillus*) ...
- Des maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (maladie inflammatoire chronique pouvant atteindre plusieurs organes), le syndrome de Gougerot-Sjögren (maladie caractérisée par une atteinte des glandes lacrymales et salivaires), ou encore les sclérodermies (maladies hétérogènes qui se traduisent notamment par un épaissement de la peau) ...
- Des maladies cancéreuses telles que l'esthésioneuroblastome (tumeur du nerf olfactif) ou les sarcomes (tumeurs rares) ...

II.1.2. Des plans nationaux

Du fait de leur rareté, la recherche sur ces maladies a longtemps été négligée. Mais depuis quelques décennies, grâce au travail d'associations de malades telles que l'Association Française contre les Myopathies (AFM) et à l'implication de l'Etat, de nombreux progrès ont été faits. Ainsi, deux « Plans Nationaux Maladies Rares » (PNMR) ont déjà été mis en place (2005-2008 puis 2011-2016) et un troisième est en cours de préparation (<http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/article/les->

maladies-rares). Ces plans ont pour but d'« assurer l'équité pour l'accès au diagnostic, au traitement et à la prise en charge ». Concrètement, ces plans permettent une meilleure coordination de la communication et de la recherche sur les maladies rares (mise en place de Centres de Référence, création du portail Orphanet, financement de projets de recherche, avantages fiscaux accordés à certaines industries pharmaceutiques...) à l'échelle nationale et européenne.

II.2. Les maladies mitochondriales

Parmi les maladies rares, les maladies mitochondriales occupent une place importante. En effet, même si les maladies mitochondriales sont rares indépendamment, elles présentent, cumulées, une incidence de un sur 4 000 naissances, soit 200 nouveaux cas par an en France (d'après le centre de référence sur les maladies mitochondriales de l'enfant à l'adulte CARAMMEL). Parmi les maladies mitochondriales, la grande majorité affecte la chaîne respiratoire, soit 1 cas sur 5 000 naissances vivantes (Skladal *et al.*, 2003).

Tout comme pour les autres maladies rares, la recherche sur les maladies mitochondriales s'organise peu à peu, notamment en France avec le développement du réseau « MeetOchondrie » (<http://meetochondrie.fr>), qui regroupe depuis 2006 différents acteurs de la recherche fondamentale, clinique ou appliquée dans le domaine de la mitochondrie. Ce réseau est lui-même soutenu par différentes associations de patients telles que l'AFM-Téléthon, l'AMMI (Association contre les Maladies Mitochondriales), l'AFAF (Association Française de l'Ataxie de Friedreich) et Ouvrir les Yeux (Neuropathies Optiques Héritaires).

II.2.1. Les signes cliniques

Les phénotypes caractéristiques de ces maladies sont très nombreux et très variés. Cependant, ils peuvent être regroupés en différentes catégories selon les signes cliniques : cardiovasculaires, dermatologiques, neurologiques, psychiatriques, musculaires... (Scharfe *et al.*, 2009). Les mutations causant des symptômes similaires affectent généralement des gènes

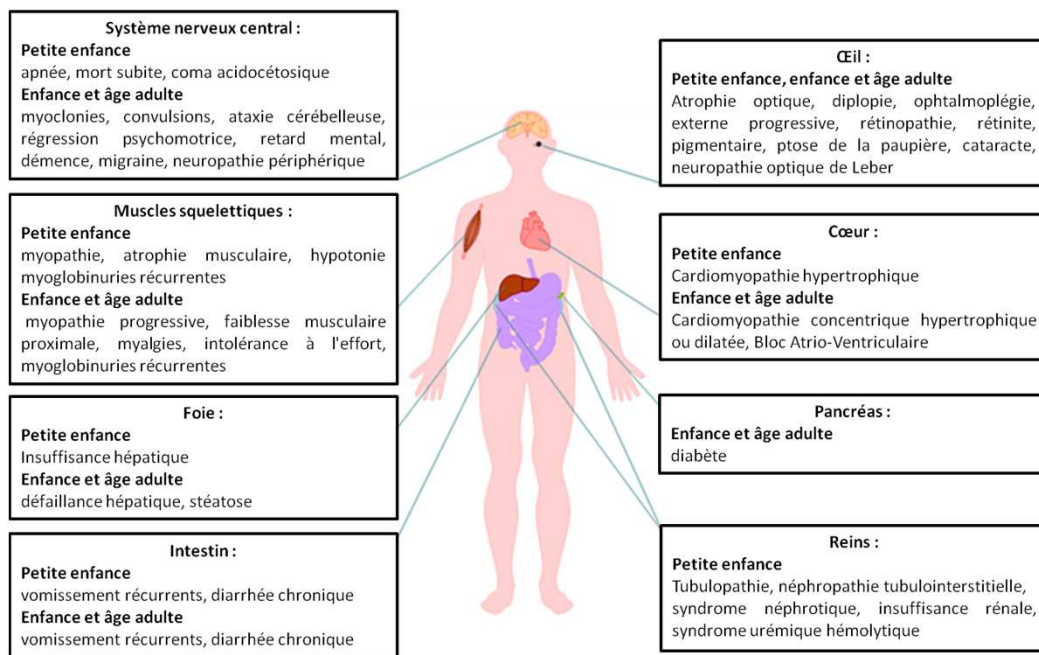


Figure 11 : Principaux organes atteints par les maladies mitochondriales et symptômes associés . Alors que certaines pathologies mitochondriales affectent des organes ciblés, comme la neuropathie optique héréditaire de Leber qui est limitée à l'œil, d'autres maladies mitochondriales sont multi-systémiques . Les principaux symptômes touchant ces organes au cours de la petite enfance ou plus tardivement sont présentés ici.(d'après Rötig *et al.*, Université Médicale Virtuelle Francophone et Kvell *et al.*, 2011).

qui interagissent fonctionnellement (Scharfe *et al.*, 2009). Parmi les symptômes courants des mitochondriopathies, on retrouve souvent des myopathies, des cardiomyopathies, des problèmes oculaires et auditifs ainsi que des diabètes. Ce sont donc des maladies multi-systémiques. En effet, les cellules, selon leurs besoins énergétiques, vont avoir plus ou moins de mitochondries et, par conséquent, plus ou moins de copies d'ADNmt (les fibroblastes de la peau ont une centaine de mitochondries alors que les cardiomyocytes en ont plusieurs milliers). De ce fait, les organes les plus demandeurs d'énergie seront, en général, les plus atteints dans ce type de pathologie (Fig. 11).

Mais ces symptômes, à partir d'une même mutation, peuvent varier d'un individu à l'autre du fait de l'importance non seulement du fond génétique mais aussi de facteurs environnementaux. Il n'y a donc pas de corrélation systématique entre génotype muté et phénotype. Ainsi, la mutation mitochondriale m.3243A>G dans le gène codant pour l'ARNt leucine peut induire soit un MIDD (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness*), soit un syndrome MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes*) beaucoup plus sévère (Laloi-Michelin *et al.*, 2009). Inversement, différentes mutations pourront conduire à des symptômes identiques (Rossignol *et al.*, 2003). L'influence du fond génétique joue donc vraisemblablement un rôle important dans la modulation de l'expression des mutations. C'est le cas, par exemple, du syndrome de LHON (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*), pour lequel les mutations 10663C, 11778A et 14483C dans les gènes ND4L, ND4 et ND6 respectivement sont fortement associées à l'haplogroupe J (qui regroupe environ 9% de l'ADNmt des Européens de l'ouest) (Brown *et al.*, 2002).

Comme dit précédemment, beaucoup de maladies mitochondriales affectent la chaîne respiratoire. Dans le cadre de ces mutations, malgré la grande diversité et la grande variabilité des symptômes, il en existe un assez constant et caractéristique : l'acidose lactique. En effet, un ralentissement de la chaîne respiratoire va entraîner une accumulation d'équivalents réduits, produits par le cycle de Krebs, défavorable à la régénération du NAD⁺ à la fois mitochondrial et cytosolique (Le NAD⁺ cytosolique est régénéré par les mitochondries grâce aux navettes glycérol-3-phosphate et malate/aspartate). Le NAD⁺ cytosolique n'étant plus régénéré, la glycolyse risque de s'arrêter. C'est pour éviter l'arrêt de la glycolyse que le pyruvate va être transformé en lactate, produisant ainsi du NAD⁺ à partir du NADH accumulé. Cette étape permettra donc à la cellule ayant un problème au niveau de la chaîne respiratoire

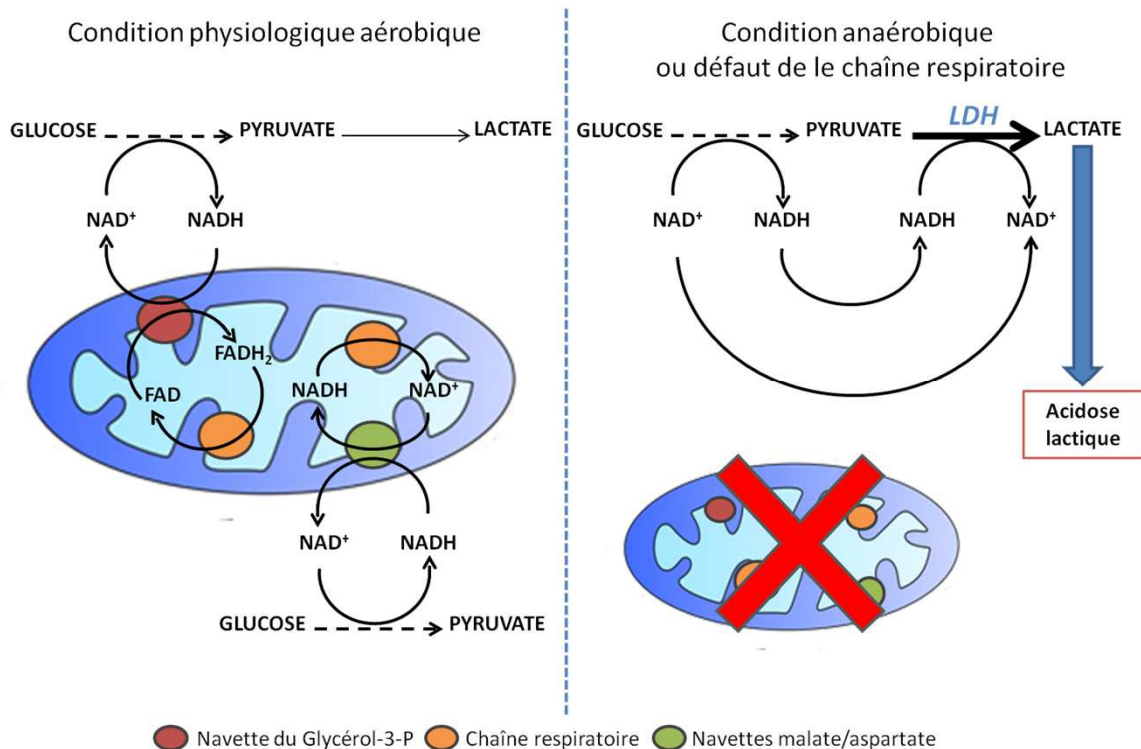


Figure 12 : Régénération du NADH cytosolique et acidose lactique. En situation physiologique aérobie, le NADH généré notamment par la glycolyse est ré-oxdé grâce à la navette du glycérol- 3-Phosphate ou grâce aux navettes malate /aspartate. Ces navettes sont localisées au niveau de la membrane mitochondriale interne et vont, en contrepartie, réduire du NAD⁺ ou du FAD. Les molécules de NADH et de FADH₂ ainsi générées vont être à leur tour ré-oxdées par la chaîne respiratoire., formant ainsi un cycle. En conditions anaérobies ou en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, ce système n'est plus capable d'assurer la régénération du NAD⁺. Ce processus se fait donc grâce à la lactate déshydrogénase (LDH) qui produit, à partir de pyruvate et de NADH, du lactate et du NAD⁺. Le lactate va donc s'accumuler, ce qui explique les acidoses lactiques retrouvées chez de nombreux patients atteint de mitochondriopathies.

Gène	Nom complet du gène	Pathologie associée
UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Déficit isolé en Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	Surdité neurosensorielle non syndromique autosomique récessive
RMD1	rippling muscle disease 1	Déficit combiné de la phosphorylation oxydative
LARS	leucyl-tRNA synthetase	Syndrome d'insuffisance hépatique aiguë infantile-manifestations multisystémiques
FARS2	phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	Paraplégie spastique autosomique récessive
BOLA3	bolA family member 3 (production de centres Fe/S)	Syndrome léthal de dysfonctionnements mitochondriaux multiples
MTFMT	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	Syndrome de Leigh avec leucodystrophie
EARS2	glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	Syndrome de leucoencéphalopathie-anomalies du thalamus et du tronc cérébral-hyperlactémie
ACO2	aconitase 2	Atrophie optique isolée autosomique récessive ou Dégénérescence cérébello-rétinienne infantile
AGK	acylglycerol kinase	Cataracte totale précoce ou Syndrome de cataracte congénitale-cardiomyopathie hypertrophique-myopathie mitochondriale
AFG3L2	AFG3 like matrix AAA peptidase subunit 2	Ataxie spinocérébelleuse ou Syndrome d'ataxie spastique-neuropathie précoce

Tableau 2 : Nouveaux gènes impliqués dans des pathologies mitochondriales en 2012.

de régénérer son NADH nécessaire pour maintenir une production d'ATP par la glycolyse (Fig. 12). Par contre, le lactate s'accumule et provoque l'acidose lactique observée.

II.2.2. Gènes responsables de maladies mitochondriales

C'est en 1959 que Rolf Luft a, pour la première fois, démontré une corrélation entre un dysfonctionnement biochimique de la mitochondrie et une pathologie. En effet, il a démontré qu'un découplage mitochondrial entraînait un hypermétabolisme, une forte transpiration ainsi qu'une perte de poids importante chez une de ses patientes (Ernster *et al.*, 1959). Depuis, le développement de nouvelles technologies, et notamment le séquençage à haut débit, ont permis de découvrir de nombreux gènes impliqués dans les maladies mitochondriales. Ainsi, rien qu'en 2012, onze gènes supplémentaires ont été mis en évidence pour leur implication dans ces pathologies (Tableau 2). À ce jour, environ 150 maladies affectant directement ou indirectement les mitochondries ont été décrites mettant en cause plus de 265 gènes (pour une liste non exhaustive voir Koopman *et al.*, 2012). Ces gènes sont aussi bien localisés au niveau du génome nucléaire que du génome mitochondrial.

Comme décrits ci-dessus, les maladies mitochondriales sont des maladies très complexes causées par des mutations de très nombreux gènes pour lesquels il n'y a pas systématiquement le même phénotype associé. Il est donc très difficile de classer ces pathologies. Une possibilité est de les répartir en deux catégories : primaires et secondaires. Lorsqu'une maladie mitochondriale est directement associée à une mutation au niveau du génome mitochondrial, on parle de maladie primaire, par opposition aux maladies secondaires qui, elles, sont causées par des facteurs extérieurs à la mitochondrie (mutations dans l'ADN nucléaire, facteurs environnementaux...).

II.2.3. Maladies mitochondriales primaires

II.2.3.1. Généralités

Bien que la présence d'ADN dans les mitochondries soit connue depuis longtemps (Nass *et al.*, 1963 # Schatz, 1963), ce n'est qu'une fois le génome mitochondrial séquencé (Anderson *et al.*, 1981) que des pathologies ont commencé à être associées à des mutations de l'ADNmt. Les premiers cas de maladies primaires ont donc été décrits indépendamment en 1988 par Wallace et Holt. Dans son article (Wallace, 1988), Wallace présentait le cas d'une mutation dans le gène *ND4* (sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase) responsable du syndrome de LHON chez plusieurs familles. Holt, quant à lui, décrivait des délétions au niveau de gènes mitochondriaux codant des sous-unités des complexes I et III entraînant des myopathies (Holt, 1988). Aujourd'hui, plus de 250 mutations ponctuelles dans l'ADNmt sont associées à des pathologies (www.mitomap.org).

II.2.3.2. Transmission des maladies mitochondriales primaires

- Héritage maternel

La transmission des maladies mitochondriales primaires est très particulière. Tout d'abord, cette particularité est liée au mode de transmission des mitochondries. En effet, l'héritage mitochondrial est exclusivement maternel (Case & Wallace, 1980). Du fait de leur localisation à la base de la tête du spermatozoïde, peu de mitochondries rentrent dans l'ovocyte. Ces quelques mitochondries paternelles sont rapidement détruites par autophagie. Il est probable que le métabolisme superactif des spermatozoïdes conduise à l'apparition de nombreuses mutations dans l'ADNmt, rendant ces mitochondries inaptées (Al Rawi *et al.*, 2011). Ces pathologies sont donc majoritairement transmises par les mères.

- mutations de *novo*

Cependant, certaines mutations ne sont pas héritées maternellement et apparaissent *de novo* chez les individus. Ces mutations vont s'accumuler sporadiquement avec l'âge, jouant un rôle notamment dans le vieillissement (Ruiz-Pesini *et al.*, 2006) et les maladies

mitochondriales. Étant donné l'origine endosymbiotique des mitochondries, la réplication de l'ADNmt est indépendante et différente de la réplication de l'ADN nucléaire (ADNn). En effet, l'ADNmt va être répliqué en plusieurs centaines de copies, dont certaines vont accumuler des mutations, pour plusieurs raisons : (i) La polymérase γ a un taux d'erreurs de réplication relativement élevé (une erreur environ toutes les 10^5 bases contre une erreur toutes les 10^9 pour la polymérase delta nucléaire), (ii) le génome mitochondrial est fortement soumis aux « attaques » des radicaux libres générés par la chaîne respiratoire, (iii) la mitochondrie ne possède pas de systèmes de réparation de l'ADN aussi performants que ceux du noyau. En effet, le seul système de réparation de l'ADN mitochondrial semble être le système BER (*Base Excision Repair*) (Akbari *et al.*, 2008).

L'absence de systèmes de réparation performants combinée au taux d'erreur de réplication de l'ADN polymérase gamma et le stress oxydatif engendré par la proximité de nombreux radicaux libres entraînent la survenue de mutations qui vont donc s'accumuler plus ou moins rapidement au cours du temps. Ceci va aboutir à un mélange de différentes copies d'ADNmt qui sera nommé hétéroplasmie.

II.2.3.3. Notions d'homoplasmie et d'hétéroplasmie

Une même mitochondrie pourra donc contenir des versions sauvages et des versions mutées de cet ADNmt en proportions variables ; on parle d'hétéroplasmie. Cette hétéroplasmie peut être à l'échelle cellulaire, tissulaire ou à l'échelle de l'organisme. Tant que le taux de versions mutées de l'ADNmt reste en dessous d'un certain seuil, les versions sauvages suffisent à l'accomplissement des fonctions ; Il s'agit de l'effet de seuil phénotypique. Mais au cours des divisions cellulaires successives, le taux d'hétéroplasmie peut varier et, si la proportion d'ADNmt muté est trop forte (au-delà de 60% dans le cas de délétions d'ADNmt et au-delà de 90% dans le cas de mutations ponctuelles de l'ADNmt), les versions sauvages ne pourront plus compenser les défauts pour assurer le bon fonctionnement de la mitochondrie (Rossignol *et al.*, 2003). Ces déficiences vont alors conduire à l'expression de la maladie mitochondriale. C'est pourquoi certaines pathologies ne surviennent qu'à l'âge adulte, le temps que ce seuil soit atteint. Par exemple, dans le cas du

Déficit	Gène	Fonction	Clinique	Mode de transmission
complexe I	ND3, ND4, ND5	sous-unité du CI	syndrome de Leigh	mitochondrial
complexe V	ATP6	sous-unité du CV	NARP/syndrome de Leigh	mitochondrial
multiple	ARNTLeu	ARNt	MELAS	mitochondrial
	ARNtLys	ARNt	MERRF	mitochondrial
	délétion de l'ADN		KSS/syndrome de Pearson	sporadique
complexes I et III	ND4, ND6, cytb	sous-unités de la CR	Neuropathie optique de Leber	mitochondrial

Tableau 3 : Principales mutations et délétions de l'ADNmt et présentations cliniques associées. KSS : syndrome de Kearns-Sayre; MELAS : Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes; MERRF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) (d'après l'Université Médicale Virtuelle Francophone).

syndrome LHON, mais aussi pour des formes non-syndromiques de surdité et de plusieurs autres pathologies, les mutations doivent ˆtre presque à l’état homoplasmique pour conduire à la pathologie.

Le degré d’hétéroplasmie peut aussi influencer sur la sévérité de la maladie. Par exemple, une corrélation a été montrée entre le degré d’hétéroplasmie et la sévérité du diabète avec surdité de transmission maternelle (MIDD) : plus la quantité de versions mutées est forte et plus les symptômes sont sévères, avec une apparition plus précoce, une masse corporelle plus faible et une augmentation de la quantité d’hémoglobine glyquée 1c (biomarqueur du diabète) (Laloi-Michelin *et al.*, 2009).

II.2.3.4. Mutations de gènes mitochondriaux codant pour des protéines

Depuis quelques décennies, de nombreux cas d’intolérance à l’exercice ont été associés à des mutations ponctuelles et sporadiques de gènes mitochondriaux codants pour des protéines de la chaîne respiratoire dans les cellules musculaires. Jusque-là, ce symptôme était classiquement attribué à un défaut de métabolisme du glycogène et des acides gras. Cela a permis de prendre conscience de l’importance de l’ADNmt, même s’il ne code que 13 des quelques 1 500 protéines mitochondriales (Dimauro & Davidzon, 2005). Ces 13 protéines sont toutes impliquées dans les complexes des OXPHOS. Contrairement aux mutations dans les gènes de l’ADNmt codant pour des ARNt ou des ARNr mitochondriaux, qui ont des effets pléiotropes, les mutations dans les gènes de l’ADNmt codant pour des protéines affectent de façon assez ciblée le complexe auquel ces protéines appartiennent. Mais du fait du fonctionnement linéaire de la chaîne respiratoire, un défaut en amont aura des conséquences en aval, et, par effet domino, les conséquences pourront être multiples. Quelques exemples de pathologies associées à des mutations au niveau de gènes mitochondriaux codants pour des protéines sont donnés dans le tableau 3.

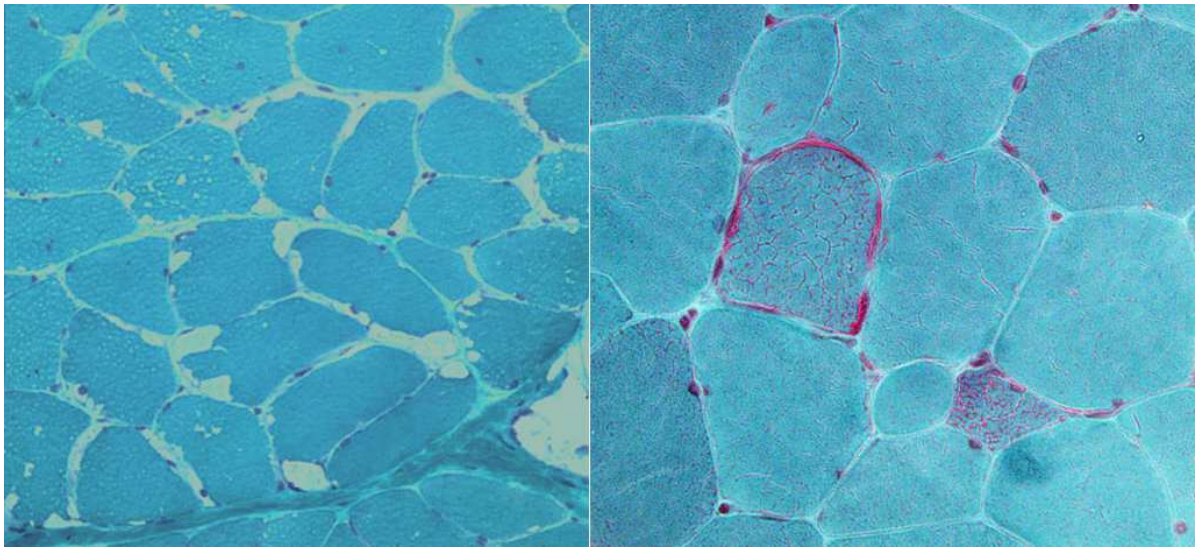


Figure 13 : « Fibres rouges en lambeaux ». Certaines pathologies mitochondriales, notamment le syndrome MERRF, présentent une désorganisation des fibres musculaires observables sur des coupes microscopiques après coloration au trichrome de Gomori. Ceci est dû à une accumulation anormale de mitochondries sous la membrane plasmique et à travers la fibre musculaire, entraînant la désorganisation de la fibre, et donnant cet aspect irrégulier, « en lambeaux » ou « déchiqueté ». (d'après medcell.med.yale.edu).

II.2.3.5. Mutations de gènes mitochondriaux codant pour des ARNt ou ARNr

Toutes les mutations qui affectent l'ADNmt ne se situent pas au niveau des gènes codants pour les sous-unités protéiques impliquées dans les OXPHOS. Des mutations dans les gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr-mt) ou les ARN de transfert (ARNt-mt) mitochondriaux sont aussi sources de pathologies (Tableau 3). L'impact du changement de base dans ces gènes peut être estimé par les modifications de la structure secondaire de ces ARNs. Mais toutes les mutations ne sont pas délétères puisque ≈15-20% des mutations dans les ARNt-mt et un certain nombre dans les ARNr-mt sont anciennes et favorisent l'adaptation (Ruiz-Pesini *et al.*, 2006 # Elson *et al.*, 2015). Du fait du rôle important de ces ARNs dans la traduction mitochondriale des 13 sous-unités protéiques essentielles aux OXPHOS, des défauts à ce niveau vont avoir des conséquences à la fois sur les complexes I, III, IV et V (Les gènes codant pour les sous-unités du complexe II sont tous nucléaires). De tels défauts se traduisent généralement par une forte acidose lactique, comme dit précédemment (II.2.1. Les signes cliniques) et, au niveau musculaire, par la présence de « fibres rouges en lambeaux » (Fig. 13) (Dimauro & Davidzon, 2005).

- Les gènes codant les ARNt-mt

Plusieurs cas de maladies mitochondriales sont dus à des mutations au niveau des 22 gènes codants pour les ARNt-mt. Ces mutations impactent fortement la stabilité de ces ARNs, le bon chargement des acides aminés ou la reconnaissance correcte entre codon-anticodon. Les peptides générés sont donc erronés ou terminés prématurément.

Curieusement, alors qu'on aurait pu s'attendre à ce que des mutations dans les différents ARNt-mt aient des conséquences assez similaires, des mutations dans tel ou tel ARNt-mt vont aboutir à des signes cliniques différents. Par exemple, une mutation dans l'ARNt-mt^{Ile} conduit souvent à une cardiopathie, une mutation dans l'ARNt-mt^{Glu} à un diabète, ou encore, une mutation dans l'ARNt-mt^{Lys} à un lipome (Dimauro & Davidzon, 2005). De plus, une même mutation, dans un même gène codant pour un ARNt-mt, peut induire des syndromes différents. Par exemple, la mutation m.3243A>G dans le gène *MT-TL1* codant l'ARNt-mt^{Leu1} peut induire une encéphalomyopathie et/ou un syndrome MELAS et/ou une ophtalmoplégie externe chronique progressive (Yarham *et al.*, 2010). Enfin, le degré

d'hétéroplasmie va moduler l'expression phénotypique de la mutation, complexifiant encore la relation mutation/phénotype. Par exemple, une corrélation a été établie dans le cas de la mutation m.8344A>G au niveau du gène codant pour l'ARNt-mt^{Lys}, entre degré d'hétéroplasmie, sévérité clinique et âge d'apparition des symptômes (Chinnery *et al.*, 1997). Les mutations dans les gènes codants pour les ARNt-mt sont donc classiquement considérées comme récessives puisque le phénotype ne s'exprime qu'à des seuils d'hétéroplasmie élevés de l'ordre de 70 à 90%. Cependant, elles s'accumulent d'autant plus que, contrairement aux mutations touchant les gènes mitochondriaux codants pour des protéines, elles sont peu contre sélectionnées au cours du développement (Yarham *et al.*, 2010), et ce, notamment dans les tissus post-mitotiques. Ainsi, par exemple, les cellules musculaires accumuleront d'avantage de mutations que les cellules sanguines. Un exemple classique de maladie mitochondriale due à une mutation au niveau d'un ARNt-mt est le syndrome MELAS, causé chez 80% des patients par une mutation au niveau du gène codant pour l'ARNt-mt^{Leu} (www.orpha.net). Il est intéressant de noter que les mutations dans des gènes nucléaires codant pour les aminoacyl-ARNt synthétase mitochondriales n'auront pas nécessairement les mêmes conséquences que des mutations dans les gènes mitochondriaux codants pour les ARNt-mt correspondants (Vafai & Mootha, 2012).

- Les gènes codant les ARNr-mt

Le ribosome mitochondrial (mitoribosome) de mammifère est constitué d'une petite sous-unité (28S) contenant l'ARNr-mt 12S et d'une grande sous-unité (39S) qui contient l'ARNr-mt 16S ainsi que de nombreuses protéines. Cet ensemble forme une structure de 55S. Les ARNr-mt 12S et 16S sont respectivement codés par les gènes mitochondriaux MT-RNR1 et MT-RNR2. De nombreuses mutations dans des gènes codants pour les ARNr-mt ont été associées à des pathologies (43 mutations pour MT-RNR1 et 10 pour MT-RNR2 sont rapportées sur www.mitomap.org).

La plupart des mutations répertoriées pour le gène MT-RNR1 conduisent à une surdité (certaines mutations conduisent aussi à un syndrome MERRF). C'est le cas, par exemple, de la

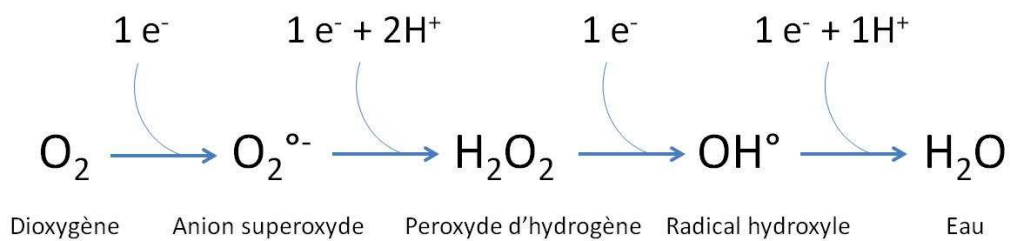


Figure 14 : Génération des différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS). La génération des ROS commence généralement par un gain d'électron, « échappé » de la chaîne respiratoire, par l'oxygène. Ceci génère un anion superoxyde qui peut être ensuite dismuté en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs mécanismes de détoxification de ce peroxyde d'hydrogène (Fig. 15), mais en présence de certains métaux tels que le fer(Fe^{2+}), cette molécule peut être convertie en radical hydroxyle, molécule très délétère puisqu'ayant un fort pouvoir oxydant.

mutation m.1555A>G, qui est la mutation la plus commune chez les patients atteints de pertes de l'audition non-syndromique. Curieusement, d'un sujet à l'autre, cette même mutation homoplasique présente une sévérité variable allant d'une ouïe normale à une perte congénitale et sévère de l'audition. Ces différences semblent indiquer un fort impact de facteurs extérieurs, tels qu'environnementaux, sur l'expression phénotypique des mutations de l'ADNmt (Subathra *et al.*, 2014). Dans le cas des mutations du gène MT-RNR2, les pathologies associées sont diverses et différentes de celles observées pour MT-RNR1. Elles sont fréquemment associées à des LVNC (*Left ventricular non-compaction cardiomyopathy*) (Tang *et al.*, 2010) ainsi qu'à des syndromes de vomissements cycliques avec migraines.

II.2.3.6. Espèces réactives de l'oxygène et ADN mitochondrial

Comme nous l'avons cité précédemment, toutes les mutations de l'ADNmt ne sont pas héritées maternellement, certaines apparaissant de façon sporadique. Bien évidemment, les erreurs commises par l'ADN polymérase gamma durant la réplication de l'ADNmt sont une des sources de ces mutations sporadiques. Une autre source de mutation, considérée comme la source majoritaire de mutations sporadiques sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

- Formation des ROS

Les ROS sont issus du métabolisme de l'oxygène (O_2) et sont, généralement, classés en deux catégories : (i) Les radicaux libres, d'une part, qui sont des molécules ou des atomes possédant, sur leur couche externe, un électron libre. Cet électron ayant tendance à s'apparier, le radical qui le porte va donc devoir capter un autre électron (radical oxydant) ou céder son électron « célibataire » (radical réducteur) ; (ii) Les composés non radicalaires, d'autre part, tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont aussi très fortement réactifs.

La grande majorité des ROS d'une cellule sont générés par la mitochondrie et plus particulièrement par la chaîne respiratoire. En effet, même si les complexes sont organisés en super-complexes pour éviter que les électrons ne se « perdent en route », il n'est pas rare qu'un électron s'échappe et réagisse avec l' O_2 pour générer un anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ (Fig. 14), notamment au niveau des complexes I et III et du Coenzyme Q. Par réactions en chaîne,

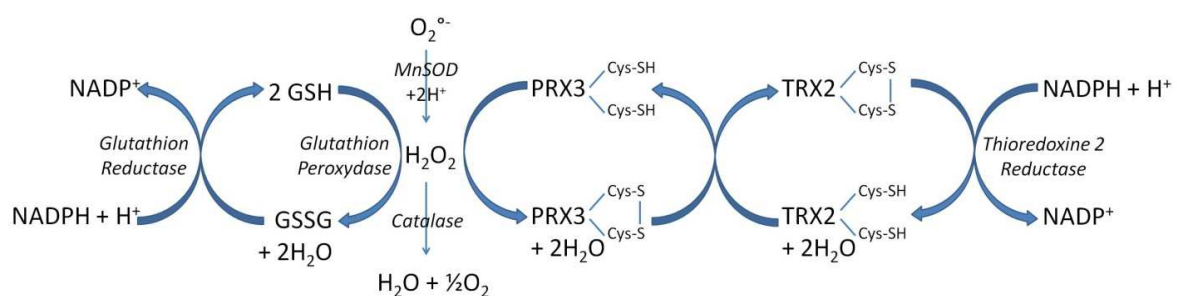
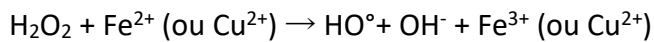


Figure 15 : Systèmes de détoxification des ROS. La anions superoxydes, générés notamment par la chaîne respiratoire, sont rapidement dismutés par la super oxyde dismutase à manganèse (*MnSOD*) pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Plusieurs voies de détoxification de l' H_2O_2 : i) les peroxyrédoxines 3 (PRX3) possèdent deux groupements thiols portés par deux cystéines. Ces groupements sont oxydés par l' H_2O_2 pour former deux molécules d' H_2O . Cette oxydation des PRX3 induit la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines. En retour, les PRX3 sont régénérées par les thiorédoxines 2 (TRX2). Enfin la thiorédoxine 2 réductase catalyse la réduction du pont disulfure formé dans les TRX2 grâce au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). ii) La glutathion peroxydase métabolise l' H_2O_2 en deux molécules d' H_2O à l'aide de deux monomères de glutathion (GSH). En contrepartie, les monomères de glutathion sont oxydés et des ponts disulfures se forment entre les deux monomères, ce qui conduit à un disulfure de glutathion oxydé (GSSG). La glutathion réductase, à l'aide du cofacteur NADPH, va réduire ce GSSG en deux monomères de GSH. iii) La catalase enfin, est une hémoprotéine qui réagit avec l' H_2O_2 pour former de l' H_2O et de l' O_2 .

cet anion superoxyde va générer d'autres espèces de ROS. Il est généralement admis que durant les phosphorylations oxydatives, 1 à 2% de l'oxygène total consommé est en fait perdu par la chaîne respiratoire pour former des ROS (Chance *et al.*, 1979). Ces ROS peuvent être plus ou moins toxiques selon leur facilité à donner leur oxygène et selon la molécule qui reçoit cet oxygène. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, en présence de métaux tels que Fe²⁺ ou Cu²⁺, peut aussi générer un radical hydroxyle HO° par la réaction de Fenton (Lesnefsky *et al.*, 2001) :



Le radical hydroxyle HO° ainsi obtenu est un puissant oxydant particulièrement néfaste pour la mitochondrie.

- Systèmes de détoxification des ROS

Pour faire face à cette production de ROS, la mitochondrie a mis en place un certain nombre de processus pour les détoxifier. Une première étape repose sur la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD). Cette métalloprotéine de la matrice mitochondriale permet la dismutation de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Fig. 15). L' H₂O₂ pourra être éliminé selon les trois voies suivantes (Fig. 15) : (i) L' H₂O₂ est pris en charge par la glutathion peroxydase qui, en oxydant le glutathion (GSH → GSSG), permet de générer deux molécules d' H₂O. Le Glutathion est réduit en retour par la glutathion réductase ; (ii) La catalase peut aussi intervenir et générer, à partir d' H₂O₂, une molécule d' H₂O et une demi molécule d' O₂ ; (iii) Enfin, les peroxyredoxines, et notamment la peroxyredoxine 3 (PRX3) qui est mitochondriale, permettent la dégradation de l' H₂O₂ en deux molécules d' H₂O. Les peroxyredoxines sont ensuite régénérées par les thioredoxines (TRX2) elles-mêmes réduites par la thioredoxine 2 réductase.

Il existe d'autres systèmes non enzymatiques qui permettent de détoxifier ce type de molécules toxiques. Ces réducteurs peuvent être soit endogènes tels que la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les œstrogènes, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque, soit exogène comme la vitamine C (acide ascorbique) ou la vitamine E (α-tocophérol) (Gilleron *et al.*, 2014).

- Impacts des ROS

En conditions physiologiques, l'ensemble des processus enzymatiques et non enzymatiques permettent une détoxification efficace de ces molécules toxiques à l'intérieur et l'extérieur de la mitochondrie. Mais, en cas de défaut de la chaîne respiratoire, les électrons vont s'accumuler et ainsi générer des ROS en excès, qui peuvent dépasser les capacités des systèmes de détoxification et créer ainsi un déséquilibre entre oxydation et système anti-oxydant. C'est ce que l'on appelle un stress oxydant. Ceci se traduit par une oxydation de certaines macro-molécules mitochondriales. En effet, ces molécules oxygénées très réactives peuvent oxyder les protéines, les lipides ou les acides nucléiques.

Ainsi, l'oxydation de certains acides aminés (notamment les cystéines, méthionines et tyrosines) peut conduire à une dénaturation et/ou une perte de fonction de certaines protéines. Ces pertes de fonction, selon leur importance, peuvent aggraver l'état de la mitochondrie.

Le stress oxydant impacte aussi la membrane en induisant une peroxydation des lipides qui la composent. Cette peroxydation semble notamment corrélée à une diminution de la fluidité et une augmentation de la perméabilité membranaire, qui pourraient causer entre autres une diminution supplémentaire de l'efficacité de la chaîne respiratoire.

En plus des protéines et lipides, une troisième catégorie de molécules du vivant pouvant être altérée par les ROS correspond à l'ADN. En effet, les ROS, et particulièrement les radicaux hydroxyles HO° , favorisent les mutations de l'ADN et spécialement de l'ADNmt qui est proche de la source de production des ROS. Un des principaux effets du OH° est d'oxyder la guanine en 8-oxo-guanine. Cette base modifiée ne s'associe donc plus de façon canonique à la cytosine mais à l'adénine. Si ce mésappariement n'est pas réparé avant la réplication de l'ADNmt, il va créer une mutation par transversion (remplacement d'une pyrimidine par une purine). Cet effet génotoxique est aggravé par le fait que l'ADNmt, contenu dans les nucléoïdes, est arrimé à la membrane mitochondriale interne. Il est donc très proche des chaînes respiratoires génératrices de ROS. De plus, l'absence d'organisation de l'ADNmt en chromatine le rend plus sensible à l'oxydation que l'ADNn. Comme dit précédemment, il faut aussi se rappeler que les systèmes de réparation de l'ADNmt semblent moins performants que ceux existant dans le

noyau. Ce type de mutations va donc s'accumuler avec le temps, notamment dans les tissus post-mitotiques gourmands en énergie, et sont donc une cause importante des maladies mitochondriales, et pourraient aussi être une des causes du vieillissement (Barouki *et al.*, 2006).

II.2.3.7. Facteurs aggravants des maladies mitochondriales primaires

Un cas bien connu est le valproate, médicament utilisé comme antiépileptique, et qui favorise des défaillances hépatiques chez des sujets atteints du syndrome d'Alpers (syndrome lié à une mutation de l'ADN polymérase gamma) en interférant avec les complexes I et IV de la chaîne respiratoire. En effet, parmi les signes cliniques, les personnes atteintes de ce syndrome sont épileptiques (Koenig *et al.*, 1997).

Un autre exemple concerne la mutation m.1555A>G du gène MT-RNR1, citée précédemment. En effet, la sévérité de la déficience auditive a été corrélée à une exposition aux aminosides, une classe d'antibactériens utilisée dans la lutte contre certains bacilles Gram négatifs (Subathra *et al.*, 2014).

Enfin, le tabac a été montré comme étant un facteur aggravant chez les porteurs de mutations du syndrome LHON (m.3460G4A, m.11778G4A et m.14484T4C) (Kirkman *et al.*, 2009).

II.2.4. Maladies mitochondriales secondaires

II.2.4.1. Mutations dans des gènes nucléaires

Si la mitochondrie possède son propre génome, elle ne code en réalité que pour un nombre infime des protéines qui la composent. La majeure partie des protéines mitochondriales est donc codée au niveau du génome nucléaire. D'après la base de données MitoCarta (www.broadinstitute.org), mise à jour en 2016, on considère qu'il y aurait 1158 gènes humains codants pour des protéines localisées dans les mitochondries, impliquées dans la biogénèse mitochondriale ou leur fonctionnement. Il n'est donc pas surprenant que des

Déficit	Gène	Fonction	Clinique	Mode de transmission
complexe I	NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUF1, NDUF2, NDUF11	sous-unités du CI	syndrome de Leigh	AR
	NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6	assemblage du CI	syndrome de Leigh	AR
complexe II	SDHA	sous-unités du CII	syndrome de Leigh	AR
	SDHB, SDHC, SDHD	sous-unités du CII	paragangliome / phéochromocytome	AD
complexe III	BCS1	assemblage du CIII	tubulopathie/encéphalopathie/défaillance hépatique	AR
complexe IV	SURF1	assemblage du CIV	syndrome de Leigh	AR
	SCO2	assemblage du CIV	cardioencéphalomyopathie	AR
multiple	TP (thymidine phosphorylase)	synthèse des nucléotides	MNGIE	AR
	POLG1 (ADN polymérase)	réplication de l'ADNmt	atteinte hépatique/syndrome d'Alpers+déplétion ADNmt	AR
		réplication de l'ADNmt	ophtalmoplégie+délétion ADNmt	AD
	Twinkle (hélicase)	réplication de l'ADNmt	myopathie/atteinte hépatique+déplétion ADNmt	AR
		réplication de l'ADNmt	ophtalmoplégie + délétion ADNmt	AD
	TK2, DGUOK	synthèse des nucléotides	atteinte hépatique+déplétion ADNmt	AR
	MPV17	inconnue	atteinte hépatique+déplétion ADNmt	AR
	PUS1	traduction mitochondriale	anémie sidéroblastique + myopathie	AR
	TRMU	traduction mitochondriale	atteinte hépatique	AR
	DARS2	traduction mitochondriale	leucoencéphalopathie	AR
	Frataxine	synthèse des protéines à centre Fe-S	ataxie de Friedreich	AR
	AFG3L2 (paraplégine)	contrôle qualité des protéines	paraplégie spastique	AR
	OPA1	fusion des mitochondries	atrophie optique	AD
	TAZ (Tafazzine)	remodelage des cardiolipines	syndrome de Barth	lié à l'X

Tableau 4 : Principales mutations et délétions de l'ADN nucléaire et présentations cliniques associées. AR : Autosomique Récessif; AD : Autosomique Dominant; MNGIE : Mitochondrial Neuro-Gastro-Intestinal Encephalomyopathy) (d'après l'Université Médicale Virtuelle Francophone)

mutations du génome nucléaire puissent conduire à des maladies impliquant des défauts mitochondriaux, dont les déficits des OXPHOS. Ainsi, seuls 15 à 20% des mitochondriopathies sont associées à des mutations au niveau de l'ADNmt, la grande majorité des autres étant dues à des mutations de l'ADN nucléaire (Calvo & Mootha, 2010). La première de ces mutations a été décrite en 1995 par l'équipe d'Arnold Munnich. Cette mutation affecte le gène SDHA, codant pour la sous-unité A du complexe de la succinate déshydrogénase et conduit à une déficience du complexe II, qui se traduit par un syndrome de Leigh (Bourgeron *et al.*, 1995). Depuis lors, plus de 150 gènes nucléaires ont été associés à des maladies mitochondriales (Koopman *et al.*, 2012 : pour une liste non exhaustive des gènes impliqués dans les maladies mitochondriales). Comme pour les maladies mitochondriales primaires, on observe une grande hétérogénéité clinique et génétique (Tableau 4) qui rend ces maladies extrêmement difficiles à diagnostiquer et ces mutations relativement difficiles à identifier. Pour ces raisons, ce chiffre de 150 gènes impliqués est probablement sous-estimé.

- Gènes nucléaires impliqués dans les OXPHOS

L'une des principales fonctions de la mitochondrie étant de produire de l'ATP, on associe implicitement maladie mitochondriale et défauts des OXPHOS.

Ces défauts sont la principale cause de maladies innées du métabolisme, avec une prévalence d'un cas pour 5 000 naissances. Ils se caractérisent par des symptômes dont la sévérité peut être très variable, pouvant causer une mortalité dès la petite enfance ou, au contraire, se déclencher tardivement sous forme de maladies neurodégénératives, par exemple. Les caractéristiques cliniques engendrées par des défauts des OXPHOS sont eux aussi très variables : myopathie, cardiomyopathie, surdité, perte de la vision, ataxie, neuropathie, problèmes hépatiques... De plus, elles touchent souvent différents organes notamment les organes les plus demandeurs d'énergie.

D'après la base de données OMIM, (<http://omim.org>), il y a, aujourd'hui, de nombreuses mutations ponctuelles et un grand nombre de délétions dans des gènes nucléaires connus pour affecter la chaîne respiratoire mitochondriale. En ce qui concerne le

génomique nucléaire, un certain nombre de maladies ont été mises en évidence. En effet, parmi les 72 gènes nucléaires codant une sous-unité d'un complexe de la chaîne respiratoire, une quinzaine d'entre eux sont responsables de cytopathies.

- Gènes impliqués dans les autres fonctions mitochondriales

Outre les mutations touchant des gènes codants pour des protéines impliquées dans les OXPHOS, un certain nombre de mutations de gènes nucléaires vont affecter des protéines impliquées dans l'import mitochondrial (*GFER, DPP1, MAGMAS...*), la maturation et l'assemblage des complexes protéiques (*SPG7, SDH5...*), la fusion/fission (*MNF2...*) ou encore la maintenance du génome mitochondrial (*POLG, MPV17...*) (Calvo & Mootha, 2010 # Lasserre *et al.*, 2015). Ces différentes mutations pourront dans un deuxième temps avoir des conséquences négatives sur les OXPHOS. En effet, une mutation dans un gène dont la protéine est impliquée dans l'import pourra avoir des conséquences sur les OXPHOS. Par exemple, une diminution de l'import de l'ADN polymérase gamma entraînera une diminution de la quantité de l'ADNmt et, *in fine*, une diminution des protéines mitochondriales des OXPHOS produites à partir de gènes mitochondriaux. Parmi ces gènes, il en existe d'autres qui sont associés à des défauts des OXPHOS et dont la fonction n'est pas exactement connue. C'est, par exemple, le cas du gène *MPV17* (2p23.3), impliqué dans la neurohépatopathie de type Navajo.

La mitochondrie réalise d'autres fonctions telles que l'apoptose, la synthèse d'hormone ou encore l'homéostasie du calcium et du fer. Les protéines impliquées dans ces fonctions sont toutes codées par des gènes nucléaires. Des mutations dans ces gènes risquent d'abolir ces fonctions importantes pour le bon fonctionnement cellulaire. C'est, par exemple, le cas de la Frataxine dont la fonction exacte n'est pas connue. Le gène muté produit une protéine anormale qui aboutit à des problèmes d'homéostasie du fer dans la mitochondrie responsable de la maladie appelée Ataxie de Friedrich.

II.2.4.2. Maladies avec implication indirecte de la mitochondrie

Nous avons présenté jusqu'ici un certain nombre de maladies pour lesquelles un défaut mitochondrial était la cause première de la pathogénicité. Mais il existe d'autres pathologies dans lesquelles les défauts mitochondriaux sont plutôt des conséquences, parfois aggravantes, que des causes. C'est le cas notamment de certaines formes d'obésité, de cancers, de diabètes, des maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington, ou encore de maladies cardiaques.

Des défauts mitochondriaux peuvent apparaître dans le cas de la maladie d'Alzheimer, première cause de démence liée à l'âge. La maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte neuronale et la présence de plaques amyloïdes. Ces plaques sont composées d'un enchevêtrement de peptides amyloïdes β de 40 à 42 acides aminés ($A\beta_{40-42}$), issus d'un mauvais clivage de la protéine ABPP (*Amyloid β Precursor Protein*). Cette accumulation est consensuellement considérée comme la cause principale de la maladie. Ce peptide agrégé semblerait altérer le fonctionnement des OXPHOS. Ce dysfonctionnement augmenterait en retour l'agrégation du peptide amyloïde. Enfin, il semblerait que le peptide $A\beta$ soit à l'origine d'un relargage de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c et d'une augmentation de la production de ROS (Chen *et al.*, 2010).

II.2.4.3. Influence de facteurs environnementaux

Les mitochondries sont des organites essentiels pour le fonctionnement cellulaire. Des facteurs environnementaux alimentaires ou médicamenteux peuvent venir moduler l'activité mitochondriale.

- Facteurs médicamenteux

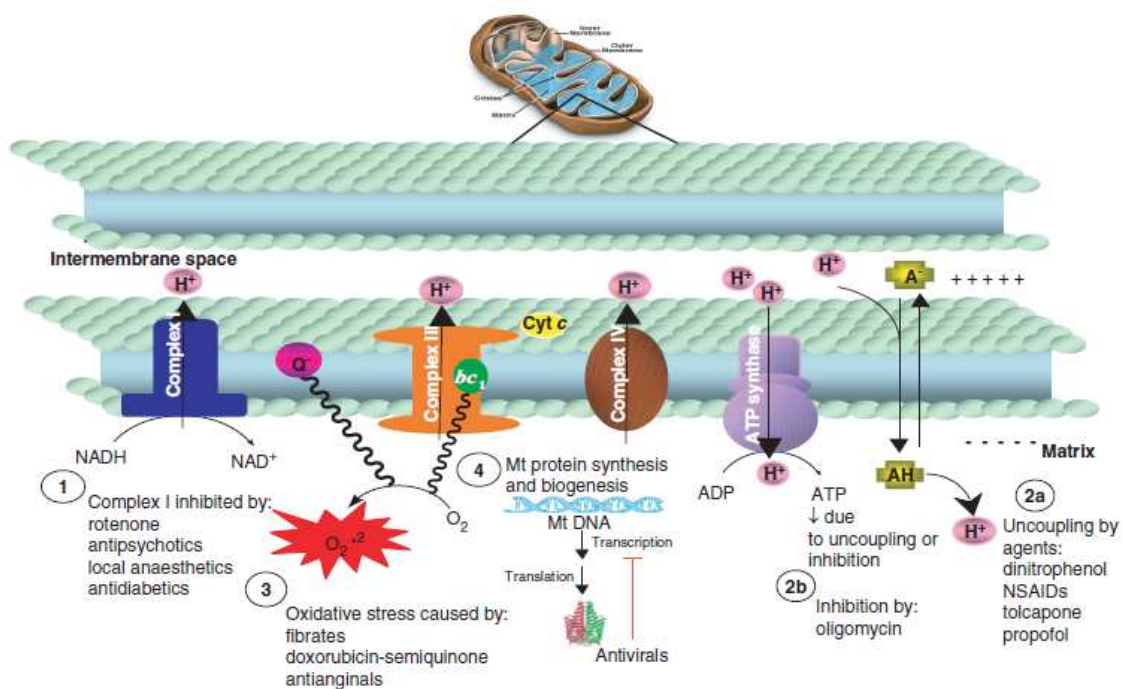


Figure 16 : Mécanismes de toxicité induits par différentes molécules pharmacologiques.

1) Inhibition de complexes de la chaîne respiratoire, 2a) découplage des OXPHOS, 2b) inhibition de l'ATP synthase, 3) stress oxydatif et 4) blocage de la réplication de l'ADNmt ou de traduction.(d'après Chan *et al.*, 2005).

Bien que les médicaments aient des effets positifs pour traiter des maladies, ils ont souvent des effets secondaires non souhaités. Parmi ces effets négatifs, certains vont altérer les fonctions mitochondriales. Le mode d'action de ces médicaments sur la mitochondrie permet de définir quatre groupes (Chan, 2005) (Fig. 16) :

- Le premier groupe comprend des inhibiteurs d'un des complexes de la chaîne respiratoire. Certaines molécules pharmacologiques sont connues pour inhiber le complexe I. Ces molécules appartiennent à certaines grandes classes pharmacologiques telles que les neuroleptiques, les barbituriques, les antihypertenseurs de la sous-classe des inhibiteurs calciques et certains anesthésiques locaux.

- Le deuxième groupe comprend des molécules découplant les oxydations phosphorylantes. Ces molécules sont notamment des antiparkinsoniens (Tolcapone), des antiinflammatoires non-stéroïdiens (Diclofénac), des anesthésiques généraux (Propofol), des antidépresseurs inhibiteurs de la recapture sérotoninergique (Fluoxétine) qui interagissent avec les phospholipides de la membrane interne la rendant ainsi perméable aux protons.

- Le troisième groupe de molécule va agir en augmentant le stress oxydant. Parmi ces molécules, on peut notamment citer la Doxorubine, un anticancéreux intercalant connu pour sa cardiotoxicité, les fibrates, hypocholestérolémiantes ayant une toxicité hépatique et musculaire et enfin l'Amiodarone, antiarythmique dont les effets secondaires sont hépatiques, pulmonaires et thyroïdiens.

- Le quatrième et dernier groupe de molécules toxiques agit sur la réplication de l'ADNmt et la traduction. Par exemple, les antirétroviraux inhibiteurs de la transcriptase inverse (Zidovudine...) utilisés dans le traitement du VIH sont capables d'inhiber l'ADN polymérase gamma. Du fait de l'origine bactérienne de la mitochondrie, certains antibiotiques qui agissent en bloquant le ribosome bactérien peuvent aussi inhiber le mitoribosome (McKee, 2006 # Soriano, 2005).

La plupart des médicaments cités ci-dessus sont donc à éviter ou à proscrire en cas de maladie mitochondriale afin de ne pas aggraver les problèmes mitochondriaux déjà présents.

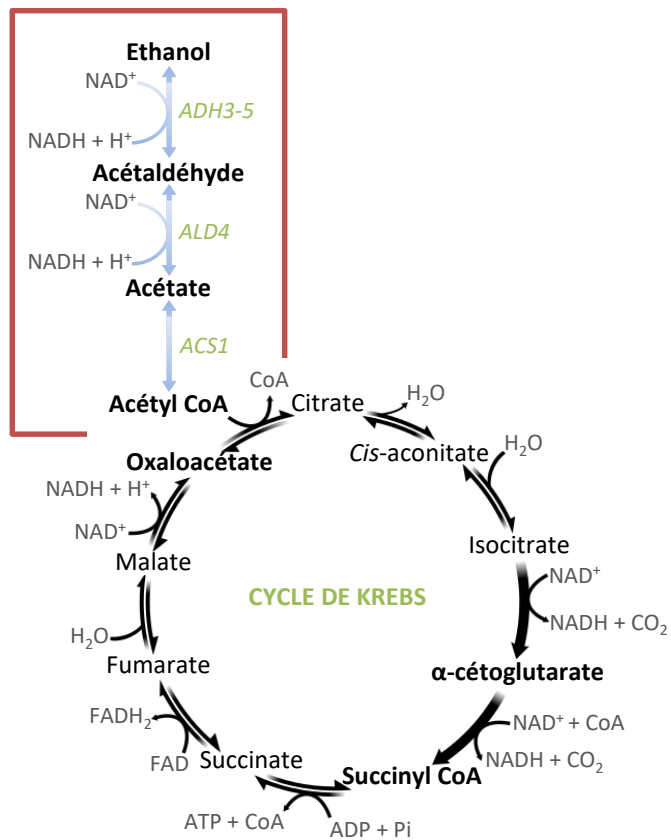


Figure 17 : Métabolisme de l'éthanol et cycle de Krebs .

- Autres facteurs

L'alcool, quant à lui, est connu pour avoir à la fois un effet inhibiteur et un effet toxique sur la mitochondrie. Son effet inhibiteur est dû à la métabolisation de l'éthanol en acétate via l'acétaldéhyde (Fig. 17). Ces deux réactions nécessitent le cofacteur NAD^+ qui est réduit en NADH , diminuant ainsi le pool de NAD^+ . Or, plusieurs fonctions mitochondriales nécessitent du NAD^+ et vont alors être inhibées, telles que la β -oxydation des acides gras ou le cycle de Krebs. Quant à l'effet toxique, il est causé par une forte génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, une diminution du pool de NAD^+ mitochondrial impose une pression à la chaîne respiratoire mitochondriale et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Hoek, 2002). Ces ROS vont avoir un effet néfaste sur la mitochondrie, directement en induisant une peroxydation des lipides et une oxydation des protéines, et indirectement en induisant des délétions de l'ADNmt (Fromenty *et al.*, 2000).

Certaines molécules utilisées dans la vie quotidienne peuvent engendrer des défauts mitochondriaux. Par exemple, certains insecticides ou fongicides tels que la roténone ou l'antimycine A inhibent respectivement les complexe I et III (Chan, 2005).

II.3. Modèles d'étude des maladies mitochondriales

L'importance et la méconnaissance de ces maladies mitochondriales a amené les chercheurs à développer de nombreux modèles d'études dans différents organismes. Aucun modèle n'étant parfait, l'utilisation complémentaire des différents organismes modèles, avec leurs avantages et leurs inconvénients, a déjà permis d'améliorer notre compréhension des maladies mitochondriales. Nous présenterons ici quelques-uns de ces modèles.

II.3.1. Les cellules humaines

L'étude de maladies mitochondriales peut se faire directement sur des cellules de patients, issues de biopsies d'organes plus ou moins atteints tels que les muscles, le foie, le rein ou encore l'endomyocarde. Ces cellules vont permettre de réaliser des analyses génétiques et/ou biochimiques qui seront indicatives sur la sévérité de la pathologie. Par exemple, l'activité de la chaîne respiratoire peut être estimée par deux techniques : la polarographie et la spectrophotométrie. Les études polarographiques réalisées sur des préparations enrichies en mitochondries mesurent la consommation d'oxygène alors que les études spectrophotométriques mesurent les activités de certains complexes de la chaîne respiratoire.

Ces techniques étant invasives, les chercheurs utilisent donc plus classiquement les fibroblastes des patients, plus faciles à obtenir. Ces fibroblastes permettent d'étudier l'impact de la mutation sur la mitochondrie. Cependant, les fibroblastes sont des cellules de la peau, un tissu souvent peu ou pas atteint par les maladies mitochondriales. Ainsi, ce modèle ne permet pas toujours de mettre en évidence les défauts mitochondriaux. De plus, ce modèle, comme les cellules provenant des patients, présentent le désavantage d'avoir des fonds génétiques très variables qui peuvent moduler les phénotypes induits par des mutations au niveau de gènes mitochondriaux. Pour ces raisons, un autre modèle a été mis au point : ce sont les cybrides.

Les cybrides sont issus de la fusion d'une cellule énuclée de patient et d'une cellule ρ^0 immortalisée. La cellule énuclée apporte les mitochondries porteuses de la mutation à étudiée alors que la cellule ρ^0 immortalisée apporte un environnement génétique nucléaire contrôlé (Tonin & Entelis, 2014). L'utilisation de ces cybrides permet, par exemple, d'évaluer des seuils d'hétéroplasmie, de tester la compatibilité entre ADNmt et ADNn. Un inconvénient de ces cybrides est qu'ils sont issus de lignées tumorales qui utilisent préférentiellement la glycolyse plutôt que les OXPHOS. Ceci peut entraîner un biais dans l'analyse des défauts mitochondriaux.

Pour éviter ce biais et grâce aux travaux de Yamanaka (Takahashi et Yamanaka, 2006), des fibroblastes ont pu être reprogrammés en cellules souches pluripotentes (*iPSC*, *induced Pluripotent Stem Cells*), capables de se différencier dans tous les types cellulaires et de proliférer indéfiniment. Ainsi sans utiliser de techniques invasives, il est possible d'obtenir le

type cellulaire le plus impacté par la maladie mitochondriale par différenciation des cellules iPSC provenant de fibroblastes du patient. Grâce à ces cellules, de nombreuses pathologies mitochondriales peuvent être modélisées (Dudek *et al.*, 2013 # Wang *et al.*, 2014). Ces modèles très récents ont déjà apporté des résultats prometteurs. Cependant, la reprogrammation réalisée à partir des fibroblastes semble induire un certain nombre de défauts génétiques et épigénétiques (Qiang, 2011). Les années futures nous diront si ce modèle est aussi prometteur qu'il y paraît.

Dans le cadre des maladies mitochondriales, il est aussi possible de les modéliser par des nouvelles techniques d'édition du génome nucléaire telles que la technique des enzymes TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) ou la technique CRISPR/Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat / Caspase 9*). Ces techniques sont souvent plus utilisées comme approche thérapeutique comme nous le verrons dans la partie des thérapies.

II.3.2. La souris

La manipulation du génome mitochondrial de la souris étant impossible, les premiers modèles murins de pathologies mitochondriales ne concernaient que des mutations de l'ADN nucléaire. Ainsi, il existe par exemple un modèle murin *Ant1*^{-/-}. Ce modèle a permis de montrer que la déficience en transporteur mitochondrial ADP/ATP (gène nucléaire *ANT1*), conduisait à une myopathie, une cardiomyopathie hypertrophique et une acidose lactique. Ces signes cliniques sont retrouvés chez les personnes atteintes du syndrome de Sengers, causé par une mutation de ce même gène *ANT1*. Pour cette pathologie, la souris a permis de mettre en évidence des nouveaux gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale (Murdock *et al.*, 1999). Il existe d'autres modèles de souris pour d'autres pathologies mitochondriales causées par des mutations dans des gènes nucléaires (Wallace, 1999).

Afin d'obtenir des souris présentant des défauts de l'ADNmt, des subterfuges ont dû être trouvés. Une manière de procéder est de muter des gènes dont les produits sont impliqués dans la maintenance de cet ADNmt. A l'aide du système de recombinaison Cre/Lox, des souris *Tfam*^{+/-} ont pu être générées. Le gène *TFAM* est un gène nucléaire qui code pour un

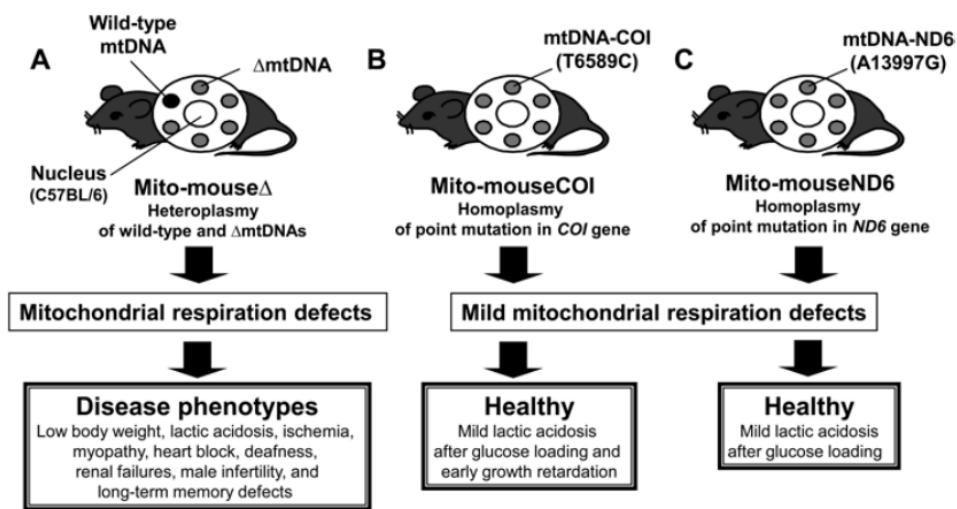


Figure 18 : Caractéristiques génétiques et cliniques des trois lignées « mito-mice ». A) La lignée Mito-mouse Δ porte une large délétion de l'ADNmt. B) La lignée Mito-mouseCOI porte une mutation de la cytochrome c oxydase I, une sous-unité du complexe IV. C) La lignée Mito-mouseND6 porte une mutation de la NADH deshydrogénase 6, une sous-unité du complexe I (d'après Nakada et Hayashi, 2011)

facteur de transcription mitochondrial impliqué dans la stabilité du génome mitochondrial. Chez les souris *Tfam*^{+/-}, les transcrits *Tfam* sont diminués de moitié, ce qui est corrélé à une diminution de 34% du nombre de copies d'ADNmt et 22% de la quantité de transcrits mitochondriaux. Ces souris sont donc utiles pour étudier les syndromes de délétion de l'ADNmt (Larsson, 1998). D'autres modèles, basés sur le même principe, ont été générés en mutant l'ADN polymérase γ (Trifunovic, 2004) ou l'hélicase Twinkle (Tynismaa, 2005).

En 2011, Nakada et Hayashi ont utilisé une méthode plutôt originale pour la mise en place de trois lignées de souris atteintes d'une pathologie mitochondriale. Dans un premier temps, ils ont sélectionné des cellules somatiques murines ayant une mutation ou délétion au niveau de l'ADNmt. Le cytoplasme de ces cellules est fusionné avec une cellule murine déplétée de son ADNmt (ρ^0). Ils ont ainsi généré trois lignées de cybrides : une première lignée avec une délétion large de l'ADNmt, une seconde lignée avec une mutation ponctuelle dans le gène COI codant pour la cytochrome c oxidase I (Complexe IV) et, enfin, une dernière lignée avec une mutation ponctuelle dans le gène ND6 codant pour une sous-unité du complexe I. Les cytoplasmes de cybrides enrichis en ADNmt mutés sont ensuite intégrés dans des embryons précoces par électrofusion. Les embryons ainsi générés sont implantés dans l'oviducte de souris porteuses. Les principales caractéristiques génétiques et cliniques sont données dans la figure 18 (Nakada & Hayashi, 2011). Ces souris ont permis l'étude des conséquences de ces mutations qui, chez l'Homme, sont associées avec le syndrome de Kearns-Sayre pour la délétion et une myopathie pour la mutation de la sous-unité du complexe IV.

Bien que la souris soit un très bon modèle, elle présente certaines limites pour l'étude de certaines pathologies mitochondriales. Par exemple, dans la neurohépatopathie de type Navajo causée par une mutation du gène *MPV17* est associée à une glomerulosclérose dans le modèle murin alors que l'Homme présente un tableau clinique hépatique.

II.3.3. La drosophile

La Drosophile et l'Homme, malgré une légère différence d'organisation, présentent une forte homologie au niveau de leur ADNmt. En effet, les deux génomes codent pour les mêmes produits de gènes, et de nombreux gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale sont conservés. Ces homologies de gènes aussi bien mitochondriales que nucléaires font de la drosophile un bon modèle d'étude des fonctions mitochondriales. De plus, la drosophile contient, en versions simplifiées, les organes qui sont généralement les plus affectés par ces pathologies mitochondriales comme le système nerveux, les muscles squelettiques et cardiaques, ce qui permet une étude multi-systémique des maladies mitochondriales.

Un moyen simple et très original de détecter les mouches présentant des défauts mitochondriaux est de soumettre les mouches à un choc mécanique, comme par exemple passer le tube dans lequel sont les drosophiles au vortex (une sorte de tremblement de terre !). Les mouches sauvages vont rapidement pouvoir se raccrocher à la paroi du tube et voler, alors que d'autres, dites « *bang-sensitive* », vont rester au fond du tube. Ce phénotype est souvent associé à des dysfonctionnements mitochondriaux, et se caractérise par des attaques cardiaques ou des crises d'épilepsies, similaires à celles observées chez les patients atteints des syndromes MERRF ou MELAS, ou encore atteints d'ataxie cérébelleuse (Sen & Cox, 2017).

Chez la drosophile, une approche très utilisée est celle de l'ARN interférence (ARNi). En effet, grâce à cette approche d'ARNi, couplée au système Gal4-UAS, le knockdown de différentes protéines des OXPHOS a pu être réalisé. Cependant, cette approche se limite à l'étude des mutations présentes au niveau des gènes nucléaires (Foriel *et al.*, 2015).

Générer des mutants de l'ADNmt reste très difficile. À ce jour, il n'existe que trois modèles drosophiles portant des mutations dans des gènes mitochondriaux : le premier, trouvé par hasard, porte une mutation dans le gène ATP6. Les deux autres, touchant les gènes COI (sous-unité du complexe IV) et ND2 (sous-unité du complexe I) ont été générés grâce à des enzymes de restriction (Sen & Cox, 2017). Cette technique consiste à adresser une enzyme de restriction à la mitochondrie, où elle va couper au niveau d'un site de restriction

unique situé au niveau du gène mitochondrial cible. Cette coupure entraîne la dégradation de la molécule d'ADNmt. Seules quelques copies, mutées au niveau de ce site de restriction, ne seront pas reconnues par l'enzyme, pas clivées, et donc, pas dégradées. Ainsi, les copies d'ADNmt mutées au niveau du gène d'intérêt, qui étaient minoritaires et sans effet, vont « coloniser » la mitochondrie qui devient homoplasmique mutée pour son ADNmt. Les drosophiles ainsi générées montrent une diminution de la synthèse d'ATP, des défauts neurologiques et musculaires. Mais ces mutations sont parfois silencieuses, et tous les gènes mitochondriaux ne possèdent pas de sites de restriction unique. Pour ces raisons, comme dit précédemment, seuls deux gènes ont donné des résultats (*COI* et *ND2*). Certaines équipes de recherche travaillent donc à mettre au point de nouvelles techniques, basées sur le même principe que les enzymes de restriction, pour pouvoir générer des coupures au niveau de sites beaucoup plus ciblés et variés.

Ils utilisent notamment des outils tels que les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) ou le système CRISPR/Cas9 (Sen & Cox, 2017). Cependant, à ce jour, les outils ne sont pas encore très performants. En effet, un certain nombre de limites retardent la mise au point de ces techniques pour l'ADNmt. L'une d'entre elle est la séquence cible. En effet, le gène mitochondrial muté et normal peuvent ne varier que d'une paire de base. Dans ce cas la reconnaissance différentielle de la séquence mutée ou non est très difficile.

II.3.4. Le nématode

Introduit dans les laboratoires dans les années 60 par Sydney Brenner, le nématode, et notamment *Caenorabditis elegans*, est beaucoup utilisé, notamment en biologie du développement (Rocheleau et al., 1997) et dans l'étude du système nerveux (Bargmann, 1993). Son génome entièrement séquencé indique que 83% des gènes codants pour une protéine ont un gène humain homologue (Lai et al., 2000). La chaîne respiratoire est très bien conservée et la composition protéique des sous-unités des complexes montre une très haute similarité entre l'Homme et le ver (Tsang & Lemire, 2003 # Rea et al., 2010). Pour ces raisons, ce modèle est aussi très largement utilisé pour l'étude des maladies mitochondriales (Maglioni & Ventura, 2016). Ce modèle présente aussi l'avantage d'être facile et peu coûteux à élever, d'avoir un cycle de vie relativement court et une progéniture nombreuse. Les

nématodes sont majoritairement hermaphrodites, ce qui permet d'obtenir des lignées parfaitement isogéniques. Cependant, la présence de quelques mâles permet, par croisements, de réaliser certains changements génétiques. Le nématode a par ailleurs l'avantage de posséder des tissus bien différenciés restant simplifiés par rapport aux mammifères, puisque le nématode est formé de moins de 1 000 cellules. L'un des atouts majeurs de ce ver est que l'on peut très facilement éteindre l'expression d'une protéine par ARNi (Fire *et al.*, 1998). Pour cela, il suffit de le nourrir avec des bactéries contenant des ARNi contre l'ARNm de la protéine d'intérêt. L'ARNi passe très facilement du système digestif aux cellules. Cette propriété a été utilisée pour rechercher des gènes impliqués dans l'augmentation de la durée de vie des vers. De façon surprenante, plusieurs des gènes trouvés codent pour des protéines mitochondriales ! Une hypothèse, pour expliquer cela, est qu'un défaut modéré de la chaîne respiratoire entraîne une légère augmentation des ROS qui, à son tour, va induire des réponses compensatoires (modification du métabolisme, induction d'une « Unfolded Protein Response » mitochondriale, mécanismes de réparations...) qui ont un effet bénéfique sur l'espérance de vie. Cette augmentation de l'espérance de vie est corrélée à un ralentissement du développement, une taille réduite à l'âge adulte et une diminution de la fertilité. Mais dans le cas où le dysfonctionnement mitochondrial dépasse un certain seuil, les conséquences deviennent délétères : espérance de vie diminuée, stérilité, arrêt de développement au stade larvaire. L'une des grandes leçons à retenir de *C. elegans* est l'effet bénéfique sur l'espérance de vie lors d'une diminution mesurée de la fonction mitochondriale! (Ventura & Rea 2007 # Dancy *et al.*, 2014).

En plus de l'implication de la mitochondrie dans le vieillissement, le modèle *C. elegans* est un organisme très utilisé pour étudier d'autres défauts mitochondriaux tels les maladies de déplétion de l'ADNmt qui sont les conséquences de défauts au niveau de la maintenance de l'ADNmt. Récemment, ce modèle a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans ces processus (Addo *et al.*, 2010).

II.3.5. La levure

Nous nous intéresserons essentiellement à la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* qui a permis un grand nombre d'études génétiques et biochimiques capitales dans notre compréhension de la mitochondrie, notamment sa composition, sa régulation ou encore ses fonctions. On pourrait penser que la levure, qui est un organisme unicellulaire ne possédant qu'environ 6000 gènes, alors que l'Homme en aurait environ 25 000, n'est pas l'organisme le plus adapté pour modéliser des pathologies humaines. En réalité, il existe une forte conservation des processus cellulaires entre les levures et les eucaryotes supérieurs. Ainsi, au moins 1 200 gènes de levure ont un orthologue chez l'Homme. La levure possède encore bien d'autres avantages qui en font un bon modèle d'étude.

Bien que la levure soit phylogénétiquement assez éloignée de l'humain, un certain nombre de processus cellulaires essentiels ont été conservés au cours de l'évolution : réplication et réparation de l'ADN, transcription et traduction, trafic intracellulaire, certaines voies métaboliques. C'est tout particulièrement le cas de la biogénèse mitochondriale (Barrientos, 2003). Ainsi, sur les ≈150 gènes nucléaires associés à des maladies mitochondriales humaines, 70% sont conservés chez la levure. Pour exemple, récemment, des mutations du gène *PPA2*, codant pour une pyrophosphatase mitochondriale (enzyme qui hydrolyse le pyrophosphate inorganique en deux phosphates) ont été associées à des morts subites du nourrisson. Afin de mieux comprendre l'impact de ces mutations, les versions sauvages et mutées du gène *PPA2* humain ont été exprimées dans une levure sans le gène *PPA2* endogène. Alors que la version humaine sauvage est capable de restaurer la croissance du mutant, les versions humaines mutées en sont incapables et conduisent à un défaut de potentiel membranaire mitochondrial ainsi qu'à une diminution du nombre de mitochondries (Guimier *et al.*, 2016). Cet exemple, pris parmi tant d'autres, illustre la pertinence de la levure utilisée pour la modélisation de pathologies mitochondriales.

Par ailleurs, la levure présente de nombreuses autres qualités : sa culture en laboratoire est simple et peut se faire dans de nombreuses conditions différentes. Son temps de génération est court et permet donc d'obtenir une quantité de matériel biologique assez importante dans des délais rapides. Son cycle haplodiplobiontique permet des études

généétiques, et la création de mutants est aisée grâce à sa forte capacité de recombinaison homologue.

Mais cinq autres principales qualités en font un modèle particulièrement puissant pour l'étude des maladies mitochondriales.

Premièrement, dans les années 1950, Boris Ephrussi et Piotr Slonimski ont montré que des levures présentant des défauts au niveau d'un « facteur ρ », qui a été identifié plus tard comme étant l'ADNmt, pouvaient tout de même croître en conditions strictement fermentaires (Ephrussi & Slonimski, 1955). Ainsi, des souches de levures mutantes ayant un défaut de croissance respiratoire peuvent être cultivées aisément en milieu fermentaire afin d'obtenir une quantité de biomasse suffisante pour leur étude.

Deuxièmement, l'ADNmt de *S. cerevisiae* est majoritairement homoplasmique. Cette caractéristique, encore mal expliquée aujourd'hui, serait probablement liée au mode de division par bourgeonnement (Nunnari *et al.*, 1997 # Okamoto *et al.*, 1998). Ainsi, si l'on croise deux cellules haploïdes avec des génomes mitochondriaux différents, en une dizaine de générations, les cellules filles auront des génomes mitochondriaux homoplasmiques, suggérant une ségrégation non aléatoire de l'ADNmt chez la levure. Cette caractéristique très intéressante permet de se débarrasser de l'effet seuil qui conduit à une grande variabilité des phénotypes et « complexifie » le lien génotype/phénotype. Ainsi, il est plus facile d'étudier les conséquences d'une mutation de l'ADNmt chez la levure que chez d'autres organismes modèles.

Troisièmement, le génome mitochondrial de la levure est bien connu et bien annoté. Par ailleurs, grâce à la technique de biolistique, le génome mitochondrial de levure est le seul (excepté *Chlamydomonas*) qui soit modifiable artificiellement et de façon bien ciblée. Cette technique a été mise au point par N. Bonnefoy et T. Fox (Bonnefoy & Fox, 2007). Elle consiste à bombarder des mitochondries avec des billes d'or ou de tungstène recouvertes d'un plasmide contenant le gène d'intérêt muté et flanqué de régions d'ADNmt. Ainsi, lorsqu'une bille entre dans la mitochondrie, ce gène va être intégré dans l'ADNmt par recombinaison homologue. Puis, du fait de l'incapacité de la levure à maintenir une hétéroplasmie, cette mutation va devenir homoplasmique dans certaines cellules filles au bout de seulement quelques mitoses. Cette technique est particulièrement efficace chez la levure grâce à sa

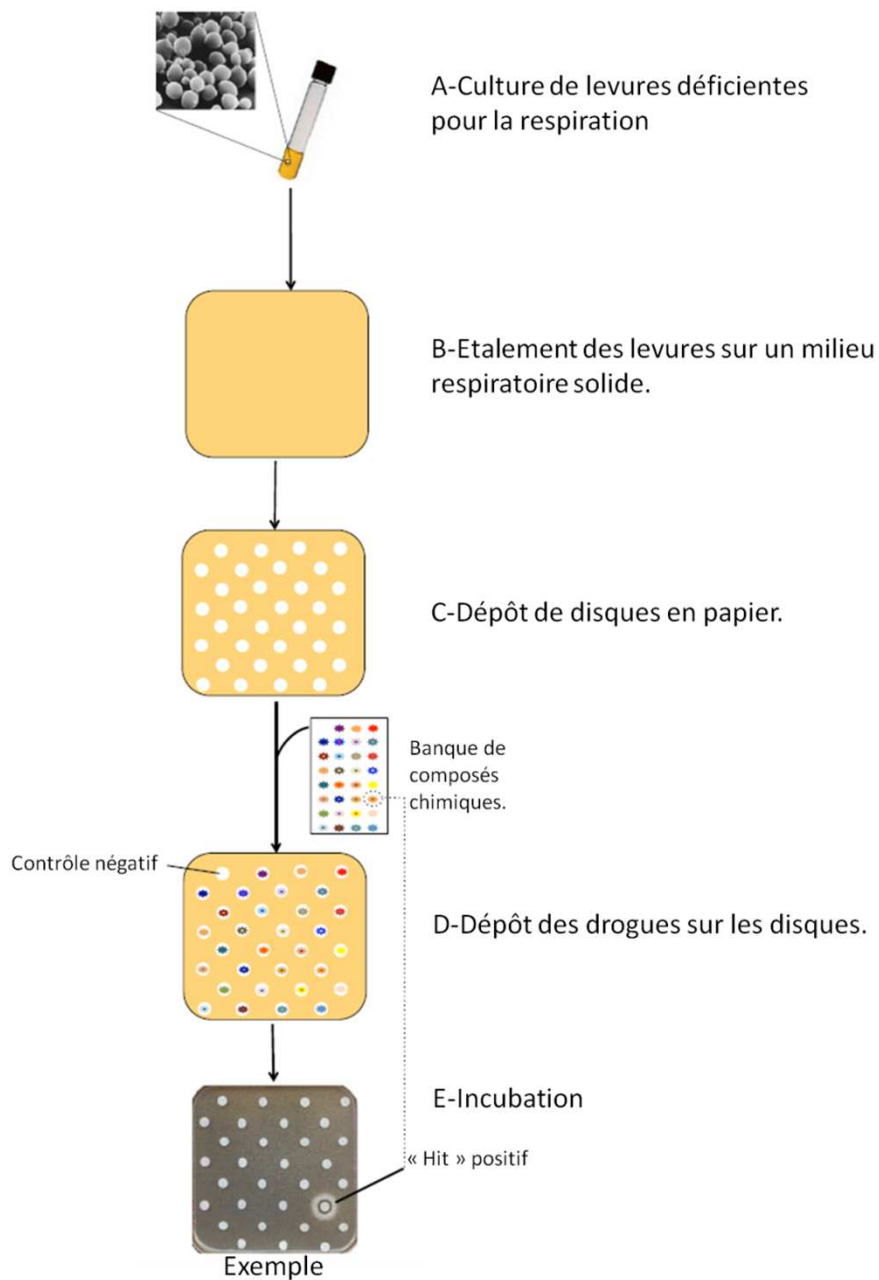


Fig. 19 : Méthode de criblage pour identifier des molécules actives contre des déficiences mitochondriales chez la levure. A-Un modèle levure d'une maladie mitochondriale, présentant une déficience respiratoire, est mis en culture en milieu fermentaire. B-Dans un second temps, les levures sont étalées sur un milieu respiratoire solide, de telle façon que les levures ne puissent que très peu croître. C-Des disques stériles en papier sont placés sur le milieu. D-Des composés chimiques, provenant de chimiothèques, sont déposés sur ces disques. E-Les boîtes sont alors mises à incuber pour plusieurs jours. Les drogues actives, améliorant les fonctions mitochondriales des levures, permettent l'apparition d'un halo de croissance autour du disque correspondant.

capacité à croître malgré une délétion totale (ρ^0) ou partielle (ρ^-) de l'ADNmt comme évoqué précédemment (Bonney & Fox, 2007). Cette technique a ainsi permis de recréer des mutations pathologiques au niveau des complexes III, IV et V et au niveau des ARNt-mt pour en comprendre les conséquences fonctionnelles (Lasserre *et al.*, 2015).

Quatrièmement, le génome nucléaire de la levure a été complètement séquencé dès 1996 grâce au projet *European Yeast Genome Sequencing Network* (EYGSN). Ce génome, réparti en 16 chromosomes, est donc maintenant très bien connu et très bien annoté. Ces connaissances combinées à la forte capacité de recombinaison de l'ADN ont permis de générer de nombreux mutants de gènes nucléaires impliqués dans les fonctions mitochondriales. Ces mutants ont ainsi permis d'étudier la fonction de certains gènes, et les conséquences de leur altération, dans de nombreux processus : OXPHOS, maintenance du génome mitochondrial, transport de protéines ou de métabolites, dynamique mitochondriale, contrôle qualité des protéines mitochondriales, synthèse et remodelage des cardiolipines...(Lasserre *et al.*, 2015).

Cinquièmement, de nombreux outils utilisant la levure ont été développés, notamment une méthode de criblage de drogues qui permet, de façon simple, de tester un grand nombre de molécules (Fig. 19). Concrètement, cette méthode consiste à étaler, à l'aide de billes en verre stériles, une souche de levure modélisant une pathologie mitochondriale qui présente des défauts de croissance respiratoire. Cet étalement se fait sur un milieu solide respiratoire contenant généralement du glycérol ou de l'éthanol comme substrat. Les levures, ayant un défaut respiratoire, ne poussent donc pas ou peu. Dans un second temps, des petits disques de papier stériles sont répartis sur la boîte et des drogues, provenant de chimiothèques telles la chimiothèque de Prestwick (www.prestwickchemical.com) ou Tebu bio (www.tebu-bio.com), sont déposées individuellement sur chacun des disques. Ces différentes molécules étant solubilisées généralement dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), celui-ci sert donc généralement de contrôle négatif. Dans le cas où des composés chimiques sont déjà connus pour restaurer la croissance des mutants, ils sont utilisés comme contrôles positifs. Une fois déposées sur les disques, les drogues vont diffuser dans le milieu solide selon un gradient de concentration, très concentré à proximité du disque et de plus en plus dilué à mesure que l'on s'éloigne de ce disque. Cela permet donc, en un seul dépôt, de tester une multitude de concentrations différentes. Les boîtes sont alors mises à incuber pendant

plusieurs jours, généralement à 30°C. Dans le cas de mutants thermosensibles, l'incubation peut se faire à des températures supérieures ou inférieures. Lorsqu'une molécule est efficace, elle va permettre de restaurer la croissance respiratoire de la levure, et un halo de croissance augmentée va apparaître autour du disque correspondant. A proximité du disque, la concentration de la drogue peut être trop forte et induire une toxicité, ce qui va se traduire par un halo de non-croissance, ou « halo de toxicité ». Inversement, à distance du disque, si la concentration est trop faible, la drogue ne sera pas efficace et ne restaurera pas la croissance non plus. La levure est donc aussi un bon modèle pour la recherche de molécules thérapeutiques (Couplan *et al.*, 2011). Les molécules utilisées peuvent déjà posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou être déjà en cours d'essais cliniques, comme c'est le cas pour les molécules des chimiothèques Prestwick et Tebu bio, permettant alors un repositionnement thérapeutique.

Comme tout modèle, la levure présente aussi des limites, notamment l'absence d'un véritable complexe I de la chaîne respiratoire. Cependant, ce qui peut parfois être présenté comme un désavantage, peut se révéler être, en fait, un atout très précieux. En effet, ce défaut, c'est-à-dire l'absence de complexe I chez la levure *S. cerevisiae*, représente une chance puisque la comparaison des génomes des souches de levures *S. cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica* (levure possédant un complexe I) a largement facilité la recherche de nouveaux facteurs d'assemblages de ce complexe (Lasserre *et al.*, 2015). Par ailleurs, la levure reste un organisme unicellulaire et ne permet pas de comprendre l'impact de mutations sur des tissus différenciés, comme d'autres modèles pluricellulaires peuvent le permettre.

II.3.6. Conclusion

Comme nous l'avons vu, les différents modèles utilisés présentent des avantages mais aussi des inconvénients. Une façon de dépasser les limites de chaque modèle est de réaliser des études en ayant plusieurs modèles. Par exemple, la combinaison des modèles *S. cerevisiae*, *C. elegans* et les fibroblastes de patients portant des mutations au niveau du gène

POLG a permis l'identification du clofilium tosylate comme potentiel traitement de pathologie associée à l'ADN polymérase gamma (Pitayu *et al.*, 2016).

II.4. Traitement des maladies mitochondriales

II.4.1. Peu de traitements disponibles

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour les maladies mitochondriales, à l'exception du coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀), utilisé pour traiter des déficiences primaires en ce coenzyme. Malgré un grand nombre de molécules testées en essais cliniques, aucune n'a montré d'effet réellement statistique (Pfeffer *et al.*, 2012). Par exemple, il semblerait qu'il existe un effet bénéfique de l'idébénone, un analogue du CoQ₁₀, pour des patients du syndrome LHON, mais cet effet est encore débattu.

II.4.2. Thérapie génique

En parallèle des recherches des traitements pharmacologiques, plusieurs groupes travaillent au développement de stratégies de thérapie génique. Dans le cas des maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNn, comme les mutations sont souvent récessives, l'introduction d'une seule copie fonctionnelle du gène pourrait être bénéfique. Par exemple, des tests de réintroduction virale du gène *ANT1* chez des souris *Ant1*^{-/-} semblent assez prometteurs (Flierl *et al.*, 2005 # Wallace *et al.*, 2010). En effet, cette transduction rehausse la quantité de la protéine *ANT1* dans les muscles permettant ainsi une augmentation de la quantité d'ATP. De plus, les défauts histologiques sont corrigés.

Le cas des maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt est plus complexe car le génome mitochondrial est difficile à modifier non seulement à cause de l'accessibilité de cet ADNmt (il est enfermé dans la mitochondrie !) mais aussi du fait que chaque gène soit présent en plusieurs centaines voire milliers de copies. Cependant, malgré ces difficultés, plusieurs approches sont explorées. Les approches étant très nombreuses et

diverses, nous ne citerons que quelques-unes d'entre elles. Une vision plus exhaustive de ces stratégies est présentée dans les revues de Wallace *et al.* en 2010 (Wallace *et al.*, 2010), et de Tonin et Entelis en 2014 (Tonin & Entelis, 2014). Ces approches sont :

- la plupart des maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt ne s'expriment qu'au-delà d'un seuil d'hétéroplasmie. La perte de quelques molécules d'ADNmt mutées pourrait donc permettre de repasser sous ce seuil et donc de retrouver un phénotype « sain ». La dégradation de ces molécules d'ADNmt pourrait se faire par clivage de ces molécules par des endonucléases de restriction (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2005) mais aussi par des systèmes d'édition du génome tels que les TALEN (Bacman *et al.*, 2013) ou encore le système CRISPR/Cas9 (Jo *et al.*, 2015).
- une autre possibilité serait de réintroduire une version sauvage du gène muté. Comme il est difficile d'atteindre le génome mitochondrial, des chercheurs travaillent à intégrer ces gènes mitochondriaux au niveau de l'ADNn. Mais cela nécessite des modifications du gène du fait des variabilités du code génétique des deux génomes, mais aussi l'ajout d'une séquence d'adressage à la mitochondrie. Mais les protéines codées par l'ADNmt sont souvent très hydrophobes, rendant leur import depuis le cytosol vers la mitochondrie très difficile. Pour ces raisons, à ce jour, la relocalisation des gènes mitochondriaux reste compliquée. Cependant, elle a été réussie pour le gène ATP8 dans des cellules de mammifères (Oca-Cossio *et al.*, 2003) mais a échoué pour d'autres gènes mitochondriaux tel que ND4 et CYTB. Pour contourner les problèmes d'import, l'ARNm de la protéine peut aussi être adressé à la surface de la mitochondrie. Ainsi, dans des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de LHON, Bonnet *et al.* ont réussi à corriger les défauts de ces cellules en culture par cette stratégie (Bonnet *et al.*, 2008). Ces résultats sont très encourageants mais, à notre connaissance, leur application chez l'Homme n'a pas encore été réalisée...
- De nombreuses maladies mitochondriales sont dues à des mutations dans des gènes mitochondriaux codants pour des ARNt. De manière un peu méconnue, il existerait des systèmes d'import d'ARNt (Rubio *et al.*, 2008). Une nouvelle stratégie serait donc d'utiliser ces systèmes d'import pour réintroduire dans la mitochondrie un ARNt sauvage. Cette méthode a été utilisée pour l'ARNt^{Lys} sur des cybrides provenant de

FIV À TROIS PARENTS

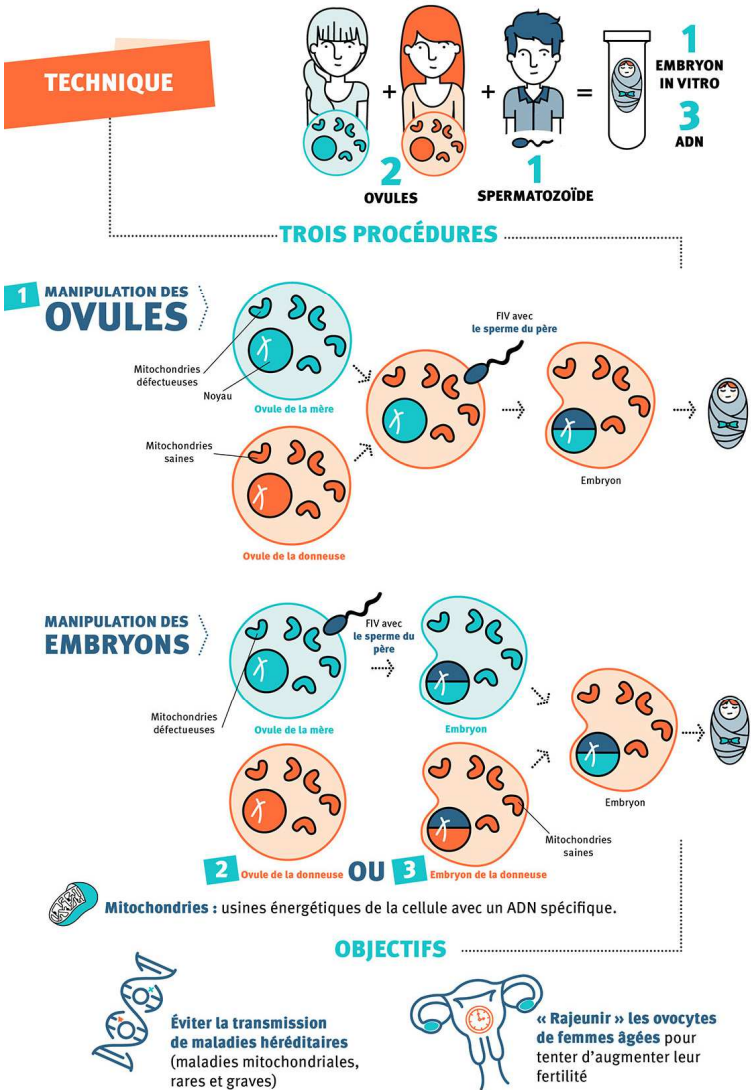


Figure 20 : La technique de fécondation *in vitro* à « trois parents ». La fécondation *in vitro* à trois parents peut être réalisée selon deux approches. La première consiste à énucléer un ovule de donneuse et d’y insérer le noyau de la mère. La fécondation par le spermatozoïde du père est effectuée dans un second temps. La seconde approche consiste à féconder d’abord les ovocytes de la porteuse et de la mère avec les spermatozoïdes du père, d’enlever de pronucléus du zygote de la donneuse et d’y micro-injecter celui de la mère. (www.fondationlejeune.org)

fibroblastes de patients atteints du syndrome de MERRF. Elle a permis un rescue partiel des fonctions mitochondriales (Kolesnikova *et al.*, 2004).

II.4.3. Prise en charge des symptômes des patients

Bien que les résultats de ces stratégies soient très encourageants, ces différentes pistes thérapeutiques sont loin d'être applicables à l'Homme, et de fait, la prise en charge des patients passe, pour le moment, essentiellement par des traitements symptomatiques. Par exemple, des régimes cétogènes, c'est-à-dire enrichis en lipides et appauvris en glucides, sont souvent recommandés en cas de déficiences en complexes I (Chaussonot *et al.*, 2011). On peut aussi citer les complémentations en vitamines C et E ou en cystéine (précurseur du glutathion), qui sont censées diminuer les ROS, un signe courant des maladies mitochondriales. L'acidose lactique est un autre signe de maladie mitochondriale très présent qui peut être corrigé par le dichloroacétate (DCA). Cette molécule stimule la pyruvate déshydrogénase, et favorise la formation d'acétyl CoA à partir de pyruvate, au dépend de la formation d'acide lactique par la lactate déshydrogénase. Le DCA diminue donc efficacement l'acidose chez certains patients atteints de maladies mitochondriales, mais ne peut être utilisé qu'exceptionnellement du fait de sa toxicité (El Hattab *et al.*, 2017).

II.4.4. Fécondation *in vitro* à « trois parents »

Suite aux travaux de l'équipe de Douglass Turnbull, à l'université de Newcastle, montrant la possibilité de transférer un pronucléus dans un zygote porteur de mitochondries saines et énucléé (Craven *et al.*, 2010), des techniques de fécondation *in vitro* (FIV) ont été élaborées pour contourner le problème des maladies mitochondriales causées par des mutations de l'ADNmt (Fig. 20). En effet, un couple, dont la femme est porteuse d'une mutation mitochondriale causant un syndrome de Leigh, a déjà eu recours à cette technique de « FIV trois parents », donnant naissance à un petit garçon en 2016. Depuis, d'autres naissances par cette technique ont eu lieu. Mais le manque de recul sur la « FIV trois parents »

pose de nombreuses questions techniques, notamment sur les conséquences délétères possibles d'une triple origine génétique de l'enfant. Cette technique soulève aussi de nombreuses questions éthiques : n'est-ce pas une porte ouverte à une forme d'eugénisme ? Quel sera le statut des mères porteuses ?...A ce jour, seul le Royaume-Uni a autorisé le recours à cette pratique.

Le traitement des patients souffrant de maladies mitochondriales est donc encore très difficile et doit être adapté à chaque cas. De plus, les maladies mitochondriales peuvent engendrer des intolérances à certains médicaments tels que l'aspirine, rendant le suivi médical de ces patients particulièrement complexe (Chaussonot & Paquis-Flucklinger, 2012).

CHAPITRE III : Le syndrome de Barth

Sommaire

III.1. Historique	58
III.2. Epidémiologie	58
III.3. Description clinique de la maladie	59
III.4. Conséquences à l'échelle cellulaire.....	60
III.4.1. TAZ et tafazzine	60
III.4.1.1. Quelle est la fonction de la protéine ?	60
III.4.1.2. Plusieurs isoformes de la tafazzine	60
III.4.1.3. Localisation cellulaire de la tafazzine	61
III.4.1.4. Complexes protéiques impliquant la tafazzine	61
III.4.2. Les cardiolipines (CL)	63
III.4.2.1. Structure des cardiolipines.....	63
- Description de la cardiolipine	
- Variabilité de la composition en chaînes acyles	
III.4.2.2. Synthèse des cardiolipines	64
III.4.2.3. Remodelage des cardiolipines.....	65
- Mécanisme	
- Comment expliquer les spécificités des chaînes acyles	
III.4.2.4. Dégradation des cardiolipines.....	70
III.4.2.5. Fonctions des cardiolipines	70
- Cardiolipines et structure mitochondriale	
✓ Formation des crêtes mitochondriales	
✓ Sites de contacts	
- Cardiolipines et oxydations phosphorylantes	
✓ CL et supercomplexes de la chaîne respiratoire	
✓ CL et le transporteur ADP/ATP	
✓ CL et le transporteur Pi/H ⁺	
✓ CL et ATP synthase (complexe V)	
- Cardiolipines et dynamique mitochondriale	
✓ La fusion	
✓ La fission	
- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales	
✓ CL et homéostasie du Fer	
✓ CL et mitophagie	
✓ CL et apoptose	
III.5. Modèles d'études du syndrome de Barth.....	87
III.5.1. Les cellules « <i>human induced Pluripotent Cells</i> »	87
III.5.2. Modélisation chez la souris	89
III.5.3. Modélisation chez la drosophile.....	90
III.5.4. Modélisation chez le poisson zèbre	90
III.5.5. Modélisation chez le nématode	91
III.5.6. Modélisation chez la levure.....	91
III.5.7. Conclusion	92
III.6. Approches thérapeutiques du syndrome de Barth.....	92

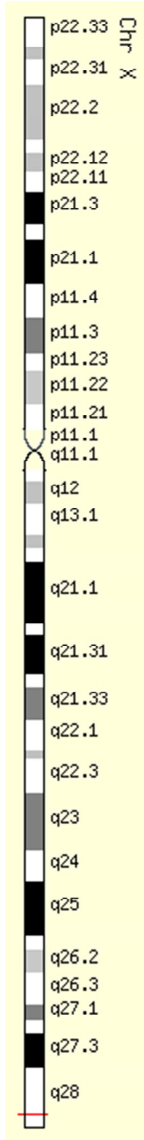


Figure 21 : Localisation chromosomique du gène *TAZ*. Le gène *TAZ* est localisé sur le bras long du chromosome X, dans la région 28. (d'après www.genecards.org).

III.1. Historique

En 1983, Peter G. Barth a rapporté plusieurs cas de garçons, d'une même famille allemande, présentant des cardiomyopathies dilatées, des neutropénies et des myopathies squelettiques (Barth, 1983). Ces défauts cliniques ont été corrélés à des septicémies et à des décompensations cardiaques qui, en l'absence de traitement, pouvaient conduire à la mort dès la petite enfance ou très tôt durant l'adolescence. Les premières analyses sur des mitochondries issues des cellules du muscle cardiaque et des neutrophiles montraient des anomalies structurales au niveau de cet organe. Dans une moindre mesure, ces défauts étaient aussi présents au niveau des mitochondries des cellules musculaires. Les analyses biochimiques montraient, en outre, des défauts au niveau de la chaîne respiratoire. Un autre cas, similaire à ceux-ci, avait déjà été rapporté en 1979 par Neustein (Neustein *et al.*, 1979), mais la postérité a conservé le nom de « Barth » pour cette pathologie. La maladie ne se transmettant qu'aux garçons, le Pr Barth a aussitôt associé ces défauts au chromosome X. La localisation du locus impliqué a ensuite été affinée, et en 1996 le gène G4.5, situé dans la région Xq28 du chromosome X, a été mis en cause (Fig. 21) (Bione *et al.*, 1996). La fonction du produit de ce gène n'était pas encore connue à cette époque. En raison de la complexité à identifier la fonction de cette protéine, cette dernière a été baptisée « tafazzine », du nom d'un personnage comique de série télévisée italienne nommé « Tafazzi ». Aujourd'hui, la base de données de la fondation du Syndrome de Barth recense environ 150 mutations ponctuelles différentes du gène *TAZ* retrouvées chez les patients, dont de nombreuses mutations non-sens, des décalages du cadre de lecture, des mutations au niveau de sites d'épissage et 36 mutations faux-sens (www.barthsyndrome.org et Claypool & Koehler, 2012).

III.2. Epidémiologie

Du fait du mode de transmission *via* le chromosome X, le syndrome de Barth (BTHS) touche presque exclusivement les garçons. Cependant, le cas d'une jeune fille atteinte du syndrome de Barth a été décrit (Cosson *et al.*, 2012). Le diagnostic du BTHS ne doit donc pas être entièrement écarté chez les patientes.

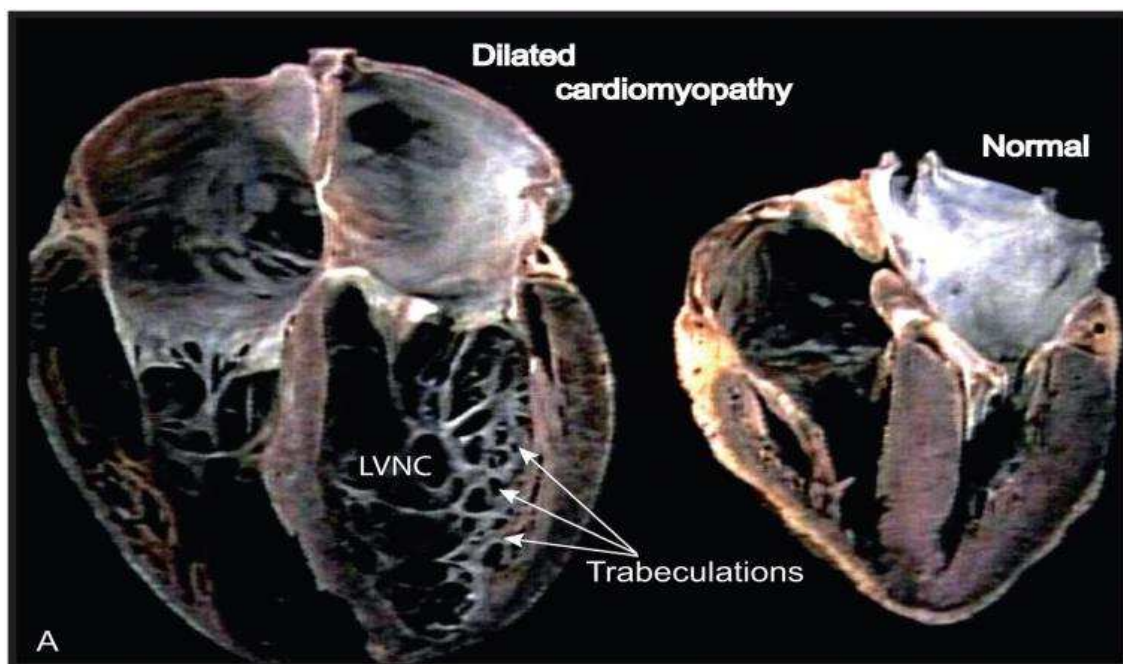


Figure 22 : Cœur d'une personne atteinte du syndrome de Barth et cœur d'une personne saine Le cœur du patient présente une cardiomyopathie dilatée avec une non-compaction du ventricule gauche. La présence de trabéculations (i.e. des structures tissulaires qui forment des prolongements à l'intérieur de la cavité du ventricule) est aussi caractéristique des cœurs de patients. (d'après Saric *et al.*, 2016)

La prévalence du BTHS est estimée autour de 1 personne atteinte sur 454 000. Son incidence, probablement sous-estimée, est assez variable selon les pays : 1 nouveau cas sur 140 000 naissances en Angleterre et entre 1 sur 300 000 à 400 000 aux USA (www.orpha.net). En 2016, 22 cas de BTHS étaient connus en France, dont seulement 11 encore en vie (Association du syndrome de Barth-France, www.syndromedebarth.fr). Le BTHS est donc considéré comme une maladie très rare.

III.3. Description clinique de la maladie

Comme pour beaucoup de maladies mitochondriales, le tableau clinique est variable d'un patient à l'autre, mais certains symptômes du BTHS sont assez récurrents :

- La cardiomyopathie dilatée, qui s'accompagne, chez 50% des patients, d'une non compaction du ventricule gauche (*i.e.* présence de trabéculations dans le ventricule gauche) (Fig. 22). Cette cardiomyopathie provoque une diminution de la force de contraction du muscle cardiaque entraînant une diminution du débit cardiaque. Cela peut se traduire notamment par un essoufflement, une fatigue anormale, un œdème des membres inférieurs. Ces défauts peuvent s'installer *in utero* et conduire à la mort du fœtus. Les patients doivent bénéficier d'un suivi cardiaque régulier pour surveiller l'apparition d'insuffisances cardiaques et peuvent bénéficier, selon le cas, de défibrillateurs internes ou de transplantations ;
- La myopathie squelettique, qui se traduit par un retard des acquisitions motrices et une intolérance à l'effort ;
- La neutropénie, qui est présente chez 90% des patients, se traduit par une diminution, plus ou moins drastique selon les patients, du nombre de granulocytes neutrophiles. Ce défaut du système immunitaire rend les patients du BTHS très sensibles aux infections bactériennes. Pour cette raison, ils bénéficient donc non seulement d'une antibiothérapie prophylactique mais aussi d'une administration de facteurs de croissance des granulocytes.

D'autres symptômes, pas systématiquement retrouvés chez les patients, peuvent survenir. C'est le cas de l'acidose lactique (qui est assez caractéristique des maladies mitochondriales, voir II.2.1. Les signes cliniques), mais aussi le retard de croissance durant

l'enfance et l'adolescence rattrapé à l'âge adulte, ou encore l'acidurie due notamment à l'augmentation de l'acide 3-méthylglutaconique présent dans les urines. Plus anecdotiquement, on peut retrouver des pertes d'appétit et/ou de goût, une dysmorphie faciale et une diminution de la performance mathématique (Donadieu *et al.*, 2014).

III.4. Conséquences à l'échelle cellulaire

III.4.1. TAZ et Tafazzine

III.4.1.1. Quelle est la fonction de la protéine ?

L'implication du gène *TAZ* dans le BTHS a été montrée en 1996 par Bione *et al.* (Bione *et al.*, 1996). A cette époque, la fonction de la tafazzine (TAZ), protéine de 292 acides aminés, était encore inconnue. En 1997, Neuwald, par alignement de séquence, avait suggéré que cette protéine appartenait à la superfamille des acyltransférases (Neuwald, 1997). En 2000, Peter Vreken a montré que la tafazzine jouait un rôle dans l'incorporation d'acides gras spécifiquement au niveau des cardiolipines (CL). Cette fonction est cohérente avec la diminution du pool de CL consécutive à la diminution de l'incorporation de chaînes acyles linoléiques (C18:2) et l'augmentation des monoLysoCardioLipines (MLCL) observées dans les cellules de patients du BTHS (Vreken *et al.*, 2000). Par homologie de séquence, Testet *et al.* ont montré que la levure possédait une protéine homologue à la protéine humaine TAZ. La protéine de levure de 381 acides aminés (Testet *et al.*, 2005) nommée Taz1p est codée par le gène YPR140W (gène *TAZ1*). L'analyse fonctionnelle a ensuite permis de confirmer la fonction acyltransférase ainsi que la localisation mitochondriale de la protéine Taz1p. La fonction acyltransférase de la tafazzine au niveau des cardiolipines est maintenant bien décrite (Schlame, 2013).

III.4.1.2. Plusieurs isoformes de la tafazzine

Chez l'Homme, grâce notamment à un épissage alternatif des exons 5 et/ou 7 (sur 11 exons au total) et la présence de codons d'initiations séparés, il existe théoriquement 16 isoformes de la tafazzine. À ce jour, seulement 9 isoformes sont référencées sur le lien suivant : www.uniprot.org (Hauff & Hatch, 2006). L'isoforme délétée pour l'exon 5 est la

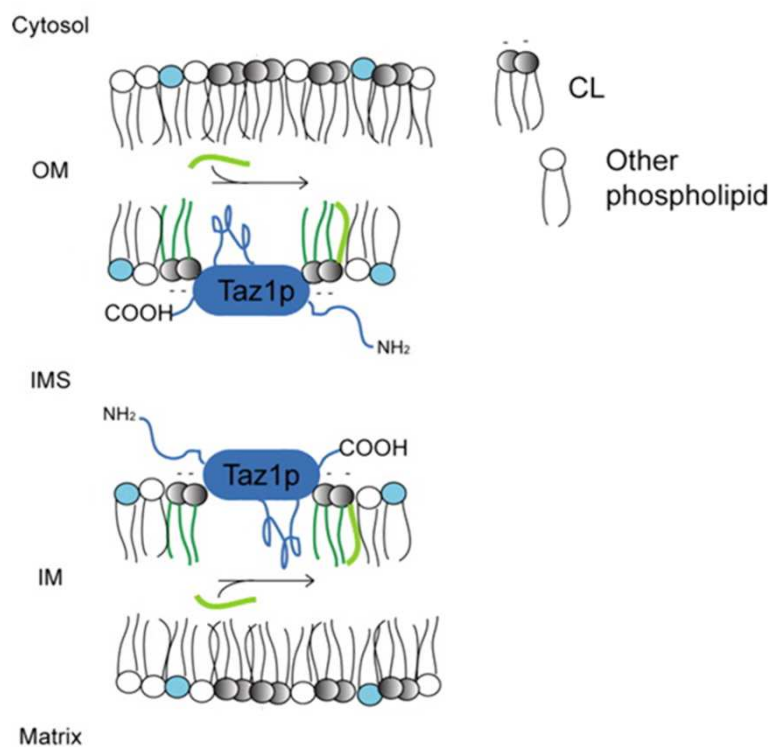


Figure 23 : Localisation de la protéine Taz1p chez *Saccharomyces cerevisiae*. Taz1p s'associe aux membranes mitochondriales internes ou externes, au niveau des feuillets faisant face à l'espace intermembranaire. L'ancrage se fait par une boucle « Transmembrane like ». Là, Taz1 peut transférer des chaînes acyles (vert clair) aux MLCM (gris), formant des CL. (d'après Claypool *et al.* 2006)

forme majoritaire. C'est aussi la seule isoforme capable de compléter l'absence du gène *TAZ1* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Vaz *et al.*, 2003). Comme l'Homme, d'autres organismes eucaryotes supérieurs (drosophile, primates, souris...) possèdent plusieurs isoformes alors que la levure n'en possède qu'une seule. L'intérêt d'exprimer plusieurs isoformes n'est pas encore compris. Quelle(s) est(sont) donc leur(s) fonction(s) ? A ce jour, cette question reste largement sans réponse.

En plus de ses multiples isoformes, l'Homme possède trois autres enzymes capables de ré-acétyler des monolysocardiolipines (MLCL) : l'acyl CoA lysocardiolipine acyltransférase (ALCAT), la monolysocardiolipine acyltransférase (MLCLAT) et une sous-unité de la protéine trifonctionnelle TFP, dont les fonctions seront décrites plus en détail ultérieurement (III.4.2.3. Remodelage des cardiolipines).

III.4.1.3. Localisation cellulaire de la tafazzine

Grâce à une étude chez la levure *S. cerevisiae*, par une approche de digestion à la protéinase K, Claypool *et al.* ont démontré que la protéine de levure Taz1p est principalement localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne (Claypool *et al.*, 2006). Cette localisation est cohérente avec l'enrichissement de cette membrane en CL. Il a aussi été montré que la protéine est aussi localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe. Dans les deux cas, la protéine fait face à l'espace inter-membranaire (EIM) (Fig. 23). En modélisant des mutations retrouvées chez des patients, il a été montré que la protéine s'ancre aux membranes grâce à une boucle située vers les résidus 215-232 qui s'insère dans les membranes. (Claypool *et al.*, 2006).

III.4.1.4. Complexes protéiques impliquant tafazzine

Claypool *et al.* (Claypool *et al.*, 2006) ont par ailleurs montré, chez la levure *S. cerevisiae*, que la protéine Taz1p ne peut pas s'homodimériser. En revanche, elle s'associe à d'autres protéines pour former au moins deux types de complexes distincts.

Le premier type de complexe, d'environ 600 kDa, contient notamment, en plus de la tafazzine, le complexe de l'ATP synthase (complexe V). La dimérisation de l'ATP synthase est connue pour intervenir dans la courbure des crêtes mitochondriales (Paumard *et al.*, 2002). Il a été décrit que la perte de cette dimérisation induit une déstabilisation des crêtes. Ce défaut morphologique des crêtes est aussi retrouvé chez les patients du BTHS. On peut donc supposer que la présence de l'ATP synthase et de la protéine Taz1p dans un même complexe soit importante pour la morphologie mitochondriale.

Le second type, plus variable en taille, représente des complexes allant de 300 à 500 kDa environ. Ces complexes protéiques contiennent notamment la protéine Aac2p (ADP/ATP Carrier 2, homologue de la protéine humaine ANT1), qui assure l'échange d'un ADP cytosolique contre un ATP synthétisé dans la mitochondrie. Il est bien connu que les CL sont nécessaires pour le bon fonctionnement de ce transporteur (Hoffmann *et al.*, 1994). L'intégrité des CL étant dépendante de la tafazzine, il n'est pas surprenant de retrouver les protéines Taz1p et Aac2p dans un même complexe.

Ces complexes protéiques comportent sans doute d'autres protéines qui restent à identifier. En effet, il est possible que certains partenaires soient en quantités trop faibles pour être détectés par les techniques actuelles de spectrométrie de masse. L'identification de ces partenaires est importante car elle pourrait nous aider à mieux définir le ou les rôles de la tafazzine.

Les interactions physiques entre la tafazzine et le complexe V, d'une part, et la protéine Aac2p, d'autre part, posent la question de savoir quel rôle joue la tafazzine. Influence-t-elle directement ces partenaires ? À l'heure actuelle, le seul rôle connu de la tafazzine est de remodeler les CL. Il est donc probable que l'interaction physique avec ses partenaires permette d'optimiser leurs fonctions via les CL.

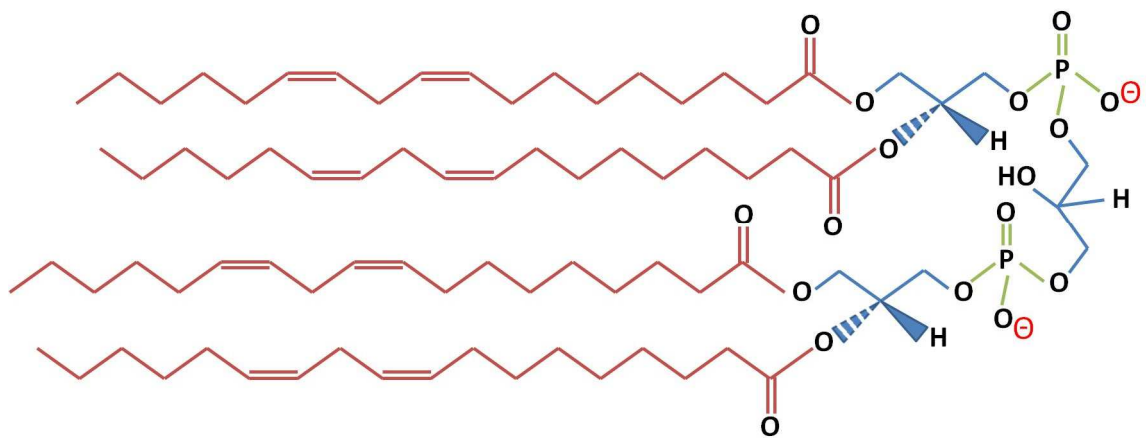


Figure 24 : Structure d'une cardiolipine Les CL sont composées de 3 groupements glycérols (en bleu), de 2 groupements phosphates (en vert) et de 4 chaînes d'acides gras (en rouge, ici 4 chaînes d'acides linoléiques qui sont les plus courantes). Les groupements phosphate sont porteurs de charges négatives.

III.4.2. Les cardiolipines

III.4.2.1. Structure des cardiolipines

- Description de la CL

Les cardiolipines (CL ou bis-(1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho)-1'-3'-sn-glycerol) doivent leur nom au fait qu'elles ont été identifiées initialement dans des cœurs de bœufs par Mary Pangborn, en 1942 (Pangborn, 1942). On les retrouve cependant dans tous les tissus, dans les cellules eucaryotes inférieures telles que la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans la paroi de nombreuses bactéries. Au niveau cellulaire, chez les cellules eucaryotes, les CL se localisent principalement au niveau du feuillet interne de la membrane mitochondriale interne. Elles sont aussi retrouvées au niveau des sites de contact entre membrane interne et membrane externe et, dans une moindre mesure au niveau de la membrane mitochondriale externe (Ardail *et al.*, 1990 # Simbeni *et al.*, 1991). Les CL représentent 10 à 20 % des phospholipides de la mitochondrie (Chen *et al.*, 2006 # Wang *et al.*, 2007).

La structure des CL a été établie en 1964 par LeCocq et Ballou (LeCocq & Ballou, 1964). Cette structure est unique parmi les phospholipides. En effet, elle correspond à un dimère de phospholipides. De fait, les CL sont constituées de deux groupements phosphatidyl reliés par un groupement glycérol. Elles ne portent donc pas deux chaînes d'acides gras comme les autres phospholipides mais quatre (Fig. 24). Les CL, comme les autres phospholipides, sont amphiphiles, avec une tête polaire pouvant porter deux charges négatives, et quatre queues hydrophobes formées par les groupements acyles. En condition physiologique, à cause des pKa des phosphates, la CL ne porterait qu'une seule charge négative.

- Variabilité de la composition en chaînes acyles

Ces groupements acyles peuvent varier, mais sont majoritairement, chez les eucaryotes, des chaînes à 18 carbones, et plus précisément, des chaînes d'acides linoléiques (C18:2, chaînes de 18 carbones avec deux insaturations). Ainsi, dans le cœur de bœuf, l'acide linoléique représente 80% des chaînes d'acides gras. Des analyses du lipidome de cœurs de bœufs et de foies de rats ont permis d'identifier, au niveau des diacylglycérols, les combinaisons suivantes : 18:2-18:2, 18:2-18:1, et 18:2-18:3 (18:1 acide oléique, 18:2 acide

A

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & & \text{X} & & \text{Y} & & \text{X} \\
 & & & | & & | & & | \\
 & & & \text{O} & & \text{O} & & \text{O} \\
 & & & | & & | & & | \\
 \text{CH}_2 & - & \text{CH} & - & \text{CH}_2 & - & \text{O} & - & \text{P} & - & \text{O} & - & \text{CH}_2 & - & \text{CH} & - & \text{CH}_2 & - & \text{O} & - & \text{P} & - & \text{O} & - & \text{CH}_2 & - & \text{CH} & - & \text{CH}_2 \\
 | & & | & & & & & & || & & & & & & & & & & & || & & & & & & | & & | \\
 \text{O} & & \text{O} & & & & & & \text{O} & & & & & & & & & & & \text{O} & & & & & & \text{O} & & \text{O} \\
 \boxed{\text{A}} & & \boxed{\text{B}} & & & & & & & & & & & & & & & & & \boxed{\text{C}} & & & & & & \boxed{\text{D}}
 \end{array}$$

B

Source of cardiolipin	Molecular species				Abundance (Mol%)
	Residue A 3'(1-glycerol)	Residue B 3'(2-glycerol)	Residue C 1'(2-glycerol)	Residue D 1'(1-glycerol)	
Bovine heart	18:2	18:2	18:2	18:2	48
	18:3	18:2	18:2	18:2	21
	18:2	18:3	18:2	18:2	
	18:2	18:2	18:3	18:2	
	18:2	18:2	18:2	18:3	
Rat liver	18:2	18:1	18:2	18:2	15
	18:2	18:2	18:1	18:2	35
	18:2	18:2	18:1	18:2	

Figure 25 : A) Structure d'une cardiolipine Les résidus X et Y correspondent à des hydrogènes, les résidus A, B, C et D correspondent à des chaînes d'acides gras. **B) Différentes combinaisons d'acides gras retrouvées au niveau des CL de cœur de bœuf et de foie de rat** 18:1 acide oléique, 18:2 acide linoléique, 18:3 acide linoléique

linoléique, 18:3 acide linoléique) (Fig. 25). Ces combinaisons sont variables d'un organisme à l'autre, d'un tissu à l'autre et même parfois d'un type cellulaire à l'autre, mais sont assez homogènes au sein d'un même type cellulaire (Claypool & Koehler, 2012). En règle générale, la forme tétralinoléique (les 4 chaînes acyles sont des acides linoléiques) est largement majoritaire dans les cellules (Fig. 25). La levure constitue une exception puisque ses CL portent, majoritairement, aussi bien des chaînes d'acides oléiques (C18:1) que des chaînes d'acides palmitoléiques (C16:1) (Schlame *et al.*, 1993 # Schlame *et al.*, 2000). Cette variabilité dans la composition des groupements acyles permettrait une adaptation des organismes à leur environnement (température, salinité, milieu plus ou moins riche en oxygène...). Une étude chez le rat a montré, par ailleurs, que la composition en acides gras évolue aussi au cours du vieillissement. En effet, au cours du temps, les CL accumulent de plus en plus d'acides gras longs, notamment l'acide docosahéxaénoïque (C22:6).

La composition variable en chaînes acyles des CL confère probablement à celles-ci des propriétés physico-chimiques différentes. Dans quelle mesure ces différences physico-chimiques impactent-elles la fonction biologique des CL ? Cet aspect n'est pas encore complètement élucidé. Ainsi, bien que les grandes fonctions biologiques des CL soient connues, il est possible que les différentes espèces moléculaires des CL puissent avoir des fonctions biologiques particulières.

III.4.2.2. Synthèse des cardiolipines

Alors que les phospholipides mitochondriaux sont principalement synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) puis importés à la mitochondrie, les CL présentent encore une autre particularité. En effet, elles sont directement générées dans la mitochondrie à partir de l'acide phosphatidique (PA) en quatre étapes (Fig. 26).

Le PA est métabolisé en cytidinediphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) par la CDP-DAG synthase (CDS) chez l'Homme). La localisation de cette étape est encore incertaine. En effet, deux isoformes de cette enzyme ont été mises en évidence : L'une est présente au niveau de la mitochondrie alors que l'autre est au niveau du RE. Chez la levure une enzyme Cds1p a été localisée au niveau du RE. Cependant, il existe aussi la protéine Tam41p, située au niveau de la membrane interne mitochondriale capable de synthétiser du CDP-DAG (Tamura *et al.*, 2013).

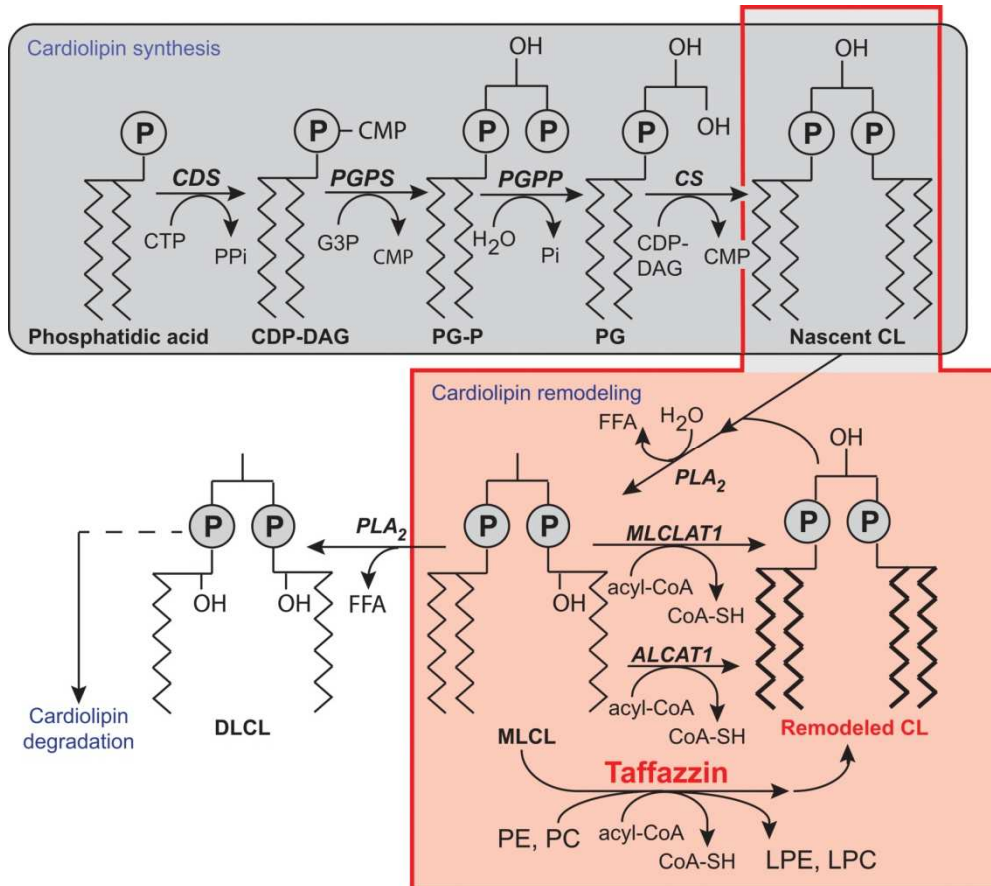


Figure 26 : Biogénèse et remodelage des cardiolipines Les différentes voies et enzymes impliquées dans la synthèse, le remodelage et la dégradation des CL sont représentées sur ce schéma. Les chaînes d'acides gras sont schématisées et ne représentent pas la réalité puisque leur taille est variable d'une CL à l'autre. Ce sont physiologiquement des chaînes à 16, 18 ou 22 carbones et avec des degrés d'insaturations variables.
 Abréviations : **ALCAT 1** Acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase 1; **CDP-DAG** cytidine diphosphate-diacylglycerol; **CDS** CDP-DAG synthase; **CS** CL synthase; **CMP** cytidine monophosphate; **CTP** cytidine triphosphate; **DLCL** dilyso-CL; **FFA**, free fatty acid; **G3P** glycerol-3-phosphate; **LPC** lysophosphatidyl choline; **LPE** lysophosphatidylethanolamine; **MLCL** monolyso-CL; **MLCLAT 1** MLCL acyltransferase 1; **PC** phosphatidylcholine; **PE** phosphatidylethanolamine; **PG** phosphatidylglycerol; **PG-P** phosphatidylglycerol phosphate; **PGPP** phosphatidylglycerol phosphate phosphatase; **PGPS** phosphatidylglycerol phosphate synthase; **P_i** inorganic phosphate; **PLA₂** phospholipase A₂; **taffazzin** = transacylase/ (d'après Saric *et al.*, 2016)

La phosphatidylglycérol phosphate synthase (PGS1), une enzyme de la membrane interne mitochondriale va substituer le groupement cytidine monophosphate (CMP) du CDP-DAG par un groupement glycérol phosphate provenant d'un G-3-P, donnant ainsi un phosphatidylglycérol phosphate (PGP) (Minskoff & Greenberg, 1997). Cette enzyme codée par le gène *PGS1* chez les mammifères et la levure *S. cerevisiae* (Kawasaki *et al.*, 1999) est souvent considérée comme une enzyme clé de la biosynthèse des CL (Mejia *et al.*, 2014).

Le phosphate ajouté est rapidement clivé par une PGP phosphatase (PGPP) générant ainsi un phosphatidylglycérol (PG). Chez l'Homme cette fonction est assurée par la protéine PTPMT1, alors qu'elle est assurée chez la levure par la protéine Gep4p (Pagliarini *et al.*, 2004 # Pagliarini *et al.*, 2005). Dans les conditions physiologiques, les PG sont présents en très faible quantité (1 à 2% des phospholipides mitochondriaux totaux), ce qui suggère que les PG sont rapidement métabolisés.

Enfin, la dernière étape de synthèse de la CL est réalisée par la CL synthase (CS) qui va fusionner un CDP-DAG et un PG en éliminant un groupement CMP, donnant ainsi une CL immature nommée CL native. Chez l'Homme cette fonction est assurée par la protéine CRLS1, et chez la levure par la protéine Crd1p. La CS n'ayant aucune sélectivité dans le choix des CDP-DAG et PG, les chaînes acyles retrouvées dans la CL native sont celles portées par les précurseurs et sont donc très aléatoires. Or, nous avons précédemment vu que la répartition de ces chaînes d'acide gras était très précise. Les CL ne portent donc pas leurs groupes acyls définitifs. C'est pour cette raison que l'on parle de CL « natives ». Pour obtenir la composition définitive en acide gras de la CL, donnant ainsi la CL mature, des étapes de remodelage sont nécessaires (Saric *et al.*, 2016).

III.4.2.3. Remodelage des cardiolipines

- Mécanisme

Le remodelage des phospholipides par coupure et remplacement des groupements acyles a d'abord été décrit par Lands pour les phosphatidylcholines (PC) (Shindou & Shimizu, 2009). Mais ce processus, valable pour tous les autres phospholipides, reste encore assez méconnu pour les CL à ce jour. Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce remodelage qui consiste à incorporer des chaînes d'acyles insaturées (Fig. 26).

La première étape consiste à hydrolyser une chaîne acyle et donc à générer une monolysocardiolipine (MLCL). Chez la levure cette fonction est assurée par la protéine Cld1p, une enzyme exclusivement mitochondriale (Baile *et al.*, 2013 # Baile *et al.*, 2014). Elle a été précisément localisée au niveau de la membrane interne du côté matriciel (Baile *et al.*, 2013). Mais l'enzyme impliquée chez l'Homme n'est pas encore connue avec certitude. Des analyses *in vitro* ont montré que des phospholipases de type A₂ (PLA₂) pouvaient générer des MLCL. Les PLA₂ sont une grande famille de phospholipases. Parmi elles, seules les PLA₂ de type PLA₂ sécrétés (sPLA₂), PLA₂ cytosoliques (cPLA₂), et PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂) peuvent assurer cette fonction (Hsu *et al.*, 2013). Par ailleurs, une inhibition de l'activité de la phosphatase iPLA₂ par du Bromoenol Lactone (BEL) (Ong *et al.*, 2015) dans des lymphoblastes de patients atteints du BTHS (patients avec des mutations dans le gène *TAZ* donnant une protéine non fonctionnelle) restaure aussi partiellement l'homéostasie des CL (Malhotra *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent fortement que la protéine iPLA₂ joue un rôle dans le remodelage des CL. De plus, une étude chez la drosophile montre que la double inactivation des gènes *TAZ* et *iPLA₂* empêche l'accumulation de MLCL, défaut caractéristique de l'absence de tafazzine (Malhotra *et al.*, 2009).

La deuxième étape du remodelage consiste à transférer, à partir d'un phospholipide, une nouvelle chaîne acyle à la MLCL générée précédemment. En plus de la tafazzine, les mammifères possèdent trois autres enzymes capables d'effectuer une telle tâche : ALCAT1, MLCLAT1, une sous-unité de la protéine trifonctionnelle TFP.

L'acyl CoA lysocardiolipine acyltransférase (ALCAT1), contrairement à ce qu'indique son nom, n'est pas spécifique aux cardiolipines. Curieusement, la fonction de cette protéine semble assez délétère pour la cellule. En effet, des études de surexpression d'ALCAT ont montré que cette enzyme, lors du remodelage des CL, avait tendance à générer des « mauvaises CL », portant des acides docosohexaénoïques (C22:6) très sensibles à l'oxydation et associés à des dysfonctionnements mitochondriaux (Claypool & Koehler, 2012). De plus, une étude sur des souris a montré que la surexpression du gène *ALCAT*, notamment via une diminution des CL, bloque l'autophagie, ce qui conduit à des défauts mitochondriaux et, parfois, à une stéatose hépatique non-alcoolique. Au contraire, l'absence de cette enzyme a un effet protecteur pour les souris (Wang *et al.*, 2015). Cette enzyme, contrairement aux autres enzymes impliquées dans le métabolisme des CL, toutes mitochondriales, est localisée dans le réticulum endoplasmique au niveau des membranes associées à la mitochondrie. De

plus, l'ALCAT participe au remodelage d'autres phospholipides comme le phosphatidylinositol (PI) ou le PG. Etant donné ses effets délétères, l'intérêt physiologique de cette enzyme dans le remodelage des CL reste mystérieux (Cao *et al.*, 2004 # Zhao *et al.*, 2009).

La monolyso-cardiolipine acyltransférase (MLCLAT1) est une enzyme strictement spécifique des CL localisée au niveau des membranes mitochondriales internes et externes (Ma *et al.*, 1999 # Ma et Hatch, 2000). Elle semble impliquée dans l'incorporation d'acide linoléique (C18:2) au niveau des MLCL. En effet, sa délétion dans les cellules HeLa induit une diminution de l'incorporation d'acide linoléique alors que sa surexpression dans des lymphoblastes déficients pour la protéine TAZ permet de restaurer le niveau de CL ainsi que l'incorporation de linoléate (Taylor & Hatch, 2009). Enfin, dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le rat, l'expression de la protéine TAZ est diminuée, alors que celle de la protéine MLCLAT1 est augmentée. MLCLAT1 pourrait donc jouer un rôle de « roue de secours » lors d'une forte diminution de la quantité de CL matures (Claypool & Koelher, 2012).

Une troisième enzyme possède une activité acyl-CoA acyltransferase. Cette enzyme est une sous-unité de la protéine trifonctionnelle TFP. La TFP est une enzyme de la membrane mitochondriale interne dont le rôle majeur est de réaliser la β -oxydation en catalysant 3 des 4 étapes de cette voie. Cette sous-unité alpha possède aussi une activité acyl-CoA acyltransferase et permet donc l'acylation des MLCL. Il est aussi intéressant de remarquer que cette sous-unité protéique possède une séquence homologue à la MLCAT (Taylor *et al.*, 2012). Son implication dans le remodelage des CL a été confirmée *in vivo*. En effet, les souris KO pour cette sous-unité présentent non seulement une diminution de la quantité de CL mais aussi une modification de leur composition (Mejia *et al.*, 2015).

L'importance fonctionnelle d'ALCAT1, de MLCLAT1 et de la sous-unité de la TFP n'est pas encore bien définie. Ces protéines semblent avoir un rôle assez mineur dans l'acylation des MLCL par rapport à la protéine tafazzine. D'ailleurs, la délétion de leur gène chez *Drosophila melanogaster* est sans conséquence, ce qui n'est pas le cas pour la délétion du gène TAZ (Schlame *et al.*, 2012). La tafazzine semble donc être primordiale pour la transacylation des MLCL. De plus, c'est la seule des quatre enzymes à être conservée dans l'évolution, de la levure jusqu'à l'Homme (Saric *et al.*, 2016).

Chez la levure, dans un premier temps, la protéine Cld1p va spécifiquement cliver les chaînes acyles saturées, générant des MLCL, puis la protéine Taz1p va transférer des chaînes acyles insaturées à partir d'une phosphatidylcholine (PC) ou d'une phosphatidyléthanolamine (PE) pour régénérer des CL ayant des chaînes acyles insaturées (16:1 et 18:1 principalement). 90% des chaînes acyles des CL sont insaturées chez la levure, ce qui montre l'efficacité et l'importance du remodelage par la tafazzine (Gaspard & MacMaster, 2015).

Baile *et al.* ont suggéré (Baile *et al.*, 2014), d'après leurs travaux sur la levure, l'existence d'une étape intermédiaire entre la formation des MLCL et leur ré-acylation : le transfert des MLCL du feuillet interne vers le feuillet externe de la MMI. En effet, toutes les enzymes nécessaires à la synthèse de la cardiolipine native et la protéine Cld1p sont localisées du côté matriciel, alors que la protéine Taz1p est localisée du côté inter-membranaire. Il existe probablement une (ou plusieurs) protéine(s) impliquée(s) dans ce transfert d'un feuillet à l'autre, mais elle(s) reste(nt) à identifier. La protéine PLS3 (phospholipide scramblase) serait un candidat plausible (Baile *et al.*, 2014).

- Comment expliquer les spécificités des chaînes acyles ?

Un autre mystère demeure : comment le remodelage aboutit à une combinaison homogène d'acyles au niveau des CL d'un type cellulaire, alors que la tafazzine ne semble pas avoir de sélectivité, dans le choix des donneurs d'acyles ? De fait, la théorie d'une spécificité de la tafazzine pour tels ou tels substrats a longtemps prévalu. Cependant, cette hypothèse est remise en cause. En effet, plusieurs travaux ont démontré que la tafazzine pouvait utiliser un large choix de phospholipides comme donneurs d'acyles : cardiolipines, acides phosphatidiques (PA), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylsérine (PS) et leurs « lyso-homologues ». Le choix des donneurs d'acyles est aussi indépendant des chaînes acyles portées : de 7 à 19 carbones, de 0 à 3 insaturations. Il est donc possible d'extrapoler en disant que la tafazzine peut interagir avec n'importe quel type de phospholipide ou de lysophospholipide pour incorporer n'importe quel type d'acide gras sur les MLCL (Schlame, 2013).

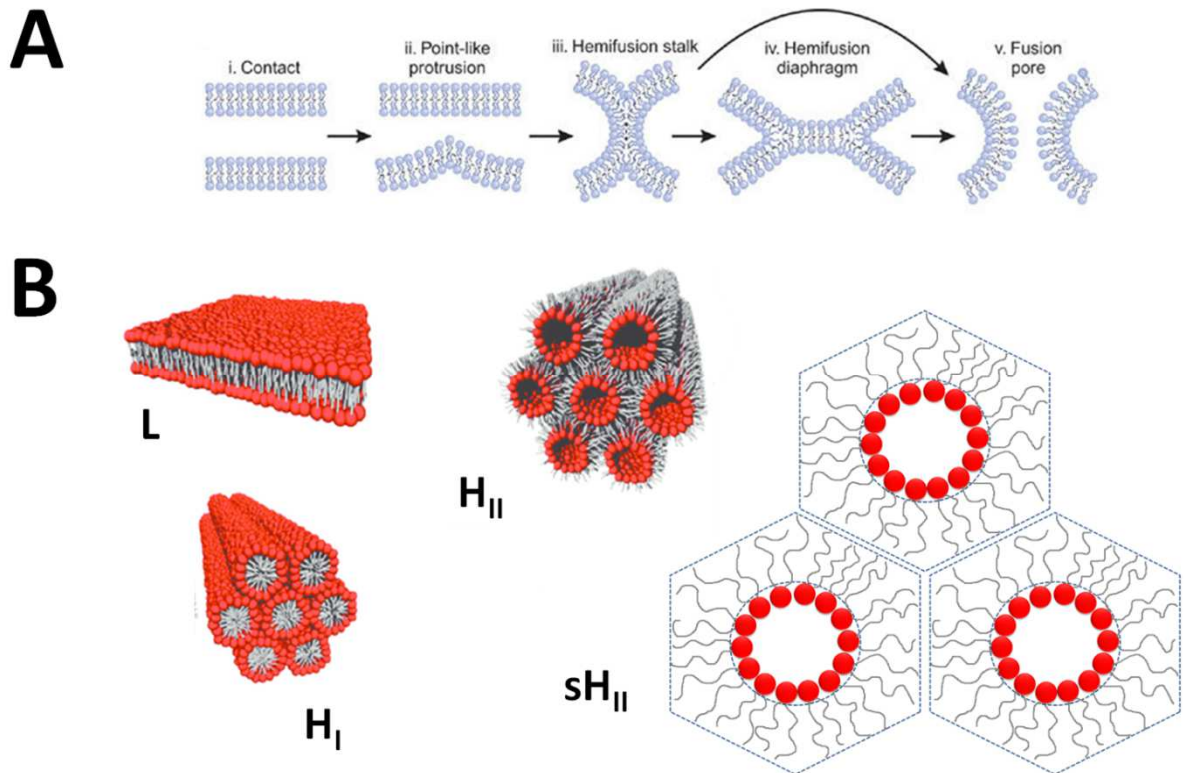


Figure 27 : A) Processus permettant d'aboutir à une hémifusion des membranes (d'après Chernomordik & Kozlov, 2008) B) Différentes conformations adoptées par les lipides L : phase lamellaire, H_I : phase hexagonale, H_{II} : phase hexagonale inversée, sH_{II} : vue supérieure d'une phase hexagonale inversée (www.researchgate.net)

D'après ces précédentes données, la tafazzine ne semble pas avoir de spécificité vis à vis des chaînes d'acyles qu'elle transfère. En effet, Malhotra *et al.* (Malhotra *et al.*, 2009) ont montré que la tafazzine humaine, qui favorise des CL avec des formes C18:2 chez l'Homme (Schlame, 2002), va majoritairement incorporer des chaînes C18:1 lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules d'insectes. Il est important de noter que dans ces cellules d'insectes, la CL endogène porte des formes C16:1 alors que la majorité des autres phospholipides est constituée de chaînes C18:1. Il semble donc, dans ce cas, qu'à cause de l'environnement très fort en C18:1 la tafazzine surexprimée transfère essentiellement ces chaînes. Les mêmes résultats étaient obtenus à partir de tafazzine de drosophile alors que cette dernière est connue pour transférer, dans son environnement des chaînes C16:1 et C18:2. Ainsi le profil d'acides gras liés aux CL ne dépendrait donc pas d'une spécificité de la tafazzine mais de la spécificité de l'environnement de cette dernière. La tafazzine utiliserait donc les substrats dont elle dispose (Xu *et al.*, 2006).

Deux autres contraintes, récemment mises en évidence *in vitro* par Schlame *et al.* (Schlame *et al.*, 2012), pourraient expliquer, au moins partiellement, la spécificité de certains profils d'acides gras au sein des CL. La première contrainte concerne la tafazzine et sa capacité à interagir uniquement avec des phospholipides organisés en simple couche lipidique. Or, les membranes mitochondriales sont classiquement organisées en bicouches lipidiques. Ils ont alors émis l'hypothèse que la forte courbure de certaines portions de la membrane mitochondriale ou une hémifusion des membranes (Fig. 27A) pourraient conduire à la génération de micro-domaines constitués de phospholipide(s) spécifique(s) plutôt insaturé(s) qui fourniraient à la tafazzine les chaînes d'acyles spécifiques pour le remodelage des CL. La seconde contrainte est que la phase dans laquelle sont les lipides influence la spécificité des substrats de la transacylation. En effet, ils ont notamment montré que la formation des CL tétralinoléiques (C18:2)₄ est fortement favorisée par une organisation des lipides en phase hexagonale inversée (Fig. 27B). La spécificité de la transacylation étant dépendante des propriétés physiques de la membrane, les auteurs parlent d'un remodelage « thermodynamique », la tafazzine remodelant les lipides membranaires pour obtenir des assemblages plus stables thermodynamiquement (Fig. 28).

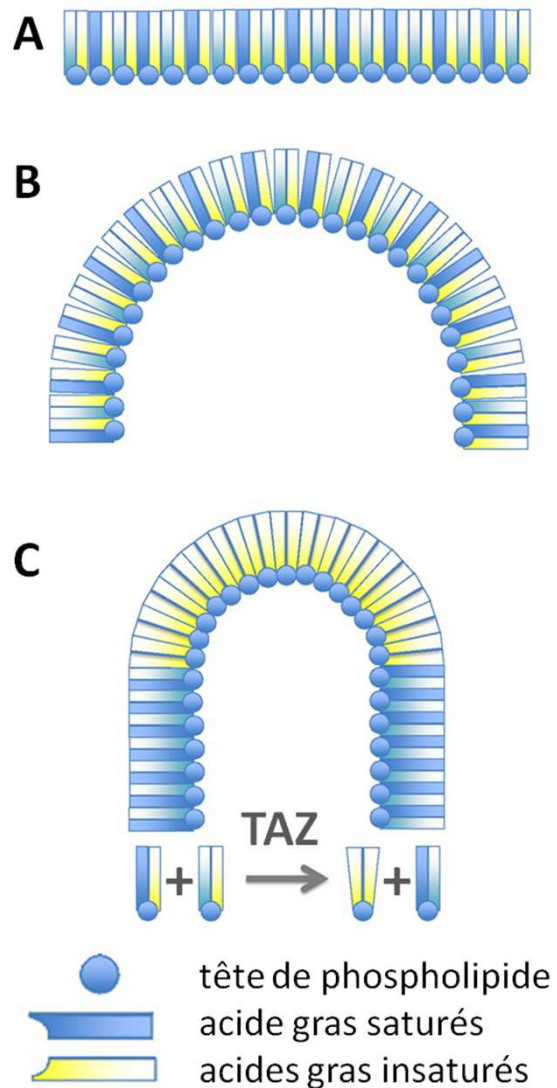


Figure 28 : Tafazzine et assemblage des lipides. Ce schéma représente l'hypothèse de Schlame *et al.* quant à l'action de «chaperone » de la tafazzine sur les membranes mitochondriales. **A** Les phospholipides sont assemblés de façon stable en forme de bicouche lipidique (seul un feuillet est représenté à chaque fois). **B** La courbure de la membrane perturbe l'assemblage de la bicouche et crée une structure thermodynamiquement instable, ce qui pourrait faciliter le déplacement des phospholipides utilisés ensuite par la tafazzine. **C** La tafazzine (TAZ), grâce aux transacylations, va remodeler les acides gras pour créer des assemblages de lipides thermodynamiquement plus stables qu'en B. Ici, des phospholipides doublement insaturés sont formés car ils favorisent les courbures par leur forme. Ainsi les membranes courbées favorisent la réaction de la tafazzine et la tafazzine, en retour, stabilise la courbure (d'après Schlame *et al.*, 2013)

III.4.2.4. Dégradation des cardiolipines

Le processus de dégradation des cardiolipines est très peu documenté. Le *turn-over* des CL a été étudié dans des lymphoblastes humains à l'aide de techniques de radioactivité et de spectrométrie de masse. Cela a permis de mettre en évidence que, dans des conditions physiologiques, le renouvellement des CL est nettement plus lent que celui des autres phospholipides. Il semblerait que cela soit dû à leur stabilisation par interaction avec différentes protéines membranaires. En effet, les CL riches en chaînes acyles insaturées interagissent fortement avec certaines protéines, notamment celles impliquées dans les complexes des OXPHOS. Dans le cas du syndrome de Barth, l'absence de tafazzine fonctionnelle entraîne une diminution du remodelage des CL et une augmentation des CL saturées. Ces CL saturées perdent leur affinité pour les protéines et ne sont plus protégées de la dégradation en MLCL. Le *turn-over* des CL est donc accéléré dans les lymphoblastes de patients et passe de 17-26 heures dans les cellules contrôle à 4-6 heures dans les cellules de malades (Xu *et al.*, 2016).

III.4.2.5. Fonctions des cardiolipines

- Cardiolipines et structure mitochondriale

Le premier rôle évident des CL est d'entrer dans la composition des membranes mitochondriales où elles représentent environ 10 à 15% des lipides membranaires. Les CL participent donc à la compartimentation de la mitochondrie essentielle pour maintenir des gradients de pH, de protons...nécessaires au fonctionnement de cet organite. Il a aussi été suggéré que les CL sont impliquées dans l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons (H^+), en fixant ces derniers au niveau de la charge négative portée par l'un des groupements phosphates.

□ Formation des crêtes mitochondriales

Par ailleurs, la petite taille de la tête des CL par rapport à celle de leur queue permet à la CL d'adopter une structure conique, alors que les autres phospholipides, plus équilibrés, adoptent une structure cylindrique (Fig. 29A). Cette structure conique des CL va favoriser la

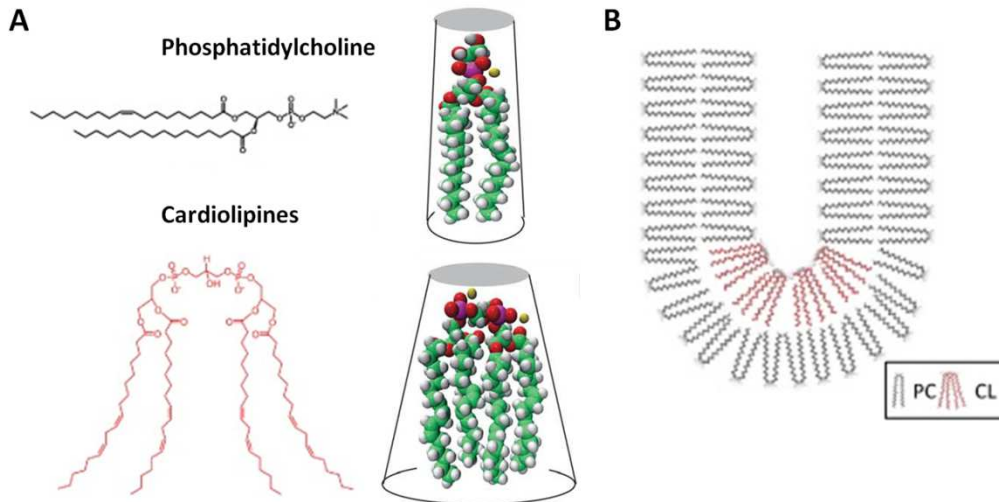


Figure 29 : A) Structure et forme tridimensionnelle des phospholipides Du fait de la petite taille de la tête par rapport à l'encombrement des quatre chaînes acyles, la CL présente une forme conique, alors que les autres phospholipides, comme les phosphatidylcholines, sont plutôt cylindriques (d'après Saric *et al* 2016). **B) Influence de la forme des cardiolipines sur la structure des membranes** La structure conique exerce une pression latérale sur les membranes et participe ainsi à la courbure des membranes (www.researchgate.net).

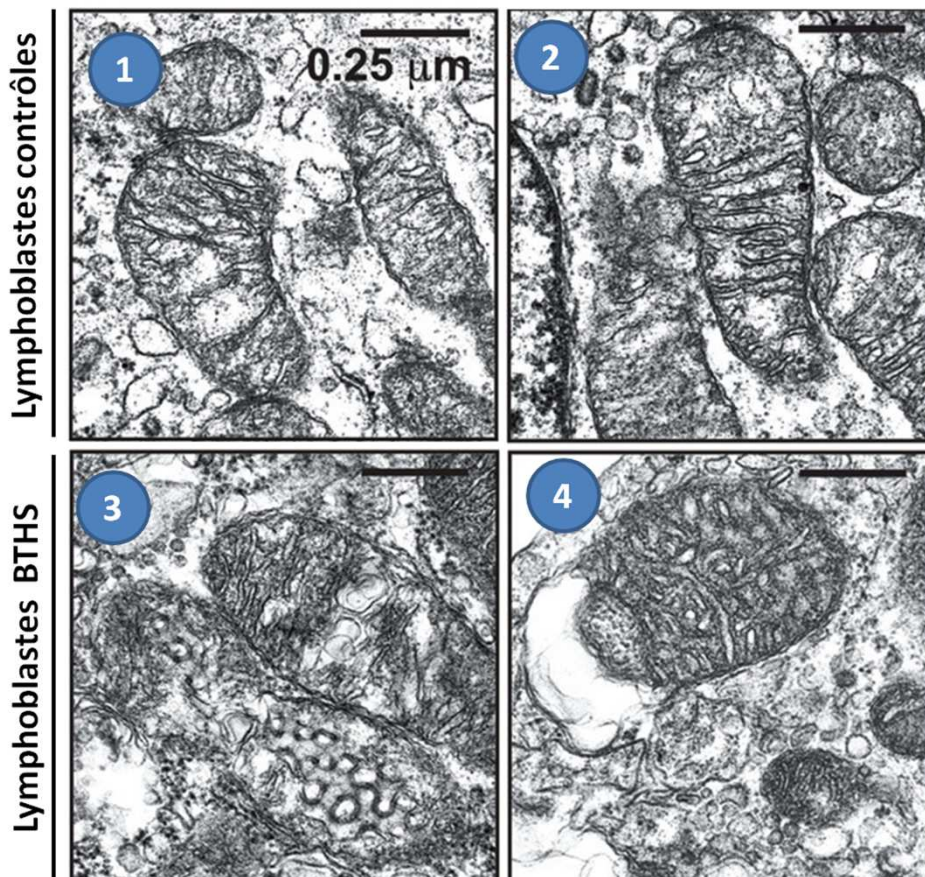


Figure 30 : Mitochondries observées en microscopie électronique à transmission. 1 et 2 Mitochondries de lymphoblastes contrôlés. **3 et 4.** Mitochondries de lymphoblastes d'une personne atteinte du syndrome de Barth. Les mitochondries sont gonflées, les crêtes sont fortement désorganisées (d'après Saric *et al* 2016).

courbure négative des membranes mitochondriales internes (Fig. 29B). Cependant, une étude récente semble indiquer que la structure conique de la CL ne peut à elle seule être responsable de la courbure des membranes (Boyd *et al.*, 2017). En effet, l'utilisation d'un autre phospholipide mitochondrial conique ne permet pas d'obtenir les courbures de membranes obtenues avec la CL. Les auteurs en concluent que la CL possède des propriétés uniques, en plus de sa structure particulière, qui permettent d'obtenir la courbure des membranes. De plus, il est connu que les dimères et les oligomères d'ATP synthase (complexe V) sont nécessaires à la courbure de la membrane mitochondriale interne pour la formation des crêtes mitochondriales (Paumard *et al.*, 2002). Or cette oligomérisation est dépendante des CL (Acehan *et al.*, 2011). Les CL sont aussi nécessaires à l'interaction des isoformes longues de la protéine Mgm1p (Mgm1-l) avec la membrane mitochondriale interne. Une fois insérées dans la membrane, les protéines Mgm1-lp s'oligomérisent et forment des liens stabilisant les crêtes mitochondriales. Le gène MGM1 de levure est l'orthologue du gène humain OPA1 dont le produit du gène est impliqué dans la fusion mitochondriale (Ban *et al.*, 2010). Les CL sont donc fortement impliquées dans la structuration des mitochondries et notamment la formation des crêtes. D'ailleurs, des mutations qui affectent les CL sont corrélées à des défauts morphologiques des mitochondries, comme dans le cas du BTHS (Fig. 30) (Saric *et al.*, 2016).

□ Sites de contacts

Enfin, les CL jouent un rôle important dans la formation des sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. En effet, un enrichissement en CL insaturées, plus de 24% des phospholipides totaux, a été observé par Ardail *et al.* dans ces zones de contact (Ardail *et al.*, 1990). La possibilité pour les CL d'adopter une configuration hexagonale inversée (Fig. 27) pourrait, en effet, favoriser la fusion des membranes mitochondriales internes et externes au niveau de ces sites de contact. Ce rapprochement des deux membranes permet et favorise le passage des lipides entre les membranes mitochondriales interne et externe. Ces échanges de lipides entre ces deux membranes pourraient aussi expliquer, au moins en partie, la présence de CL au niveau de la membrane mitochondriale

externe alors que les CL sont synthétisées au niveau de la membrane mitochondriale interne (Schlattner *et al.*, 2014).

La première fonction de la CL est donc un rôle structural en participant à la formation des crêtes mais aussi des sites de contact. Cette première fonction a des conséquences directes sur d'autres fonctions mitochondriales puisque, par exemple, les sites de contact sont des passages privilégiés de certains métabolites qui peuvent réguler la respiration mitochondriale.

- Cardiolipines et oxydations phosphorylantes

En plus de cette influence sur la structure mitochondriale, il a aussi été montré que les CL favorisent certaines voies métaboliques telles que les oxydations phosphorylantes (OXPHOS). La localisation exclusivement mitochondriale des CL a rapidement mené les scientifiques à penser qu'elles pouvaient avoir une influence sur la biogénèse et le fonctionnement des oxydations phosphorylantes (Mileykovskaya *et al.*, 2005). Cette influence des CL sur les complexes protéiques impliqués dans les OXPHOS passe par l'interaction entre ces molécules (complexes protéiques et CL). En effet, certaines protéines possèdent des sites de liaison aux CL. Cependant, les mécanismes moléculaires ne sont pas précisément connus et/ou compris malgré de nombreuses études notamment chez la levure et les cellules de patients atteints du BTHS.

□ CL et supercomplexes de la chaîne respiratoire

En exprimant le gène *CRD1* sous le contrôle d'un système *tet-off* dans une souche *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta crd1$, Zhang *et al.* ont pu moduler la quantité de CL synthétisée. De façon intéressante, ils ont montré que la formation des supercomplexes (CIII₂-CIV₂ : Un homodimère de complexe III associé à un homodimère de complexe IV) est dose dépendante avec la quantité de CL, ce qui n'est pas le cas avec d'autres phospholipides tel que le phosphatidylglycérol (Zhang *et al.*, 2002). Donc, *in vivo*, la CL joue un rôle important dans l'assemblage de supercomplexes de la chaîne respiratoire. Ce résultat est confirmé par la mutation $\Delta taz1$, qui est corrélée à une diminution des CL, et entraîne aussi une déstabilisation du supercomplexe CIII₂-CIV₂ chez la levure (Brandner *et al.*, 2005 # de Taffin de Tilques *et al.*,

2017). Brandner *et al.* ont aussi montré que, toujours dans le mutant $\Delta taz1$, non seulement les supercomplexes sont déstabilisés, mais leur assemblage est altéré (Brandner *et al.*, 2005). De plus, par cristallographie, il a été identifié la présence de liaisons hydrogènes entre les groupements phosphates des CL et certains résidus très conservés du complexe III (Fry & Green, 1981 # Gomez & Robinson, 1999 # Wenz *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, les supercomplexes sont légèrement différents de ceux de la levure qui ne possède pas de complexe I. En effet, les supercomplexes sont formés d'un complexe I, de deux complexes III et d'un complexe IV (CI-CIII₂-CIV). MacKenzie *et al.* ont montré que ces supercomplexes sont déstabilisés dans des lymphoblastes de patients atteints du BTHS (MacKenzie *et al.*, 2006). Cette déstabilisation induit la libération de complexes IV monomériques. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que les complexes IV monomériques issus des cellules des patients migrent plus vite que les complexes IV issus de mitochondries saines. Ce résultat suggère que des CL liées au complexe IV issues des mitochondries saines migrent avec lui et le ralentissent. L'absence de CL avec le CIV issus des mitochondries de patients serait dû au fait que les CL soient saturées, perdant ainsi leur capacité à interagir avec ce complexe. De plus, la liaison de trois ou quatre CL au complexe IV avait déjà été montrée dans le cœur de bœuf, où la perte de ces mêmes CL est corrélée à une diminution de la stabilité et de l'activité enzymatique de ce complexe (Robinson *et al.*, 1990 # Seldak *et al.*, 1999). La CL joue aussi probablement ce rôle de « colle » avec les complexes I et III puisque, chez les patients du BTHS, MacKenzie *et al.* ont aussi montré une déstabilisation des complexes CI-CIII₂. La déstabilisation du supercomplexe CI-CIII₂ ne semble pas avoir de lourdes conséquences sur l'activité des CI dans les lymphoblastes. Par contre, une diminution conséquente de l'activité des complexes I et IV est observée dans des cellules musculaires squelettiques (MacKenzie *et al.*, 2006). Il est donc possible que les chaînes respiratoires soient plus ou moins sensibles à des défauts de CL selon les tissus. Cela pourrait être lié à la demande énergétique des tissus et au ratio chaînes respiratoires/CL ou au type de CL présents dans ces tissus. D'ailleurs, en cas de BTHS, le niveau de CL est davantage réduit dans les cellules musculaires squelettiques que dans les lymphoblastes (Schlame *et al.*, 2003).

Les chaînes respiratoires ont aussi un complexe II. Ce complexe a été cristallisé chez la bactérie. En effet, la structure cristallisée du complexe de la succinate deshydrogénase de la bactérie *E. coli* a permis de montrer la présence d'une CL dans le cristal (Yankovskaya *et al.*,

2003). De plus, en 2012, Schwall *et al.* ont montré, *in vitro*, que la présence de CL était importante pour l'assemblage et l'activité enzymatique de ce complexe II issu de mitochondries de *S. cerevisiae* (Schwall *et al.*, 2012).

□ CL et transporteur ADP/ATP

Nous avons vu précédemment que les CL sont impliquées dans la dimérisation des complexes V. C'est aussi le cas pour la dimérisation et le fonctionnement des échangeurs ADP/ATP (« ANT1 » Adenine Nucleotide Translocator 1 chez l'Homme ou « AAC2 » ADP/ATP Carrier 2 chez la levure). Cette relation CL/AAC2 est connue depuis relativement longtemps. En effet, dès 1994, Hoffmann *et al.* ont montré *in vitro* que l'activité d'échange ADP/ATP d'un mutant $\Delta aac2$ pouvait être restaurée par l'ajout exclusivement de CL de cœur de bœuf contenant donc essentiellement des CL tétralinoléiques. L'ajout d'autres phospholipides, de MLCL ou de CL portant d'autres chaînes acyles (acides myristoléiques C14:1 ou oléiques C18:1) n'avait pas d'effet bénéfique (Hoffmann *et al.*, 1994). De plus, Brandner *et al.* ont, chez *S. cerevisiae*, montré que la déficience en CL entraînait une diminution de l'oligomérisation du transporteur Aac2p (Brandner *et al.*, 2005). Toujours chez *S. cerevisiae*, Claypool *et al.* se sont intéressés à l'interactome de la protéine Aac2p (ensemble des protéines interagissant directement ou indirectement avec la protéine Aac2p) par co-précipitation. Ils ont ainsi montré que la protéine Aac2p était retrouvée dans six complexes protéiques différents, dans lesquels étaient aussi retrouvés des sous-unités des complexes III et IV de la chaîne respiratoire. Ces interactions sont perdues chez un mutant $\Delta crd1$ incapable de synthétiser des CL, montrant l'importance de la CL dans la cohésion des super-complexes protéiques impliquant Aac2p (Claypool *et al.*, 2009).

□ CL et transporteur Pi/H⁺

Des CL ont aussi été trouvées associées au transporteur de phosphate inorganique (Pi). Cette association influence l'activité de ce transporteur. En effet, ce transporteur intégré dans des liposomes contenant 5% de CL possède une activité 50% supérieure par rapport au même transporteur intégré dans des liposomes sans CL (Kadenbach *et al.*, 1982). Si l'association entre les complexes CIII₂-CIV₂ et Aac2 n'est pas vraiment comprise, il est, ici, assez facile d'imaginer l'avantage de l'association entre le transporteur Pi/H⁺ et les CL. En effet, pour faire rentrer le Pi dans la mitochondrie, ce transporteur, qui est un symport, utilise la force du gradient de protons généré par la chaîne respiratoire. Les CL, chargées négativement, permettraient d'attirer les protons et de créer un environnement dense en protons favorable à l'import du Pi selon le gradient de concentration.

□ CL et ATP synthase (complexe V)

Les CL vont aussi avoir une influence sur le complexe de l'ATP synthase. En effet, la CL a été trouvée associée à l'ATP synthase, plus précisément au niveau de la sous-unité c/9 du F_o. En fait, Walker *et al.* ont montré, en 2013, que la CL établirait une interaction avec une lysine de cette sous-unité pour stabiliser les anneaux, notamment pendant la rotation qui permet la translocation des protons (Walker *et al.*, 2013). De plus, comme vu précédemment, ces interactions entre CL et ATP synthase vont influencer la formation des crêtes.

Enfin, les CL pourraient jouer un autre rôle grâce à leur capacité à piéger les protons au niveau de leur charge négative. En effet, les protons pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire par la chaîne respiratoire vont pouvoir se lier aux CL et ainsi ne vont pas trop perturber le pH de ce compartiment, tout en générant un réservoir de protons pour le fonctionnement du F_o de l'ATP synthase (Haines & Dencher, 2002).

Les CL sont donc des phospholipides qui, par leurs propriétés, vont agir sur les complexes protéiques, leur assemblage et leur activité. Elles vont aussi avoir un rôle très important sur la biogénèse des supercomplexes et donc sur le rendement/l'optimisation des OXPHOS. Sans avoir élucidé tous les mécanismes sous-jacents à l'optimisation des OXPHOS par les CL, il

semble assez évident que les CL jouent donc un rôle sur la fonction respiratoire mitochondriale.

- Cardiolipines et dynamique mitochondriale

Alors que les mitochondries ont longtemps été considérées comme des petits granules séparés les uns des autres, il est maintenant bien connu que ces dernières s'organisent en réseaux très dynamiques. La morphologie de ce réseau dépend de l'équilibre entre les mécanismes de fusion et de fission. La fusion est un processus conservé évolutivement, dont la fonction majeure est de connecter les mitochondries afin de favoriser l'échange de leurs contenus et de leurs génomes. La fission est un mécanisme primordial qui est, par exemple, requis avant la mitophagie pour éliminer une partie du réseau mitochondrial défectueux.

□ La fusion

Les CL sont fortement impliquées dans la morphologie du réseau mitochondrial, principalement *via* la protéine OPA1, dont l'homologue Mgm1p chez la levure est très conservé ($\approx 30\%$ d'identité). La protéine Mgm1p, suite à des clivages protéolytiques, est présente sous deux formes : une isoforme longue (Mgm1-l) et une isoforme courte (Mgm1-c). De Vay *et al.* ont montré *in vitro* que les deux isoformes de la protéine Mgm1p ont la capacité de se lier à des membranes de liposomes, uniquement si ces derniers contiennent des CL (de Vay *et al.*, 2009). Leurs résultats suggèrent que plusieurs protéines Mgm1-l, placés sur les MMI de deux mitochondries en cours de fusion, se dimérisent en *trans* pour former des liens entre les deux mitochondries. En parallèle, les hétérodimères Mgm1-l/Mgm1-c, par leur activité GTPasique, déstabilisent les bicouches lipidiques des MMI favorisant ainsi leur fusion.

Joshi *et al.* ont confirmé le rôle de la CL dans la fusion des mitochondries par délétion du gène *CRD1*, impliqué dans la dernière étape de synthèse des CL. Ils ont aussi montré que la perte seule des CL ne suffit pas à bloquer la fusion. En effet, il est nécessaire d'avoir la double délétion $\Delta crd1/\Delta psd1$ (Le gène *PSD1* est impliqué dans la biosynthèse de la PE) pour observer une forte diminution de la fusion. L'état du réseau mitochondrial dépendant de l'équilibre entre fusion et fission, la diminution de la fusion entraîne une augmentation de la fission. De plus, le double mutant $\Delta crd1/\Delta psd1$ présente une forte diminution des protéines Mgm1-l et

Mgm1-c, qui est corrélée à une forte fragmentation des mitochondries ainsi qu'une diminution de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les CL semblent donc effectivement être impliquées dans la fusion *via* leur interaction avec la protéine Mgm1p et la fusion semble importante pour le maintien de l'ADNmt (Joshi *et al.*, 2012).

Les travaux de Ban *et al.* sur la protéine humaine OPA1 ont montré des résultats allant dans le même sens que ceux obtenus avec la protéine Mgm1p chez la levure. Ils ont montré notamment que la fusion des membranes mitochondriales nécessite la présence d'isoformes longues et courtes interagissant avec la MMI. *In vitro*, l'activité GTPase basale de la protéine OPA1 est augmentée d'un facteur 100 en présence de CL (Ban *et al.*, 2010). Des mutations dans le gène *OPA1* sont associées à l'atrophie optique dominante, une neuropathie des cellules ganglionnaires de la rétine. Mais les conséquences des mutations de la tafazzine dans le BTHS sur la fusion ne sont pas encore bien documentées. Un dysfonctionnement de la fusion pourrait expliquer, au moins partiellement, la déstabilisation de l'ADNmt observée dans des modèles levure du BTHS (Jiang *et al.*, 2000 # de Taffin de Tilques *et al.*, 2017).

□ La fission

Concernant la fission, dans des expériences *in vitro*, les CL ont aussi été trouvées liées à la protéine Drp1p qui est impliquée dans les processus de fission mitochondriale. Ces CL stimulent l'activité GTPase de cette protéine. Cette observation, la localisation de la protéine Drp1p au niveau de la membrane mitochondriale externe ainsi que la présence de certaines CL au niveau de cette même membrane externe, notamment au niveau des sites de contact, nous amènent à penser que les CL pourraient intervenir dans la fission des mitochondries (Ugarte-Urbe *et al.*, 2014 # Bustillo-Zabalbeitia *et al.*, 2014).

- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales

Plus de 99% des quelques 1 500 protéines mitochondriales sont importées depuis le cytosol. L'import protéique est donc essentiel au bon fonctionnement de la mitochondrie. L'implication des CL dans ce processus a été suggérée depuis maintenant longtemps. En effet, dès 1988, Ou *et al.* ont montré que les précurseurs de protéines mitochondriales, *via* leurs peptides signaux, ont la capacité de se lier avec une grande affinité sur les têtes polaires des

CL. Et ce, de façon spécifique puisque les autres phospholipides, y compris ceux chargés négativement, ne permettent pas cette liaison (Ou *et al.*, 1988).

Plus récemment, Jiang *et al.* ont montré que la délétion du gène *CRD1* chez *S. cerevisiae* entraîne un défaut d'import de protéines mitochondriales. Ils ont suivi l'import de deux précurseurs, l'un adressé à la membrane mitochondriale interne et l'autre à la matrice. L'import de ces précurseurs est diminué de 40 à 60 % chez le mutant $\Delta crd1$ versus le sauvage (WT). Par ailleurs, l'import mitochondrial est connu pour être dépendant du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$), or le mutant $\Delta crd1$ présente une diminution du $\Delta\Psi$. Il est donc probable que la diminution des CL, due à la perte du gène *CRD1*, entraîne une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire qui se traduit par une baisse du $\Delta\Psi$ ayant pour conséquence secondaire une baisse de l'import protéique (Jiang *et al.*, 2000).

Gebert *et al.* se sont intéressés plus précisément au processus de l'import au niveau de la membrane mitochondriale externe de levures ou de lymphoblastes de patients du BTHS. Chez la levure, ils ont montré que la délétion de gènes impliqués dans la biogénèse ou le remodelage des CL ($\Delta crd1$, $\Delta taz1$) associée à une délétion de gènes impliqués dans l'import de protéines au niveau de la membrane mitochondriale externe (gènes codant pour des sous-unités du complexe TOM *Translocase of the Outer Membrane* ou du complexe SAM *Sorting and Assembly Machinery*) induit des défauts de croissance supérieurs à ceux induits par les simples mutations. Les doubles mutants $\Delta taz1/\Delta tom5$ ou $\Delta crd1/\Delta tom5$ sont même « synthetic lethal ». Ceci montre une interaction génétique entre les CL et les complexes protéiques impliqués dans le processus d'import au niveau de la membrane mitochondriale externe. En utilisant des protéines mitochondriales radiomarquées, les auteurs se sont ensuite intéressés au processus d'import dans des mitochondries isolées à partir de levures mutantes $\Delta crd1$ ou $\Delta tam41$ (gènes impliqués dans la synthèse des CL) ou $\Delta taz1$ (impliqué seulement dans le remodelage). Ils ont aussi utilisé des lymphoblastes de patients atteints du BTHS. Leurs résultats montrent que l'absence de CL dans les simples mutants $\Delta crd1$ ou $\Delta tam41$, ou un changement qualitatif de la CL (moins de CL insaturée et plus de MLCL) dans le simple mutant $\Delta taz1$ entraîne une diminution de l'import de protéines mitochondriales. Bien que le flux de l'import de ces protéines soit diminué, la localisation des protéines mitochondriales qui sont importées n'est en rien modifiée. Cette déficience n'est donc que partielle, puisqu'un blocage total serait létal pour la cellule. De plus, ce ralentissement de l'import des protéines est

spécifique puisqu'il ne touche que certaines protéines mitochondriales. Parmi les protéines de la membrane mitochondriale externe, les protéines en tonneau β semblent être affectées ainsi que certaines protéines ayant des hélices α . Une analyse par électrophorèse blue native des complexes protéiques TOM et SAM montre des profils différents entre des complexes protéiques issus de cellules contrôles sauvages par rapport à des cellules déficientes en CL. Ceci suggère une implication des CL dans l'organisation de ces complexes protéiques (Gebert *et al.*, 2009).

Bien que le lien entre CL et import protéique mitochondrial reste flou, plusieurs études convergent vers l'idée d'une implication forte des CL dans ce processus. Cela pose donc la question de la qualité de l'import des protéines mitochondriales dans le cas du BTHS. Gebert *et al.* ont montré clairement une diminution de l'import de certaines protéines mitochondriales au niveau de mitochondries de patients. En outre, de nombreux modèles du syndrome de Barth indiquent que les mitochondries altérées ont un potentiel de membrane et une production d'ATP réduits (Saric *et al.*, 2016). Or l'import de certaines protéines mitochondriales dépend de l'un ou l'autre de ces paramètres (Neupert & Herrmann, 2007). Un défaut d'import, est donc fort probable dans le cas du BTHS mais reste à prouver.

- Cardiolipines et homéostasie du Fer

Le fer est un élément majeur de nos cellules, notamment par le fait qu'il entre dans la composition des centres Fer/Soufre (Fe/S) présents dans de nombreuses enzymes. Parmi ces enzymes, on peut notamment citer des enzymes mitochondriales telles que l'aconitase, la succinate déshydrogénase, l'ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase, impliquées dans le cycle de Krebs et les OXPHOS. L'activité de ces enzymes est diminuée chez des levures délétées pour le gène *CRD1* suggérant donc un lien entre protéines à centre Fe/S et les CL.

Patil *et al.* se sont particulièrement intéressés à l'homéostasie du fer chez la levure. Cette homéostasie est intimement liée aux protéines Fe/S, dont la biogénèse débute dans la mitochondrie. (Patil *et al.*, 2013). Pour explorer l'importance des CL dans ces processus, ils ont étudié la biogénèse des centres Fe/S dans un mutant $\Delta crd1$, donc en absence totale de CL. Cette délétion impacte fortement l'homéostasie du fer. Cela se traduit par une augmentation du niveau de fer dans la mitochondrie, une surexpression des gènes de l'opéron du fer

(Rutherford *et al.*, 2003), ainsi qu'une sensibilité accrue à l'ajout de fer ou l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les auteurs se sont aussi intéressés à l'activité de différentes enzymes Fe/S. Toutes avaient leur activité diminuée. Le fait que toutes les protéines Fe/S mitochondriales et cytosoliques soient affectées amène à penser que le défaut de régulation de l'homéostasie du fer dans le mutant $\Delta crd1$ a lieu à des étapes précoces, probablement dès la biogénèse des centres Fe/S. D'ailleurs, la double délétion $\Delta crd1/\Delta isu1$ (Le gène *ISU1* est impliqué dans la biogénèse des centres Fer/soufre) induit un plus fort défaut de croissance comparé aux simples délétants $\Delta crd1$ ou $\Delta isu1$. Ce fort défaut de croissance montre une interaction génétique entre le gène *CRD1* et le gène *ISU1*. Cela renforce l'idée d'un défaut de biogénèse des centres Fe/S induit par un défaut en CL. L'implication précise des CL dans l'homéostasie du fer est donc encore un peu énigmatique, mais paraît assez évidente (Patil *et al.*, 2013).

Étant donné l'impact de l'absence de CL sur l'homéostasie du fer, il est intéressant de se demander quel peut bien être l'impact des mutations du gène *TAZ* sur l'homéostasie du fer chez les patients BTHS?

Dans le cas de mutations de la tafazzine, les conséquences sont moins drastiques. En effet, alors que l'absence de la protéine Crd1p bloque totalement la synthèse de CL, la perte de la tafazzine n'entraîne qu'une diminution partielle du pool de CL. Cependant, la composition de ces CL résiduelles est altérée. Il serait donc intéressant de mener la même étude que celle du mutant $\Delta crd1$ avec un mutant $\Delta taz1$. Il est en tout cas probable que le syndrome de Barth se traduise par un défaut de l'homéostasie du fer, car des mutations dans le gène *ISCU*, l'homologue humain du gène de levure *ISU1*, conduisent à des symptômes similaires à ceux du BTHS : déficience de la succinate deshydrogénase, cardiomyopathie, acidose lactique, faiblesse musculaire, intolérance à l'exercice (Mochel *et al.*, 2008). Des mutations dans certains gènes codants pour des protéines de la machinerie de biosynthèse des protéines Fe/S altèrent aussi, comme les mutations de *TAZ*, la morphologie de la membrane mitochondriale interne (Biederbick *et al.*, 2006). Enfin, et surtout, les protéines Fe/S sont des composants essentiels des complexes des OXPHOS. Un défaut de biogénèse de ces protéines Fe/S pourrait donc être l'une des causes des défauts respiratoires des cellules de patients BTHS.

Les liens entre les signes cliniques du BTHS et les défauts biochimiques observés dans les cellules des patients restent à décortiquer, et l'homéostasie du fer pourrait être l'une des nombreuses pièces du puzzle !

- Cardiolipines et mitophagie

Du fait de l'importance de la mitochondrie pour le bon fonctionnement de la cellule, mais aussi de son effet de « bombe à retardement » en cas de dysfonctionnement (génération de ROS, relargage de médiateurs de mort...), les systèmes de contrôle qualité mitochondriaux sont cruciaux. Parmi ces systèmes, il en est un qui implique les CL : la mitophagie.

Bien décrite, la mitophagie fait intervenir de nombreux acteurs selon deux voies. La première fait intervenir la protéine PINK, une kinase qui, en cas de dommage à la mitochondrie, va activer une ubiquitine ligase E3. Cette ubiquitine ligase E3 va ubiquitinyler différentes protéines au niveau de la membrane mitochondriale externe qui vont alors être reconnues par des protéines adaptatrices. Ces dernières interagissent alors avec la protéine LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) présente dans les membranes de phagophores permettant ainsi la séquestration des mitochondries puis leur dégradation. La seconde voie est indépendante de l'ubiquitinylation et permet le recrutement direct de la protéine LC3 via des récepteurs. Parmi ces récepteurs, la majeure partie sont des récepteurs protéiques avec des domaines LIR (*LC3 interacting region*) : FUNDC1, NIX, BNIP3, BCL2L13 (Vigié & Camougrand, 2017). Cependant, récemment, il a été montré que les CL pouvaient aussi interagir avec la protéine LC3 et jouer le rôle de récepteur. Pour jouer ce rôle, il est nécessaire que la CL, connue pour être majoritairement sur la membrane mitochondriale interne, se relocalise sur la membrane mitochondriale externe.

L'équipe de Chu a montré, en effet, que l'induction de la mitophagie provoque une externalisation des CL dans des cultures primaires de neurones ou dans des cellules SH-SY5Y (lignée issue d'une biopsie de neuroblastome) (Chu *et al.*, 2013). Ainsi, les CL, qui sont physiologiquement minoritaires au niveau de la membrane mitochondriale externe ($\approx 0,8\%$ des CL), sont augmentées d'un facteur dix lorsque la mitophagie est induite. L'absence de la protéine PLS3 (protéine qui permet la translocation de phospholipides à travers les

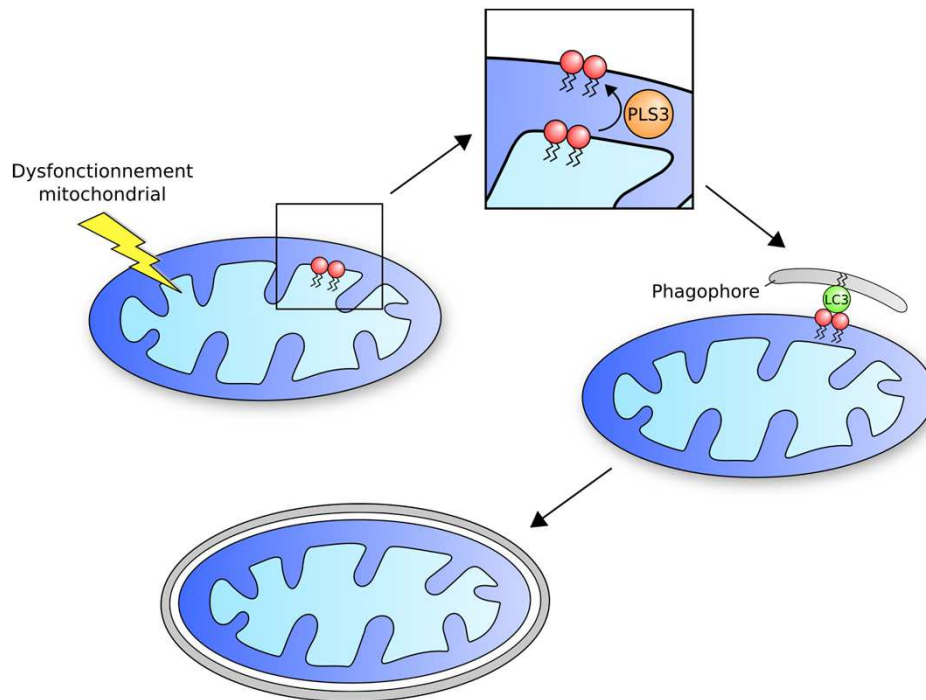


Figure 31 : Schéma récapitulant le rôle des cardiolipines dans la mitophagie. Un stress au niveau de la mitochondrie se traduit par une externalisation des CL à la surface des mitochondries. Ce processus est médié par la phospholipase PLS3. Les CL sont alors accessibles à la protéine LC3. Les protéines LC3, sous leur forme active (LC3- II) sont conjuguées à des phosphatidylethanolamines (PE) *via* leur domaine C-terminal et reconnaissent les CL *via* leur domaine N-terminal. Elles servent donc de lien entre le phagophore et la mitochondrie, et permettent donc la séquestration et la dégradation de ces dernières. (source : Pierre Vigié)

membranes), obtenue par ARNi, bloque cette translocation qui est donc dépendante de la protéine PLS3. L'externalisation des CL est accompagnée par une relocalisation de la protéine LC3 au niveau des membranes mitochondriales, un adressage des mitochondries aux lysosomes et une diminution quantitative des protéines mitochondriales. Tous ces paramètres indiquent donc une induction de la mitophagie (Fig. 31).

Les CL sont donc importantes pour la mise en place d'une des voies de la mitophagie. La tafazzine étant impliquée dans le remodelage des CL, on peut se demander quelles seront les conséquences sur la mitophagie de la perte de cette protéine chez les patients BTHS. Hsu *et al.* ont étudié les conséquences d'un knock-down de la tafazzine dans des cellules MEF (*mouse embryonic fibroblast*). Cette lignée exprime un shARN (*Small Hairpin ARN*) dirigé contre l'ARNm de la protéine TAZ. Ils ont montré que le CCCP (Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazine) induit efficacement la mitophagie dans des cellules sauvages alors que cette induction est bloquée dans les cellules déficientes en tafazzine (MEF *TazKD*). La ré-expression de la protéine TAZ à partir d'un plasmide permet de restaurer la capacité à induire la mitophagie dans les cellules MEF *TazKD*. Ceci tend à confirmer que le défaut de mitophagie est bien dû à la perte de la protéine TAZ. Dans un deuxième temps, l'équipe de Hsu a suivi la localisation de la protéine LC3 grâce à une protéine chimère LC3-GFP. Curieusement, en essayant d'induire la mitophagie à l'aide de CCCP dans les cellules MEF *TazKD*, ils ont montré que, malgré l'absence de mitophagosomes, la protéine LC3 présentait tout de même un profil ponctiforme, caractéristique de la présence de phagosomes. Il semble donc que la perte de la protéine TAZ ne bloque que l'autophagie spécifique des mitochondries mais pas les autres voies d'autophagie.

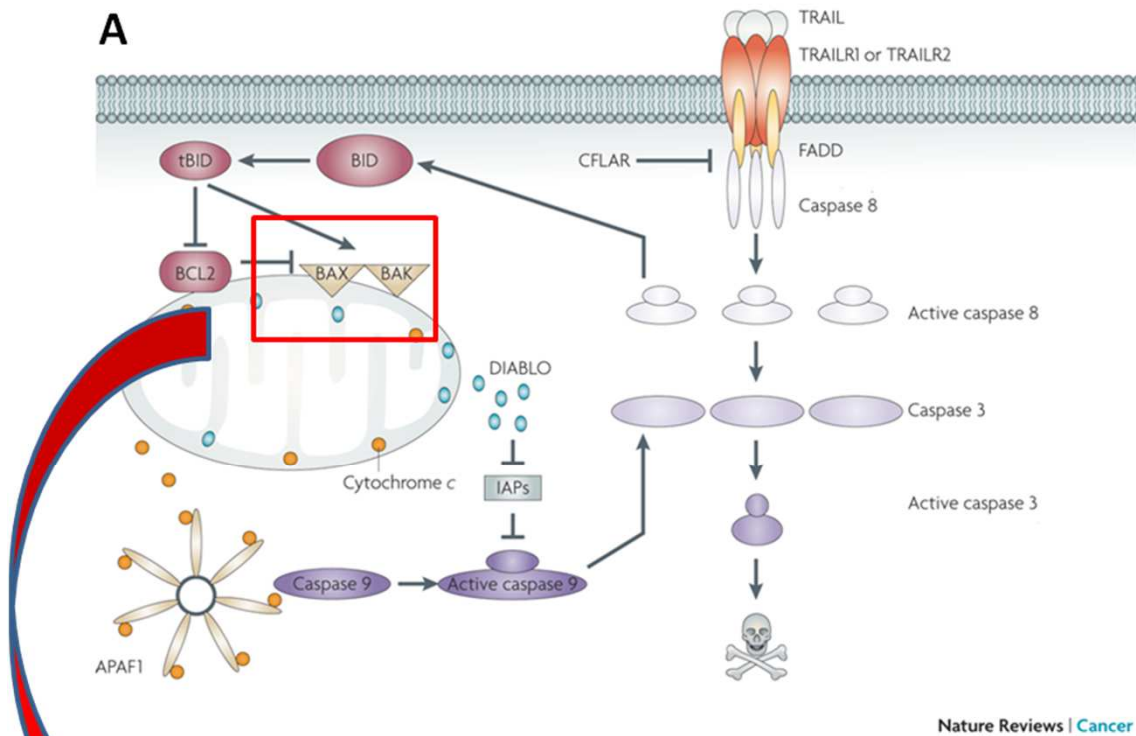
Les travaux de Acehan *et al.* nuancent cet effet de blocage de la mitophagie consécutivement à l'absence de la tafazzine. En effet, ils ont observé, par microscopie électronique, des structures pouvant correspondre à des mitochondries dégradées par mitophagie, dans leur modèle murin du BTHS (Acehan *et al.*, 2011).

Ces résultats contradictoires ne permettent donc pas de conclure avec certitude sur l'effet de la diminution des CL dans le BTHS sur la mitophagie. Cependant, il existe de nombreux récepteurs (Vigié & Camougrand, 2017) qui pourraient induire la mitophagie en cas de défaut des CL.

- Cardiolipines et apoptose

Il existe deux voies différentes conduisant à l'apoptose. La première voie, dite « extrinsèque », passe *via* l'activation de récepteurs membranaires de la famille TNF (*Tumor necrosis factor*) à partir de facteurs extérieurs à la cellule. La seconde voie, dite « intrinsèque », implique plus directement la mitochondrie, et notamment les CL. Elle est induite par des dysfonctionnements internes à la cellule tels que le stress du réticulum endoplasmique, les radiations, les métaux lourds, l'hypoxie ou encore les ROS... Lorsque ces dysfonctionnements cellulaires sont trop importants et qu'il n'y a plus de bénéfice à maintenir cette cellule en vie, l'apoptose est induite. Nous allons voir comment les CL sont impliquées dans l'induction de ces voies.

Un premier processus passe par le cytochrome c (Cyt_c), qui est connu pour interagir de deux façons avec les CL. La première interaction est une interaction électrostatique relativement faible entre le cytochrome c et les CL. Elle permet au cytochrome c de rester associé au feuillet externe de la MMI facilitant ainsi le transfert des électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire. La seconde interaction consiste en une interaction hydrophobe au niveau d'un site particulier sur le cytochrome c appelé site C. Cette seconde interaction semble impliquée dans l'apoptose (Hüttemann *et al.*, 2011). Le site C présente une cavité hydrophobe dans laquelle vient se glisser une chaîne acyle de la CL, les autres chaînes restant intégrées dans la membrane mitochondriale. Cette liaison est réalisée exclusivement avec des CL insaturées. Le Cyt_c est donc lié à la membrane via la CL, provoquant un changement de sa structure tertiaire. En effet, le Cyt_c va adopter une conformation intermédiaire entre son état « normal » et sa forme dénaturée, permettant à des petites molécules telles que le peroxyde d'hydrogène d'accéder à son hème et son atome de fer. Ce changement de conformation est accompagné d'un changement de propriétés qui entraîne un changement de fonction. Entre autre, le Cyt_c perd sa faculté à transporter les électrons entre les complexes III et IV, bloquant ainsi la chaîne respiratoire qui va produire d'avantage de ROS. Le Cyt_c va aussi acquérir une fonction peroxydase. En effet, le Cyt_c couplé à la CL va donc détoxifier les peroxydes, notamment le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Cette détoxification va se faire au détriment des CL qui vont être peroxydées. Or, les CL peroxydées perdent leur affinité pour le Cyt_c qui va alors être relargué dans l'espace inter-membranaire.



Nature Reviews | Cancer

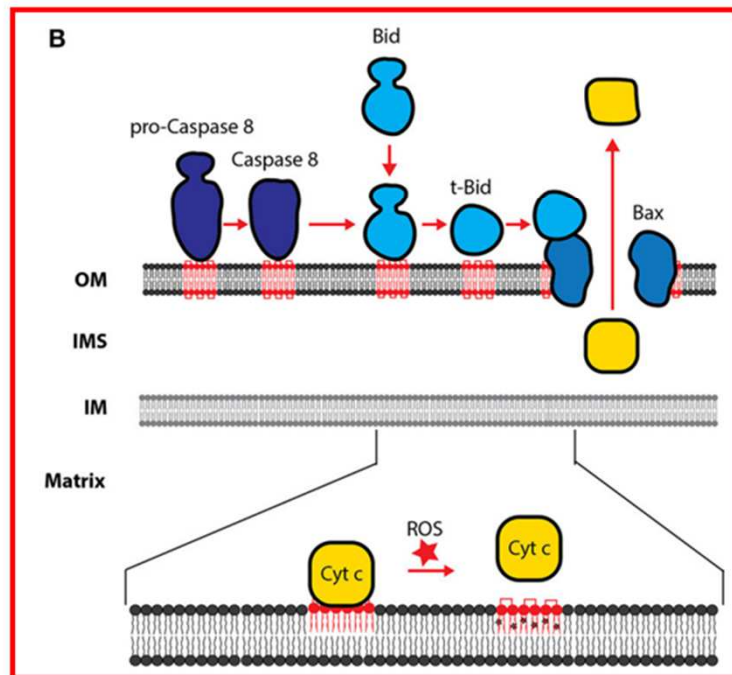


Figure 32 : Activation de la voie Bid. La liaison du ligand TRAIL sur ses récepteurs entraîne l'oligomérisation de ces derniers et le recrutement des protéines FADD et procaspases 8, formant ainsi le complexe DISC. Le complexe DISC entraîne la clivage de la caspase 8 qui, ainsi activée, va activer à son tour la caspase 3 et tronquer la protéine Bid. La protéine Bid tronquée (tBid), via son association aux CL, va interagir avec bax et Bak pour former un pore au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ce pore permet le relargage dans le cytosol de cytochromes C, et de Smac/Diablo. Le CytC va interagir avec Apaf1 et la caspase 9 pour former un « apoptosome » capable d'activer la caspase effectrice 3. Quant aux protéines Diablos, elles vont lever la répression de la protéine IAP sur les caspases. La caspase 3 activée peut à son tour cliver la procaspase 8 afin d'amplifier le signal apoptotique. (d'après Johnstone *et al*, 2008 # Dudek, 2017))

Une fois dans l'EIM, le Cytc va passer dans le cytosol où il va déclencher l'apoptose. Par ailleurs, Priault *et al.* ont montré que l'expression hétérologue de la protéine pro-apoptotique Bax chez la levure induit une oxydation des phospholipides et notamment des CL (Priault *et al.*, 2002).

Un deuxième système implique les voies intrinsèques et extrinsèques qui ne sont pas cloisonnées. Ainsi, au cours de l'activation de la voie extrinsèque, la voie intrinsèque peut être activée par l'intermédiaire de la protéine Bid et des CL. La voie TRAIL (*Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) en est un exemple (Ndebele *et al.*, 2008). Dans cette voie, le ligand TRAIL se fixe, notamment dans les cellules cancéreuses, aux récepteurs DR4 et DR5. Ces récepteurs vont recruter, au niveau de leurs « domaines de mort », des protéines adaptatrices FADD (*FAS-associated protein with death domain*) et les procaspases 8 pour former un complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Le complexe DISC va alors favoriser le clivage de la procaspase 8 en caspase 8 active. Cette caspase 8 est au carrefour des voies extrinsèques et intrinsèques puisqu'elle peut soit directement activer la caspase 3 en clivant la procaspase 3, soit cliver la protéine Bid pour générer une protéine Bid tronquée (tBid). La protéine Bid appartient à la famille des facteurs pro-apoptotiques Bcl2. Le fragment tBid est alors relocalisé à la membrane mitochondriale externe (Fig. 32) (Lutter *et al.*, 2000). En parallèle de l'activation du complexe DISC, Ndebele *et al.* ont montré que l'activation de TRAIL engendrait un défaut d'homéostasie des phosphatidylcholines, induisant une augmentation des diacyl-glycérols (DAG). Les DAG sont nécessaires pour l'activation des kinases PKC δ , qui vont à leur tour activer par phosphorylation la protéine PLS3. Cette protéine PLS3, une phospholipide scramblase localisée à la mitochondrie, va permettre la relocalisation des CL à la MME. Au niveau de la MME, les CL externalisées recrutent tBid qui pourra alors favoriser l'homo-oligomérisation des protéines Bax ou Bak pour former un pore par lequel pourront sortir différents facteurs pro-apoptotiques tels que l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), Smac/Diablo (impliqués dans l'activation des caspases via l'inhibition des IAP, « *Inhibitor of Apoptosis Protein* ») et surtout le cytochrome c. En outre, Esposti *et al.* ont montré une diminution des CL au cours de l'apoptose et une augmentation des MLCL. Ils ont montré, par ailleurs, que ces MLCL avaient aussi la capacité de lier, avec une affinité plus forte que les CL, les protéines tBid (Esposti *et al.*, 2003).

Il est maintenant bien connu que les cellules de patients du BTHS présentent une diminution en CL, une diminution des chaînes acyles insaturées au sein des CL restantes, et une augmentation en MLCL (Kuijpers *et al.*, 2004). Aux vues de l'importance des CL dans l'induction de l'apoptose, nous pourrions vraisemblablement nous attendre à une forte induction de cette voie dans les cellules de patients. D'autant que nous avons vu précédemment que la protéine tBid, induisant un relargage de cytochrome c via son interaction avec Bax, a une forte affinité pour les MLCL qui sont justement accrues dans le cas du BTHS. Mais curieusement, il n'en est rien... Valianpour *et al.*, basés sur cette hypothèse, ont comparé l'induction de l'apoptose dans des lymphoblastes de patients du BTHS et dans des lymphoblastes contrôles. Ils se sont basés sur différents critères : clivage de la protéine PARP, qui est un substrat connu de la caspase 3, clivage et relocalisation membranaire de la protéine pro-apoptotique Bid, relargage du cytochrome c dans le cytosol, sensibilité au ligand Fas qui stimule la voie extrinsèque de l'apoptose. Parmi tous ces critères, aucun ne différait entre les cellules sauvages et les cellules de patients. L'altération des CL induites par le défaut en tafazzine ne semble donc pas favoriser l'induction de l'apoptose (Valianpour *et al.*, 2005).

Récemment, Kuijpers *et al.* ont observé un fort marquage des neutrophiles de patients à l'annexine V, suggérant une augmentation de l'apoptose induite par le BTHS. Mais curieusement, aucun signe d'apoptose n'était associé à ce marquage chez plusieurs malades. D'ailleurs, la dégradation par les macrophages n'est pas augmentée, ce qui aurait pu expliquer la neutropénie observée chez de nombreuses personnes atteintes par le BTHS. Plusieurs questions se posent alors : puisque l'annexine se fixe d'avantage, et sachant que la PS n'est pas externalisée, à quoi se fixe-t-elle ? Est-ce que dans les cas des cellules de patients l'annexine reconnaît un autre substrat que les PS ?...Toujours est-il que, malgré le postulat de départ, aucune induction majeure de l'apoptose n'est induite dans les cellules, malgré un profil cardiolipidique altéré. Dans le cas des neutrophiles, une explication peut être avancée. En effet, les neutrophiles sont des cellules connues pour exprimer physiologiquement très peu de cytochromes c. Or, nous avons vu que l'un des principaux rôles des CL dans l'apoptose intrinsèque était le relargage des Cyt c. Il est donc possible d'imaginer que l'apoptose des neutrophiles passe essentiellement par la voie extrinsèque et n'est donc que peu dépendante de l'état des CL (Kuijpers *et al.*, 2004).

Gonzalvez *et al.* se sont intéressés aussi à l'apoptose dans des lymphoblastes immortalisés de patients du BTHS. Ils se sont plus précisément concentrés sur l'étude de la voie intrinsèque de l'apoptose. De façon intéressante, leurs résultats montrent que cette voie est bloquée dans les cellules de malades. En effet, ils ont montré que la stimulation de l'apoptose n'entraîne pas, comme c'est le cas dans les cellules sauvages (contrôle), d'activité des caspases 3 et 8, ni d'exposition de PS à la surface de la cellule, qui sont autant de signes de l'apoptose. Ils ont, par ailleurs, observé dans les lymphoblastes contrôles, que la caspase 8 activée s'associe à la protéine Bid et aux CL des membranes mitochondriales, formant ainsi une « plateforme » nécessaire au clivage de Bid en t-Bid. Or, ces chercheurs n'ont pas pu observer la présence de caspase 8 au niveau des membranes mitochondriales des cellules de patients. En revanche, ils ont montré que l'ajout de tBid est capable d'induire l'apoptose dans les cellules contrôles et dans les cellules de malades. D'ailleurs, les cellules de malades sont plus sensibles que les cellules contrôles à l'ajout de tBid, probablement à cause de leur enrichissement en MLCL qui ont une très forte affinité pour tBid. Cela indique que le blocage de l'apoptose dans les « lymphoblastes BTHS » se fait en amont de l'action de tBid, donc au niveau de sa génération par la caspase 8. Puisque la caspase 8 activée ne peut se fixer aux membranes mitochondriales, il est probable que cette liaison nécessite des CL fonctionnelles, or, dans le cas du BTHS, ces CL sont diminuées et altérées. Sans cette liaison, le clivage de Bid par la caspase 8 est diminué. Or tBid est essentiel pour l'oligomérisation de Bax ou Bak, elle-même nécessaire au relargage du cyt c et donc à l'induction de l'apoptose (Fig. 32) (Gonzalvez *et al.*, 2013).

Alors que l'on aurait pu croire que les défauts en CL, induits par le dysfonctionnement de la tafazzine dans le BTHS, allaient fortement induire l'apoptose, les résultats de plusieurs groupes montrent que l'apoptose n'est pas d'avantage induite dans les cellules malades. Au contraire, un blocage de l'apoptose intrinsèque, très certainement dû aux CL altérées, a même été observé dans des lymphoblastes de patients.

```

Homo-s -----
Saccharomyces-c -----
Mus-m -----
Drosophila-m MFMVVCNLRPPGHVGAASAARNINWLISEGYTPPIRAMARPVYQAEARVPVDERYPGS 60
Danio-r -----
Caenorhabditis-e -----

Homo-s -----MPL 3
Saccharomyces-c -----MS-----FRDVL--ERGD 11
Mus-m -----MPL 3
Drosophila-m QQDRKD IATQIVRSSKPKDLRPPSPPTPSQTLNSSLPPMSDQDADPSLDVPTGVAMPY 120
Danio-r -----MPL 3
Caenorhabditis-e -----MSG----TMRDKTNDVQGF 15

Homo-s HVKWFPPAV--PRLTWLTIASSVVMGLVGTYSCEF--TKYMNHLTVHNREVLVELIEKRGF 59
Saccharomyces-c EFLEAYPR--RSPLWRFLSYSTSLTFGVSKLLFTCYNVKINGF-EKLETALERSKRE 67
Mus-m HVKWFPPAV--PRLTWLTIASSVVMGLVGTYSCEF--TKYMNHLTVHNREVLVELIENRGP 59
Drosophila-m NIDWIFPRLRNP SKFWYVVSQFVVSAGVIFSKVV--LMFLNKPERVYANREELIQ LITRKP 178
Danio-r EVTWFPQC--PRLGWRISRVVMGVGSYSYLW--TKYFNSIMVHNQDVLNLDVDERPQ 59
Caenorhabditis-e RFAPWFPKK--PSLLYRIKSYM TMSLVTSVSKLM-FLGGSNKLI CHNKETVFKILE--NP 70
.. :* . . . * . . . .

Homo-s ATPLITVSNHQSCMDPHLWGI LKLRHIWNLK-LMRWTPAAADICFTKELHSHFFSLGRC 118
Saccharomyces-c NRGLMTVMNMSMVDPLVWATLPYKLF TSLD-NIRWSLGAHNI CFQNKFLANFFSLGQV 126
Mus-m ATPLITVSNHQSCMDPHLWGI LKLRHIWNLK-LMRWTPAAADICFTKELHSHFFSLGRC 118
Drosophila-m GIPLITVSNHYSQCFDDPGLWGLPLGIVCNTY-KIRWSMAAHDICFTNKLHSLFPMFGKC 237
Danio-r DTPLITVSNHQSCMDPHIHWGLKFRQLWNLN-KMRWTPAASDICFTREFHSFFSRGRC 118
Caenorhabditis-e NOPLITVSNHRSNIDDPIMWCILKFRFWRVYKDRNRYTLAAHNICFTKQFHTIMFSLGRC 130
*:*:*:*:*:*:*:* * . * . . * . . . . * . . . . *

Homo-s VPCVRGAEFFQAENEGKGLDTRHMPGAGKRREKGDGVYQKGMDFILEK----- 168
Saccharomyces-c LSTERF-----GVGPFQGSIDASIRLLSPDDTLDE 157
Mus-m VPCVRG-----DGVYQKGMDFILEK----- 138
Drosophila-m IPVVR-----GIGVYQDAINLCIEK----- 257
Danio-r VPVVR-----GDGVYQKGMDFLLER----- 138
Caenorhabditis-e VPCVR-----GEGVYQKGMDFCVDM----- 150
: * . . . . * . . . . *

Homo-s -----INHGQVWHIFPEGVN-M---SSEFLRFKWGIGRLIAC 203
Saccharomyces-c WTPHSEVSSSLKAYSPPIIRSKPSSVHVYPEGVQLYPPFENSRYFKWGITRMILEA 217
Mus-m -----INHGQVWHIFPEGVN-M---SSEFLRFKWGIGRLIAC 173
Drosophila-m -----AALGHWHIFVPEGVN-M---DKEELRLKVGWGRILYES 292
Danio-r -----INQGEWHIFPEGVN-M---SGEFMRKIKWGIGRLIAC 173
Caenorhabditis-e -----INDNKGWHIFPEGVNCTL---ESEPLRFKWGIGRLVMDA 186
*:*:*:*:* * . . . . * . . . . *

Homo-s HLNPIIPLWVGMNDVLPNSPP-----YFPRFGQKITVLIGKPF SALPVLERLRAEN 256
Saccharomyces-c TKPPIVVPIFATGFEKIASEAVTDSMFRQILPRNFGSEINVTIGDPLNDD-LIDRYRKEW 276
Mus-m HLNPIIPLWVGMNDVLPNSPP-----YFPRFGQKITVLIGKPFSTLPVLERLRAEN 226
Drosophila-m PKTPIIPLMWHHEGMDLLENVPEP-----YVIQRGQVTLNVOQPIIDLNDFILD LKQRQ 345
Danio-r SLHPIIPLMWHIGMNDVLPNETP-----YIPRVQRITVLVIGKPF TVHRLVNALRAEN 226
Caenorhabditis-e KTDPIIPLVWCKEMEKVWPTQPP-----YYPKFGNTVIVHIGEPFLSDLKKTVLRSK 239
*:*:*:* . . . . * . . . . *

Homo-s KSA-----VEMRKALTDFIQEEFQHLKQAEQLHNHLQFG-- 291
Saccharomyces-c THLVEKYDPKNPNDLSDLEKYGKEAQDLRSRLAE LRAHVAEIRNEVRKLPREDPFRKS 336
Mus-m KSA-----VEMRKALTDFIQEEFQRLKMQAEQLHNHLQFG-- 261
Drosophila-m VPE-----PTARKLITDKIQEAFRDLRAETEKLHRERN-- 378
Danio-r TNP-----TEMRKIVTDYIQDEF RSLKAQAEALHRLQNH-- 261
Caenorhabditis-e LTT-----EQMRKIITDEVQTRMYQLGEKVDLPGKSSLE-- 274
* . . . . * . . . .

Homo-s -----R----- 292
Saccharomyces-c PSWVKRFNTEGKSDPDVKVIGENWAIIRMQKFLPEEGKPKGKDD 381
Mus-m -----R----- 262
Drosophila-m ----- 262
Danio-r -----T----- 262
Caenorhabditis-e -----ILRKNPPIEY----- 284

```

Figure 33 : Alignement de séquences en acides aminés de la tafazzine chez plusieurs espèces. Les séquences de la tafazzine humaine (*Homo sapiens*), de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), de souris (*Mus musculus*), de drosophile (*Drosophila melanogaster*), de poisson zèbre (*Danio rerio*) et de nématode (*Caenorhabditis elegans*) ont été alignées à l'aide du programme Clustal Ω (www.uniprot.org) et mettent en évidence des régions fortement conservées (surlignées en gris). Les positions marquées de * indiquent que les acides aminés y sont parfaitement conservés. Celles avec : indiquent que les acides aminés de cette position appartiennent à un groupe d'acides aminés présentant de fortes similarités. Enfin, celles avec . indiquent que les acides aminés de cette position appartiennent à un groupe d'acides aminés présentant de faibles similarités.

III.5. Modèles d'études du syndrome de Barth

Les premières études pour essayer de comprendre les causes génétiques et biochimiques du BTHS ont été menées sur des cellules de patients, notamment des biopsies musculaires (Barth *et al.*, 1983). Comme nous l'avons vu précédemment, ces techniques étant invasives, d'autres types cellulaires issus de patients ont été utilisés : fibroblastes (Valianpour *et al.*, 2003), lymphoblastes (MacKenzie *et al.*, 2006 # Xu *et al.*, 2016), ou encore neutrophiles (Kuijpers *et al.*, 2004).

Mais ces échantillons étant difficiles à obtenir et en quantités limitées, il a fallu mettre en place d'autres modèles. La pertinence de ces modèles est d'autant plus grande que le gène *TAZ* est très conservé dans l'évolution (Fig. 33). Ainsi, par exemple, le gène humain est capable de compléter la délétion du gène *TAZ1* chez la levure (d'Adamo *et al.*, 1997 # Ma *et al.*, 2004).

III.5.1. Les cellules « human induced Pluripotent Cells »

Depuis le développement des cellules iPSC par Takahashi et Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006), ces cellules ont été utilisées pour de nombreuses applications, notamment la modélisation de pathologies. Ainsi, plusieurs lignées de cellules iPSC ont été générées à partir de cellules de patients. Dudek *et al.* sont les premiers à avoir généré des lignées iPSC à partir de fibroblastes de trois patients du BTHS (Dudek *et al.*, 2013). Ces cellules reprogrammées exprimaient les défauts caractéristiques des cellules de patients : diminution de la quantité de CL et de l'insaturation de leurs chaînes acyles, augmentation de la quantité de MLCL, déstabilisation des supercomplexes induisant une diminution de la respiration et une augmentation des ROS. Les auteurs ont, cependant, observé que le contenu en CL portant quatre acides linoléiques est diminué dans les cellules iPSC par rapport aux cellules de patients, et plus particulièrement par rapport aux cellules cardiaques. Ces CL tétralinoléiques sont considérées comme particulièrement optimisées pour l'activité mitochondriale. Or, les cellules iPSC utilisent le glucose, donc la fermentation, comme principale source d'énergie.

Dudek *et al.* proposent donc que cette diminution en acides linoléiques traduise un moindre besoin d'optimisation de la respiration.

L'un des intérêts majeurs des cellules iPSC est de pouvoir ensuite les différencier en n'importe quel autre type cellulaire. En cela, les travaux de Wang *et al.* sont particulièrement intéressants puisqu'ils ont différencié des cellules iPSC de patients du BTHS en cardiomyocytes, qui sont l'un des types cellulaires les plus affectés de ce syndrome (Wang *et al.*, 2014). Ces « cardiomyocytes BTHS » présentent un profil en CL altéré, une respiration maximale et production d'ATP diminuées. Curieusement, les auteurs ont aussi mis en évidence une diminution de la taille des mitochondries et une augmentation de la respiration basale, ce qui est contraire à ce qui a été décrit pour des cellules du myocarde de patient (Barth *et al.*, 1983). Le manque actuel de recul sur ce modèle ne permet pas d'apporter de réponse à cette variation. Ces cardiomyocytes BTHS ont ensuite été étudiés par la technique « heart on chip », qui consiste à ensemercer des cardiomyocytes sur des puces en élastomères, recouvertes de lignes de fibronectine (une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui favorise l'adhésion des cellules), le tout supporté par une lamelle de verre. En cinq jours de culture, les cardiomyocytes s'auto-organisent en myocarde sur la puce, ce qui permet alors de tester les capacités contractiles des cardiomyocytes. Cette technique a montré que les cardiomyocytes générés à partir de cellules iPSC de patients du BTHS ont des capacités de contraction diminuées par rapport aux cardiomyocytes contrôles. Cela s'explique notamment par une désorganisation des sarcomères. Ce modèle de cellules iPSC différenciées en cardiomyocytes a donc mis en évidence le rôle de la tafazzine dans l'organisation des sarcomères, ce qui en fait un bon modèle pour comprendre la cardiomyopathie observée chez les patients. Par ailleurs, ce modèle permet la recherche de molécules thérapeutiques, et a déjà montré un effet bénéfique d'un ajout d'acide linoléique ou d'antioxydant (Wang *et al.*, 2014).

Une des principales limites du modèle iPSC à ce jour est la variabilité génétique et épigénétique qui pourrait exister entre les souches, rendant difficile la comparaison entre cellules iPSC générées à partir de cellules de patients et celles générées à partir de sujets sains pour contrôle. Un moyen de contourner ce problème est d'utiliser des stratégies de modification du génome, notamment le système CRISP/Cas9, pour générer des mutations

dans les cellules iPSC contrôles. Ainsi les lignées mutantes et contrôles sont isogéniques, excepté pour le gène mutant (Wang *et al.*, 2014).

III.5.2. Modélisation chez la souris

Les souris sont, à ce jour, les seuls organismes mammifères utilisés pour modéliser le BTHS. Le premier modèle murin a été généré par Acehan *et al.* en 2011 (Acehan *et al.*, 2011). Pour ce faire, ils ont créé une lignée *knockdown* de la tafazzine en insérant, dans le chromosome 6, une cassette permettant l'expression d'un shARN dirigé contre l'ARNm de TAZ, contrôlé par un système Tet-On. Le *knockdown*, induit par la doxycycline présente dans la nourriture, est efficace puisqu'il induit une diminution de 97% de la quantité de tafazzine dans le cœur et de 86% dans les muscles squelettiques. Ce modèle *TAZ KD* présente une diminution des CL et une saturation des chaînes acyles de ces CL dès les premiers mois mais les symptômes ne sont vraiment marqués qu'à 8 mois. A cet âge, les souris *TAZ KD* montrent des morphologies mitochondriales anormales, avec des crêtes en « pelures d'oignons » et des mitochondries de tailles hétérogènes. Ces modèles présentent aussi des défauts cardiaques, notamment une dilatation du ventricule gauche et une diminution de la fraction de sang éjecté par ce ventricule, ce qui est similaire aux défauts observés chez les patients.

Des résultats similaires ont été obtenus par Soustek *et al.* qui ont eux aussi généré un modèle murin *TAZ KD* par shARN inductible par la doxycycline (Soustek *et al.*, 2011).

Mais il semblerait que la doxycycline qui est utilisée dans ces modèles inductibles puisse influencer par elle-même sur la dilatation du ventricule gauche (Vinet *et al.*, 2008). De plus, le shARN pourrait avoir des effets « hors cible ». Ces modèles inductibles présentent donc des limites. Pour contourner ces problèmes, Cadalbert *et al.* (Cadalbert *et al.*, 2015) ont généré un modèle *knockout* du gène *TAZ* (*TAZ KO*). Ils ont donc généré une lignée de cellules souches embryonnaires de souris *TAZ KO* et ont ensuite injecté ces cellules dans des blastocystes. Ils ont donc obtenu des souris chimériques avec des tissus issus des cellules souches *TAZ KO* et d'autres issus des cellules du blastocyste. Le pourcentage de chimérisme est suivi par un gène rapporteur influençant la couleur du pelage. Cadalbert *et al.* ont montré que les souris mâles mutantes obtenues sont stériles, du fait d'un blocage de la méiose, processus essentiel à la

spermatogénèse. Mais du fait de cette stérilité, il n'est pas possible d'obtenir de lignées descendantes non chimériques. Seule cette génération de souris peut donc être étudiée, mais les tissus peuvent être composés de cellules saines et malades.

Il n'existe donc pas de modèle murin parfait, mais ces modèles ont permis tout de même d'apporter des éléments pour une meilleure compréhension du BTHS.

III.5.3. Modélisation chez la drosophile

Des mutants de la tafazzine ont aussi été générés chez la drosophile. Pour ce faire, l'équipe de M. Schlame a procédé par excision imparfaite d'un élément mobile « P », localisé en amont du gène *Taz*, entraînant la délétion d'une partie de ce gène (Xu *et al.*, 2006). Cette délétion entraîne notamment une faiblesse musculaire, des défauts du lipidome et de la morphologie mitochondriale, qui sont des symptômes caractéristiques du BTHS. Du fait de la grande vitesse de battement des ailes (100 battements par seconde), les cellules des muscles du vol requièrent énormément d'énergie et sont très enrichies en mitochondries. Acehan *et al.* ont notamment mis en évidence, à l'aide de ces cellules, l'importance de la cardiolipine pour l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase (Acehan *et al.*, 2011). Enfin, la drosophile possède, tout comme l'Homme, plusieurs isoformes de la tafazzine générées par épissage alternatif (trois isoformes sont reportées sur www.uniprot.org). La drosophile pourrait donc servir de modèle pour l'étude de l'importance de ces différentes isoformes.

III.5.4. Modélisation chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*), par sa transparence et son développement externe, est un modèle pertinent pour suivre le développement embryonnaire. C'est dans cette optique que Khuchua *et al.* ont modélisé le BTHS dans cet organisme (Khuchua *et al.*, 2006). Le *knockdown* de la tafazzine par la technique des morpholinos, interférant avec la traduction ou l'épissage correct des ARNm, leur a permis de montrer l'importance de cette protéine dans le développement des poissons, notamment pour le cœur, la queue et les yeux. L'un des points forts de ce modèle est que le phénotype peut être modulé par la quantité de morpholinos

injectés dans les œufs. Les défauts anatomiques et fonctionnels du cœur en font aussi un bon modèle pour comprendre les défauts cardiaques des patients.

III.5.5. Modélisation chez le nématode

Aucun modèle du BTHS chez le ver n'est rapporté dans la littérature à notre connaissance. *Caenorhabditis elegans* possède pourtant un orthologue du gène *TAZ*, le gène *acl-3* (www.wormbase.org), qui possède 42% d'identité avec le gène humain. Des travaux de Agnès Delahodde (i2bc, Paris-Saclay) ont montré que le *knockdown* de ce gène, par ARN interférence, induit une sensibilité accrue au bromure d'éthidium et une diminution de la ponte. Le *knockout* du gène *acl-3* induit quant à lui un défaut dans le développement larvaire. Du fait de ces phénotypes bien marqués, *C. elegans* pourrait être un bon organisme modèle pour l'étude du BTHS.

III.5.6. Modélisation chez la levure

Rapidement le BTHS a été modélisé chez la levure, principalement *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle a notamment permis de démontrer la fonction acyltransférase de la protéine Taz1p (Testet *et al.*, 2005) ainsi que de comprendre en quoi les différentes mutations du gène *TAZ1* impactent la fonction de la tafazzine. L'équipe de S. Claypool a ainsi modélisé chez la levure différentes mutations retrouvées chez des patients et mis en évidence sept catégories de mutations différentes :

- Mutations engendrant des protéines tronquées, suite à des décalages du cadre de lecture ou à des défauts d'épissage
- Mutations induisant une mauvaise localisation de la tafazzine dans la mitochondrie, favorisant son agrégation
- Mutations donnant des protéines mal assemblées
- Mutations induisant une perte de l'activité catalytique de la tafazzine
- Mutations générant un allèle hypomorphe, codant pour une protéine avec une activité transacylase réduite

Model organism	General phenotype	Mitochondrial events
Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Temperature-sensitive growth on a non-fermentable carbon source 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal morphology • Partial uncoupling • Reduced osmotic stability • Increased oxidative stress * • Reduced stability of respiratory supercomplexes • Disruption of iron homeostasis
Fly <i>Drosophila melanogaster</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Flight muscle weakness • Defective spermatogenesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal morphology of the flight muscle • Inner membrane aggregation • Reduced state-3 respiration • Reduced dimerization and dimer row formation by ATP synthase
Zebrafish <i>Danio rerio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Early lethality • Abnormal embryogenesis and cardiac development 	
Mouse <i>Mus musculus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Prenatal and perinatal mortality • Low body weight • Developmental cardiomyopathy • Adult cardiomyopathy (dilated type) • Skeletal muscle weakness 	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperproliferation of cardiac mitochondria • Abnormal morphology • Reduced crista density • Disrupted alignment between mitochondria and myofibrils
Human <i>Homo sapiens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fetal loss and stillbirth • Abnormal growth • Chronic fatigue • Cardiomyopathy • Skeletal muscle weakness • Neutropenia 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal morphology • Inner membrane aggregation • Smaller membrane potential ($\Delta\Psi_m$) • Reduced state-3 respiration • Reduced stability of the respiratory RCs • Slight increase in ROS production • Release of cytochrome c and stimulation of apoptosis in progenitor cells • Resistance to Fas and TNFα-induced apoptosis • Disrupted alignment between mitochondria and myofibrils

Very important clues from the yeast cell model are shown in red, whereas shared characteristics are shown in blue. *Indicates essential discoveries taken into account in the recent work on human induced pluripotent stem cells (hiPSC).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des principales contributions des différents modèles du syndrome de Barth à la compréhension de ce syndrome. (d'après Saric *et al.*, 2016)

- Mutations empêchant les produits de former des assemblages stables et fonctionnels
- Mutations induisant des produits thermosensibles

De nombreuses autres études sur la levure ont permis de mieux comprendre certains symptômes observés à l'échelle cellulaire chez les patients. Ainsi des défauts du lipidome ont été mis en évidence (Gu *et al.*, 2004), mais aussi des défauts d'assemblages protéiques dans la membrane mitochondriale interne, notamment des défauts d'assemblage de la chaîne respiratoire (Brandner *et al.*, 2005), conduisant à divers défauts métaboliques : diminution de la respiration et de la production d'ATP et augmentation de la production de ROS (Ma *et al.*, 2004 # Chen *et al.*, 2008).

La levure a donc fortement contribué à notre compréhension du BTHS. Mais si la levure est pertinente pour observer des défauts à l'échelle cellulaire, les résultats obtenus dans ce modèle nécessitent souvent d'être confirmés sur des cellules plus proches des cellules humaines comme les modèles décrits précédemment.

III.5.7. Conclusion

Malgré quelques variations dans les phénotypes, les différents organismes modélisant le BTHS présentent un certain nombre de symptômes communs, tels que les défauts en CL, les anomalies morphologiques des mitochondries et des défauts d'assemblage de la chaîne respiratoire, nous permettant progressivement de mieux comprendre la pathologie. Les différents apports de chaque modèle sont résumés dans le tableau 5 (Saric *et al.*, 2016).

III.6. Approches thérapeutiques du syndrome de Barth

Aucun traitement curatif contre le syndrome de Barth n'existe à ce jour, c'est pourquoi la prise en charge des patients est encore essentiellement symptomatique. Quatre disciplines médicales sont particulièrement mises à contribution : la génétique, la cardiologie, l'hématologie et l'étude du métabolisme. Une prise en charge paramédicale (kinésithérapie et

psychomotricité), peut permettre de retarder les symptômes liés à la myopathie. Cette prise en charge, notamment cardiologique, a déjà permis une grande amélioration de l'espérance de vie des patients du BTHS dans la cohorte française (Donadiou *et al.*, 2014). Le traitement des dysfonctions cardiaques se fait classiquement à l'aide de β -bloquants, souvent associés à d'autres traitements. Cependant, en cas d'épisodes d'insuffisance cardiaque aiguë, l'implantation d'un défibrillateur automatique ou une transplantation cardiaque peuvent s'avérer nécessaires. Une particularité de la cardiomyopathie engendrée par le BTHS est que la fonction systolique du ventricule gauche, qui est souvent altérée, peut se restaurer spontanément avec l'âge. Du fait de la neutropénie, autre symptôme classique du BTHS, la prévention des infections est capitale. Elle consiste en une antibiothérapie prophylactique et un programme vaccinal adapté. Par ailleurs, des facteurs de croissance « Granulocyte colony-stimulating factor » (GCSF) qui stimulent l'hématopoïèse, et plus spécialement les polynucléaires neutrophiles, peuvent être prescrits (Malhotra *et al.*, 2014).

Différents traitements ont été essayés mais, à ce jour, aucun n'a présenté d'effet bénéfique réellement prouvé : L-carnitine, leucine, Coenzyme Q, acide pantothénique... Il est donc capital de mettre en place des modèles d'étude du BTHS et des stratégies permettant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Certains modèles ont déjà permis de mettre en évidence des pistes thérapeutiques potentielles.

Par exemple, les récents travaux de Huang *et al.* (Huang *et al.*, 2017), montrent un effet bénéfique de l'activation de la voie PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) par un pan-activateur, le bésafibrate, sur un modèle murin *knockdown* (KD) pour le gène TAZ. Le bésafibrate a la capacité d'activer les différentes classes de PPAR qui sont des récepteurs nucléaires, agissant comme facteurs de transcription. Ils vont activer des gènes impliqués dans le métabolisme, notamment celui des lipides. PPAR α et le corégulateur de transcription PGC-1 α sont connus pour induire l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras. Cette oxydation des acides gras pourrait être une source d'énergie pour les cellules cardiaques, ce qui expliquerait l'amélioration des fonctions cardiaques observées par Huang *et al.* dans leur modèle. Cette amélioration passe aussi probablement par la prolifération mitochondriale et une restauration de la chaîne respiratoire fortement affectée par la perte de la tafazzine. Mais curieusement, le défaut primaire en CL n'est pas restauré, et au contraire

le bézafibrate induit une diminution des CL et de leur insaturation encore plus sévère que dans les souris *KD* non traitées. L'effet potentiel de cette molécule n'a pas encore été étudié, à notre connaissance, chez les patients.

L'acide linoléique, qui est normalement l'acide gras majoritaire dans les CL de personnes saines, est drastiquement diminué chez les patients du BTHS. Valianpour *et al.* ont donc voulu tester la capacité de l'acide linoléique, ajouté dans le milieu de culture, à restaurer le niveau en CL de fibroblastes de patients. Et effectivement, cette complémentation permet d'augmenter la quantité en CL des fibroblastes et de les enrichir en chaînes d'acides linoléiques. Cet enrichissement n'est pas spécifique aux CL puisque tous les autres phospholipides portent aussi davantage de chaînes d'acides linoléiques (Valianpour *et al.*, 2003). Basé sur cet effet bénéfique d'une supplémentation en linoléate, un brevet a été déposé auprès du *United States Patent and Trademark Office* (Malhotra *et al.*, 2014). Mais aucune preuve d'efficacité clinique n'a été rapportée pour le moment (Donadiou *et al.*, 2014).

D'autres brevets ont été déposés pour des traitements potentiels de maladies mitochondriales, incluant le BTHS. Par exemple, un brevet présente un système de transport de cargo vers la mitochondrie. Ce système permettrait notamment d'y adresser des antioxydants pouvant détoxifier les ROS, dont la production est augmentée en cas de BTHS et dont l'effet néfaste pour la mitochondrie est bien connu. Un autre brevet propose l'utilisation du kétoconazole, un antifongique, comme traitement. Le développeur de ce brevet présente le kétoconazole comme étant capable d'induire une augmentation de la biosynthèse des CL, mais aucune preuve de cet effet n'est retrouvée dans la littérature (Malhotra *et al.*, 2014).

Malgré des pistes thérapeutiques potentiellement intéressantes, il n'existe toujours pas, à notre connaissance, de traitement dont l'efficacité pour le BTHS soit réellement prouvée. Nous présenterons, dans la suite de ce mémoire, l'identification de deux nouvelles pistes potentielles mises en évidence dans un modèle levure du BTHS.

ARTICLE I

La surexpression d'un transporteur des oxo-dicarboxylates (*ODC1*) préserve les oxydations phosphorylantes dans le modèle levure du syndrome de Barth.

Sommaire

I. Résultats préliminaires à l'article : modélisation chez la levure.....	96
I.1. Recherche du phénotype sur milieu solide	96
I.2. Recherche des conditions de croissance en milieu liquide	97
I.3. Construction des souches avec plasmides.....	97
II. Résultats principaux de l'article	98
II.1. Vérification des souches.....	98
II.2. Caractérisation du mutant	98
II.3. <i>ODC1</i> , un gène suppresseur	99
II.3.1. Choix du gène <i>ODC1</i>	99
II.3.2. Qui est <i>ODC1</i> ?.....	99
III. Article I : <i>Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome</i>	100
IV. Résultats complémentaires	113
IV.1. Analyse lipidomique.....	113
IV.2. Analyse des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET).....	114
IV.3. Estimation de la biogénèse mitochondriale.....	114
IV.4. Mitophagie	115
IV.5. Respiration sur cellules entières.....	116
IV.6. Implication de la voie rétrograde	116
V. Discussion	117
V.1. Défauts des OXPHOS	117
V.1.1. Résultats similaires avec d'autres études	118
V.1.2. Des résultats légèrement différents	119
V.1.3. Des études très différentes.....	120
V.2. Perte de l'ADNmt	120
V.3. Composition lipidique des membranes mitochondriales	121
V.3.1. Le défaut en CL : un phénotype robuste.....	121
V.3.2. Qu'en est-il des autres phospholipides ?	121
V.3.3. La composition des chaînes d'acides gras de la CL	123
V.4. Morphologie mitochondriale.....	123
V.5. Abondance mitochondriale.....	124
V.6. Sauvetage du mutant <i>Δtaz1</i> par la surexpression du gène <i>ODC1</i> et par l'oléate	127
V.6.1. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant <i>Δfmc1</i> par la surexpression du gène <i>ODC1</i>	127
V.6.2. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant <i>Δsym1</i> par la surexpression du gène <i>ODC1</i>	130
- V.6.2.1. La voie rétrograde est-elle impliquée ?	131
- V.6.2.2. Lien entre le transporteur Odc1p et la voie rétrograde	131
- V.6.2.3. Sauvetage par l'oléate	133
VI. Conclusions.....	135

Plusieurs études ont déjà été menées sur cette maladie, notamment à l'aide de modèles levures, la plupart traitant d'un aspect bien précis du BTHS. Il est important de noter que ces études ont été réalisées chez des levures ayant des fonds génétiques différents et ayant été cultivées dans différentes conditions. Pour ces raisons, ces études n'ont pas forcément des résultats en corrélation (Gu *et al.*, 2004 # Testet *et al.*, 2005 # Brandner *et al.*, 2005 # Calypool *et al.*, 2008 # Baile *et al.*, 2014). Chacune de ces études est en quelque sorte une pièce de puzzle qui reste tout de même très difficile à assembler à cause des différences expliquées ci-dessus...

De plus, certaines études semblent contradictoires selon l'organisme modèle utilisé. Par exemple, quelques articles ont rapporté une augmentation de la respiration pour des mutants de levure délétés pour le gène *TAZ1* (Baile *et al.*, 2014 # Testet *et al.*, 2005). Ce résultat est assez surprenant et contre intuitif sachant que la perte de la tafazzine induit une déstabilisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire et une diminution de la respiration, que ce soit dans des certains modèles levures (Brandner *et al.*, 2005), des cellules iPSC dérivées de patients (Dudek *et al.*, 2013) ou dans des lymphoblastes de patients (Gonzalvez *et al.*, 2013 # MacKenzie *et al.*, 2006).

Dans la partie qui suit, avant de livrer l'article et ses résultats concernant le suppresseur génétique *ODC1*, je vais expliquer en quelques mots comment le travail a été amorcé. Par la suite, après l'article, et quelques résultats complémentaires, nous discuterons de l'ensemble de ces résultats.

I. Résultats préliminaires à l'article : Modélisation chez la levure

I.1. Recherche du phénotype sur milieu solide

L'un des premiers objectifs de ma thèse a donc été de choisir le modèle levure qui permettait de récapituler un maximum de défauts présentés par les cellules de patients. Le premier critère utilisé a été la croissance respiratoire sur milieu solide à 36°C. L'effet thermosensible de la mutation $\Delta taz1$ avait déjà été montré chez la levure (Gu *et al.*, 2004). D'après les données bibliographiques et certaines données du laboratoire, le milieu respiratoire choisi a été un milieu riche YP contenant le substrat respiratoire éthanol (2%). Ce milieu est nommé YPE. Les premiers tests de croissance sur milieu respiratoire YPE à 36°C

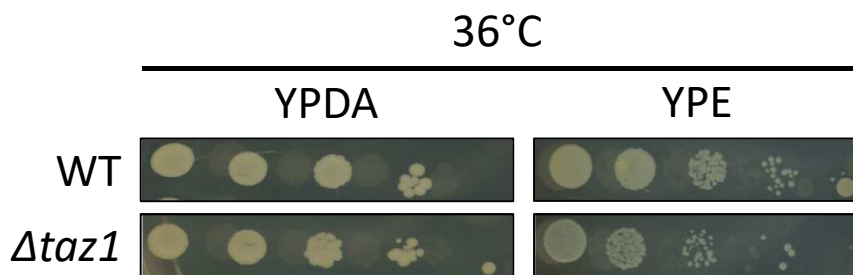


Fig. 34 : Tests en goutte en milieu YPE à 36°C. Les cellules WT ou $\Delta taz1$ ont été cultivées en milieu riche complémenté en glucose (YPDA) à 28°C, puis ont été diluées en série d'un facteur 10. Des gouttes de 5 μ L de ces cultures ont été déposées sur des milieux solides YPDA et YPE (milieu riche complémenté avec 2% d'éthanol). Les boîtes ont été mises à incuber 4 jours à 36°C puis photographiées.

réalisés avec la souche BY4742 (Euroscarf) ne montraient pas de défaut de croissance. Pour cette raison, le mutant $\Delta taz1$ a été construit par Déborah Tribouillard-Tanvier dans le fond génétique W303. Les premiers essais, en tests en gouttes, montraient un retard de croissance léger en milieu glucose (YPDA) mais bien plus prononcé en milieu éthanol (YPE) à 36°C (Fig. 34).

I.2. Recherche des conditions de croissance en milieu liquide

Afin de commencer la caractérisation biochimique du mutant $\Delta taz1$, il est absolument nécessaire d'avoir une certaine quantité de matériel biologique. Afin d'obtenir une biomasse suffisante, nous avons réalisé des cultures liquides en utilisant le milieu YPE. Malheureusement, les premiers résultats indiquaient que les conditions de culture en YPE à 36°C étaient trop stringentes pour le mutant $\Delta taz1$ incapable de croître dans ces conditions. L'ajout de galactose, un substrat fermentescible, qui, contrairement au glucose, n'exerce pas de répression sur les gènes codants des protéines impliquées dans les OXPHOS, permet au mutant $\Delta taz1$ de croître un peu mieux dans le milieu respiratoire YPE à 36°C. En effet, ces conditions permettent la croissance de la souche mutante tant que le galactose est présent et d'avoir un phénotype clair de croissance ralentie, comparé à la souche sauvage, lorsque tout le galactose a été consommé. Ce défaut respiratoire est en accord avec les descriptions du BTHS par Barth (Barth *et al.*, 1983), et les nombreux modèles du BTHS (Ma *et al.*, 2004 # Dudek *et al.*, 2013).

I.3. Construction des souches avec plasmides

Afin de bien montrer que les défauts observés dans la souche mutante $\Delta taz1$ sont bien dus à l'absence de la protéine tafazzine, nous avons transformé la souche mutante $\Delta taz1$ par un plasmide portant le gène *TAZ1*. Pour maintenir le plasmide dans les levures, les cellules doivent avoir une pression de sélection. Le plasmide portant le gène *URA*, les cellules ont été cultivées en milieu liquide minimum CSM (*Complete supplement mixture*), un milieu pauvre, sans uracile pouvant contenir la source carbonée de notre choix. Ainsi, seules les levures ayant le plasmide peuvent croître. Nous avons donc utilisé dans cette étude quatre souches différentes : (i) La souche sauvage transformée avec le plasmide vide qui sert de

contrôle (WT+p \emptyset) ; (ii) la souche mutante $\Delta taz1$ transformée avec le plasmide vide ($\Delta taz1$ +p \emptyset) ; (iii) la souche mutante $\Delta taz1$ transformée avec le plasmide portant le gène *TAZ1* ($\Delta taz1$ +p*TAZ1*) ; (iv) et enfin, la souche mutante transformée avec le plasmide portant le gène *ODC1* dont nous voulions étudier l'effet sur le mutant ($\Delta taz1$ +p*ODC1*).

II. Résultats principaux de l'article

II.1. Vérification des souches

Une fois les quatre souches construites, nous nous sommes assurés non seulement de la délétion du gène *TAZ1* et de leur transformation par les bons plasmides par PCR et Western blot. Les résultats de l'immuno-détection montrent l'absence de la tafazine dans le mutant $\Delta taz1$ +p \emptyset et sa surexpression dans la souche $\Delta taz1$ +p*TAZ1* (Fig. 1A de l'article I, p103). De plus, la protéine Odc1p qui est physiologiquement faiblement exprimée est efficacement surexprimée dans la souche $\Delta taz1$ +p*ODC1*.

I.2. Caractérisation du mutant

Nous avons ensuite caractérisé biochimiquement la souche mutante $\Delta taz1$. Les résultats montraient que la respiration mitochondriale était diminuée de 50% (Fig. 3A et B de l'article I, p104) alors que les mesures du potentiel de membrane sur mitochondries isolées indiquaient une difficulté à phosphoryler l'ADP en ATP signifiant un problème soit de la chaîne respiratoire, soit de l'ATP synthase (Fig. 4A de l'article I, p105). Par la suite, les mesures de l'activité de l'hydrolyse de l'ATP sur gel nous permettaient de supposer que l'ATP synthase ne semblait pas affectée dans le mutant (Fig. 5A et B de l'article I, p107). Ceci était confirmé par Western blot, puisque aussi bien la sous-unité protéique Atp1p en SDS-PAGE (Fig. 5D de l'article I, p107) que le complexe de l'ATP synthase en BN-PAGE (Fig. 5A de l'article I, p107) ne montraient qu'une légère variation d'abondance entre le mutant $\Delta taz1$ et le sauvage. En revanche, l'immuno-détection par Western blot en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de la sous-unité protéique Cox2p et du cytochrome c montrait une forte diminution de ces protéines dans le mutant $\Delta taz1$ comparé au sauvage (Fig. 5D de l'article I, p107). De même, par la technique du BN-PAGE, l'abondance du complexe IV était diminuée (Fig. 5B de l'article I, p107). L'ensemble de ces défauts était corrigé après la ré-expression de la protéine Taz1p dans la souche mutante $\Delta taz1$.

II.3. *ODC1*, un gène suppresseur

II.3.1. Choix du gène *ODC1*

Une fois la caractérisation du mutant *Δtaz1* réalisée, nous avons étudié l'effet bénéfique de la surexpression du gène *ODC1*. Le choix de ce gène a été motivé par des similitudes qui existent entre le mutant *Δtaz1* et un autre mutant *Δsym1*, impliqué dans une autre pathologie mitochondriale, la neurohépatopathie de type Navajo. En effet, des mutations dans le gène *SYM1* sont responsables d'un retard de croissance en milieu respiratoire à 36°C et d'une diminution des OXPHOS sans atteinte de l'ATP synthase, comme pour le mutant *Δtaz1*. De plus, un criblage de drogue pour restaurer une croissance normale de ces mutants a permis de trouver un certain nombre de molécules actives sur les deux mutants qui étaient communes. Pour ces différentes raisons, et parce que le gène *ODC1* est un suppresseur génétique du phénotype de retard de croissance pour le mutant *Δsym1*, ce gène a été essayé sur le mutant *Δtaz1*. Les résultats ont montré que le gène *ODC1* était aussi un suppresseur génétique du mutant *Δtaz1* (Fig. 2A de l'article I, p104).

II.3.2. Qui est *ODC1* ?

Le gène *ODC1* (OxoDicarboxylate Carrier 1) code pour un transporteur d'intermédiaires du cycle de Krebs au niveau de la membrane mitochondriale interne. L'un des principaux rôles de ce transporteur est d'assurer l'entrée d' α -cétoglutarate dans la matrice en échange de la sortie dans le cytosol du 2-oxoadipate, un intermédiaire du catabolisme de la lysine et du tryptophane. De plus, ce 2-oxoadipate peut être converti en acétyl-CoA dans la matrice. Le transporteur Odc1p peut aussi assurer le transport d'autres molécules, notamment celui de l'oxaloacétate ou du citrate (Fiermonte *et al.*, 2001).

La surexpression de ce gène était déjà connue pour sauver deux mutants chez la levure présentant des défauts respiratoires : le mutant *Δfmc1*, impliqué dans l'assemblage de l'ATP synthase (Schwimmer *et al.*, 2005), et comme dit ci-dessus, le mutant *Δsym1*, dont la fonction est encore inconnue mais dont l'orthologue humain, MPV17, est muté dans le cas de la neurohépatopathie de type Navajo (Dallabona *et al.*, 2010). De façon intéressante, nous avons pu montrer que la surexpression d'*ODC1* est aussi bénéfique au modèle levure du BTHS. Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit.

III. Article I: Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (*ODC1*) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome

RESEARCH ARTICLE

Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome

Maxence de Taffin de Tilques^{1,*}, Déborah Tribouillard-Tanvier^{1,*‡,§}, Emmanuel Tétaud¹, Eric Testet², Jean-Paul di Rago¹ and Jean-Paul Lasserre^{1,§}

ABSTRACT

Cardiolipin (CL) is a diglycerol phospholipid mostly found in mitochondria where it optimizes numerous processes, including oxidative phosphorylation (OXPHOS). To function properly, CL needs to be unsaturated, which requires the acyltransferase tafazzin. Loss-of-function mutations in this protein are responsible for Barth syndrome (BTHS), presumably because of a diminished OXPHOS capacity. Here, we show that overexpressing *Odc1p*, a conserved oxodicarboxylic acid carrier located in the mitochondrial inner membrane, fully restores oxidative phosphorylation in a yeast model (*taz1Δ*) of BTHS. The rescuing activity involves the recovery of normal expression of key components that sustain oxidative phosphorylation, including cytochrome *c* and electron transport chain complexes IV and III, which are strongly downregulated in *taz1Δ* yeast. Interestingly, overexpression of *Odc1p* was also shown previously to rescue yeast models of mitochondrial diseases caused by defects in the assembly of ATP synthase and by mutations in the MPV17 protein that result in hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome. These findings define the transport of oxodicarboxylic acids across the inner membrane as a potential therapeutic target for a large spectrum of mitochondrial diseases, including BTHS.

KEY WORDS: Human mitochondrial disease, Oxidative phosphorylation, Barth syndrome, Oxodicarboxylic acid transport, Cardiolipin remodeling, Tafazzin

INTRODUCTION

Cardiolipin (CL) is an acidic diglycerophospholipid carrying two negative charges that is exclusively synthesized in mitochondria and mostly found in the mitochondrial inner membrane (IM) (Hostetler et al., 1972; Bligny and Douce, 1980; Hoch, 1992; Schlame and Haldar, 1993; Schlame et al., 2000; Joshi et al., 2009; Ikon et al., 2015). CL has a structure that is more flexible than other phospholipids because of two chiral carbons and four fatty acyl

chains that are usually polyunsaturated. CL facilitates cristae formation (Xu et al., 2006; Acehan et al., 2011; Schlame et al., 2012) and establishes interactions with electron transport chain components (complexes I–IV), promoting their association into ‘supercomplexes’ or ‘respirasomes’, which is presumed to optimize respiration (Zhang et al., 2002; Pfeiffer et al., 2003; Bazan et al., 2013). CL also plays a role in many others processes including mitochondrial fusion (Joshi et al., 2012), fission (DeVay et al., 2009; Ban et al., 2010), protein import (Jiang et al., 2000; Gebert et al., 2009), iron-sulfur (Fe-S) biogenesis (Patil et al., 2013), mitophagy (Chu et al., 2013, 2014; Hsu et al., 2015; Li et al., 2015) and apoptosis (McMillin and Dowhan, 2002; Kim et al., 2004; Heit et al., 2011; Gonzalez et al., 2013; Ikon et al., 2015; Li et al., 2015; Manganelli et al., 2015). Furthermore, CL modulates the activity of various carrier proteins involved in energy metabolism including the ADP/ATP and carnitine acyl-carnitine translocases (Kadenbach et al., 1982; Noel and Pande, 1986; Robinson, 1993; Jiang et al., 2000; Schlame et al., 2000; Koshkin and Greenberg, 2000, 2002; Vaz et al., 2003; Gu et al., 2004; Brandner et al., 2005). Finally, the polyunsaturated chains of CL would provide a shield against reactive oxygen species (ROS) that have the capacity to damage any type of biomolecules (McMillin and Dowhan, 2002; Kim et al., 2004; Heit et al., 2011; Gonzalez et al., 2013; Chu et al., 2013, 2014; Hsu et al., 2015; Ikon et al., 2015; Li et al., 2015; Manganelli et al., 2015).

Pre-mature CL is synthesized at the matrix side of the IM as a saturated phospholipid from phosphatidic acid (PA) originating in the endoplasmic reticulum (ER) (Schlame and Haldar, 1993; Schlame et al., 2000). To carry out its different functions, CL needs to be unsaturated, which involves a deacylation-reacylation cycle, resulting in CL species containing mainly mono-unsaturated and di-unsaturated chains of 16–18 carbons (Schlame and Haldar, 1993; Hatch, 1998; Baile et al., 2014a). This remodeling activity is sustained by a cardiolipin-specific phospholipase (CLP1), which generates monolyso-CL (MLCL) and tafazzin (Bolhuis et al., 1991; Adès et al., 1993; Gedeon et al., 1995; Bione et al., 1996; Barth et al., 2004) (encoded by the nuclear gene *TAZ*, which re-acylates MLCL (Neuwald, 1997; Testet et al., 2005; Schlame, 2013)).

Loss-of-function mutations in *TAZ* are responsible for Barth syndrome (BTHS), which is an X-linked recessive disorder characterized by cardiac and skeletal myopathies, growth retardation, hypocholesterolemia, 3-methyl glutaconic aciduria and increased susceptibility to bacterial infections due to cyclic neutropenia (Barth et al., 1983). BTHS is very often fatal in childhood as a result of cardiac failure or sepsis, and there is still no effective treatment (Barth et al., 1983; Bolhuis et al., 1991). Mitochondria from BTHS patients show multiple anomalies, including: (i) a reduced level of CL with a concurrent increase in

¹Université de Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, Bordeaux cedex 33077, France. ²Université de Bordeaux, Laboratoire de biogénèse membranaire, CNRS UMR 5200, INRA Bordeaux Aquitaine BP81, 33883 Villenave d’Ornon Cédex, France.

*These authors contributed equally to this work; †INSERM research associate

§Authors for correspondence (tribouillard@ibgc.cnrs.fr; lasserre@ibgc.cnrs.fr)

DOI: 10.1242/dmm.027540; J.-P.L., 0000-0003-4388-1904

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

monolysocardiolipin (MLCL) (Vreken et al., 2000; Schlame et al., 2003; Valianpour et al., 2005); (ii) abnormal ultrastructure; (iii) pleiotropic respiratory defects possibly due to impaired respirasome stability (Barth et al., 1996; McKenzie et al., 2006); (iv) increased production of ROS; (v) a reduced capacity to sustain apoptosis; and (vi) an abnormally high tendency to proliferate in cells, perhaps as a means to compensate for the compromised energy-transducing activity of taffazin-deficient mitochondria (Xu et al., 2005; Gonzalez and Gottlieb, 2007; Dudek et al., 2013; Ferri et al., 2013; Gonzalez et al., 2013).

Much of what we know about BTHS comes from studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is a convenient system for modelling mitochondrial disease mechanisms (Baile and Claypool, 2013; Lasserre et al., 2015). Studies in this yeast have helped to define how CL is synthesized and remodeled to maintain a homogenous and highly unsaturated acyl-chain composition, and how mitochondria are influenced by defects in these processes (Claypool, 2009; Joshi et al., 2009; Baile et al., 2014b; Mileykovskaya and Dowhan, 2014). Yeast strains lacking the homolog of the human *TAZ* gene (*taz1Δ*) showed substantial MLCL accumulation with a concurrent decrease in CL (Vaz et al., 2003; Gu et al., 2004; Testet et al., 2005; Claypool, 2009) and respired poorly when grown at elevated temperature (Schlame and Haldar, 1993; Schlame et al., 2000; Vaz et al., 2003; Gu et al., 2004; Brandner et al., 2005). These phenotypes were efficiently suppressed by expressing the human *TAZ* gene in *taz1Δ* yeast, which provided a simple assay to test the functional consequences of mutations found in BTHS patients. Most of these mutations proved, when expressed in yeast, to affect the association of tafazzin with the IM, making it susceptible to proteolytic degradation (Claypool et al., 2006, 2011).

The common respiratory growth defect observed in yeast models of mitochondrial disease provides a simple read-out to enable large-scale screens for genetic suppressors able to rescue mitochondrial dysfunction (Baile and Claypool, 2013; Lasserre et al., 2015). Even when mitochondrial dysfunction is severe enough to abolish respiratory growth, yeast offers the unique advantage that such mutants can be kept alive and propagated on fermentable substrates for the use in suppressor screens. A number of interesting findings have been reported using this approach. For example, it was found that disease-causing mt-tRNA^{Leu}(UUR) mutations are efficiently rescued in yeast by overexpressing factors involved in mitochondrial protein synthesis, including the translation factor EF-Tu (TUFM in humans) and various (cognate and non-cognate) aminoacyl tRNA synthetases (Montanari et al., 2008, 2010; Park et al., 2008; Rorbach et al., 2008; Sasarman et al., 2008). The suppressor activity of these factors was also observed in human cells carrying similar mutations and shown to be independent of their tRNA-charging function, indicating that the mutated mt-tRNAs recover their functionality because of chaperone-like RNA-protein interactions (Francisci et al., 2011).

Other interesting studies have revealed that yeast models of human diseases caused by defects in the assembly of ATP synthase (Schwimmer et al., 2005) or mutations in MPV17 (Dallabona et al., 2010), a protein of as-yet-poorly characterized function, are rescued by the overexpression of Odc1p, which is a mitochondrial carrier transporting Krebs cycle intermediates through the IM (Fiermonte et al., 2001). Since ATP synthase and MPV17 have different, apparently non-related, functions, and owing to the existence of phenotypic similarities in yeast conferred by defects in these systems and in *TAZI* (see Discussion), we wondered whether Odc1p could also, when overexpressed, compensate for a lack in CL

remodeling. The results reported here show that overexpression of Odc1p fully restores oxidative phosphorylation in *taz1Δ* yeast. This finding defines the transport of oxodicarboxylic acids across the IM as a potential therapeutic target for a large spectrum of mitochondrial diseases, including BTHS.

RESULTS

Construction, growth properties, phospholipid content and genetic stability of *taz1Δ* yeast

We first constructed a *taz1Δ* strain by replacing the *TAZI* coding sequence with that of *TRP1*, which encodes a protein involved in tryptophan biosynthesis. The *taz1Δ* mutant was transformed with either the empty pRS426 plasmid (*taz1Δ*+pØ), which contains *URA3* as a yeast selection marker (Mumberg et al., 1994) or the same plasmid into which we had cloned the wild-type yeast *TAZI* gene with its own promoter (*taz1Δ*+p*TAZI*). As a control, we transformed the parental strain with pRS426 (WT+pØ). Western blot analyses of whole cell protein extracts confirmed the absence of Taz1p protein in *taz1Δ*+pØ (Fig. 1A). This protein was more abundant in *taz1Δ*+p*TAZI* compared with WT+pØ, because pRS426 is a high copy number plasmid.

Consistent with previous studies (Testet et al., 2005), mitochondria isolated from our *taz1Δ* strain showed a significant decrease in CL level (about 50%) compared with the wild type, had a higher content in phosphatidylinositol (PI), while phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) accumulated normally (Fig. 1B, top). Also as expected, CL fatty acid chains were less unsaturated in *taz1Δ* versus WT mitochondria, with decreased levels in oleic (C18:1) and increased amounts of stearic (C18:0) acid chains (Fig. 1B, bottom). The *taz1Δ* mutant recovered a normal phospholipid profile upon transformation with the plasmid-borne *TAZI* gene (*taz1Δ*+p*TAZI*) (Fig. 1B).

Our *taz1Δ* strain (*taz1Δ*+pØ) grew poorly on respiratory carbon sources (ethanol) at elevated temperatures (36°C) whereas growth on non-fermentable substrates (glucose) looked normal (Fig. 2A). The respiratory growth deficiency was suppressed by the plasmid borne *TAZI* gene (*taz1Δ*+p*TAZI*) (Fig. 2A). We additionally tested growth of the strains in liquid complete synthetic medium (CSM) containing 0.5% galactose and 2% ethanol and devoid of uracil for plasmid maintenance (as used for the bioenergetics and biochemical investigations described below). Galactose is a fermentable substrate that does not elicit repression of mitochondrial function as glucose does. The four analyzed strains grew well in this medium at 28°C (not shown), whereas at 36°C, the growth of strain *taz1Δ*+pØ was much less efficient compared with the three other strains after consumption of the galactose present in the medium (Fig. 2B), which illustrates further the failure of the mutant to properly express mitochondrial function at 36°C.

Hundreds of nuclear genes required in yeast for mitochondrial function are important for mtDNA maintenance, either directly or indirectly (Contamine and Picard, 2000). Mutations in these genes result in the production of cytoplasmic *petite* cells issued from a large (>50%) deletion (ρ^-) or totally devoid (ρ^0) of mtDNA. To determine whether *TAZI* is important for mtDNA stability, *taz1Δ* cells grown in glucose, conditions under which functional (ρ^+) mtDNA is dispensable (except in rare *petite*-negative mutant contexts (Chen and Clark-Walker, 2000), were spread for single colonies on glucose plates with a limiting amount of adenine. The *ade2* mutated ρ^+ cells form pink colonies owing to a red intermediate (AIR, aminoimidazole ribotide) of the adenine biosynthetic pathway, while *ade2* ρ^-/ρ^0 cells form white colonies because this pigment can no longer be oxidized and remains white

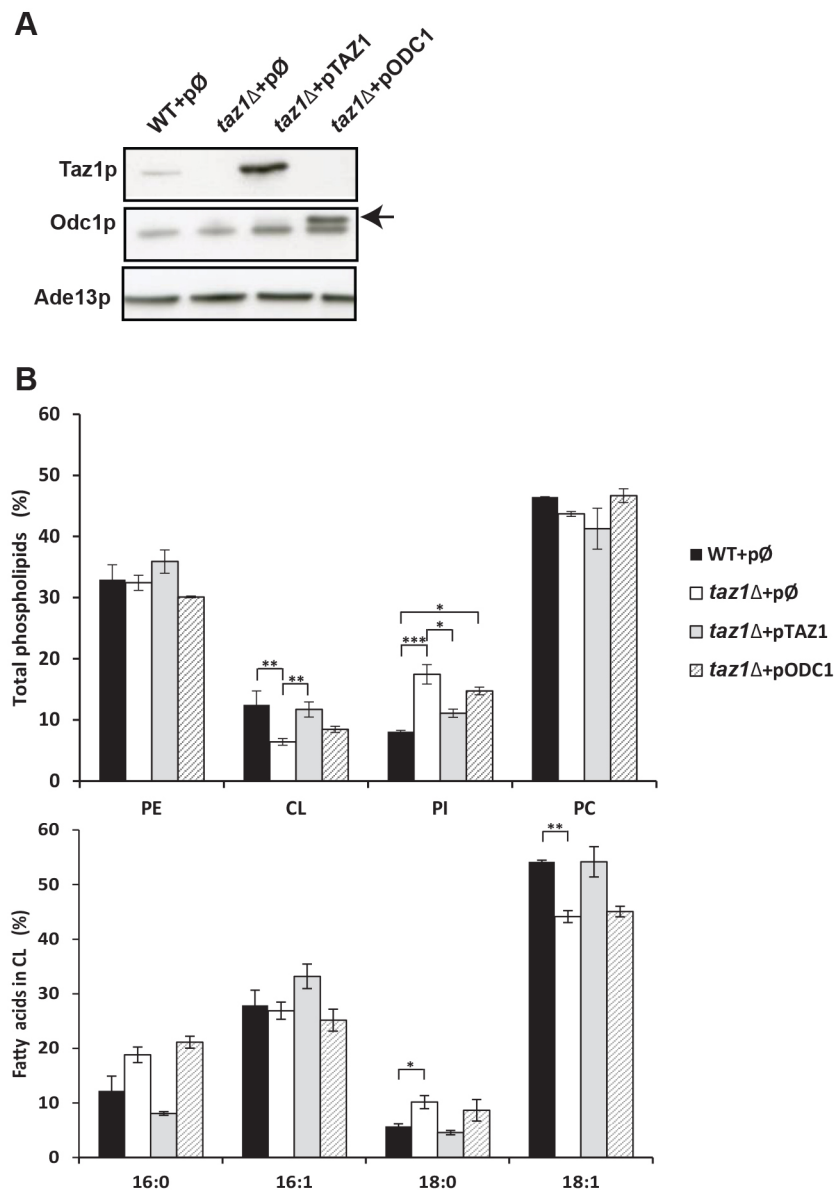


Fig. 1. Overexpressing Odc1p does not restore a normal phospholipid profile in *taz1Δ* yeast mitochondria.

(A) Steady-state levels of Odc1p and Taz1p. Total protein extracts were prepared from cells of the four analyzed strains (WT+pØ; *taz1Δ*+pØ; *taz1Δ*+pTAZ1; *taz1Δ*+pODC1) grown at 36°C in a complete synthetic medium containing galactose and ethanol (see Fig. 2B for details). The proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with antibodies against Odc1p and Taz1p, and the cytosolic Ade13p protein that was used as a loading control; 50 µg of proteins were loaded on each lane. The arrow indicates Odc1p. (B) Phospholipid composition and fatty acid chains in cardiolipin. Mitochondria were prepared from the analyzed strains grown as in A, and their lipids extracted and quantified. The top panel shows the relative contents of PE (phosphatidylethanolamine), CL (cardiolipin), PI (phosphatidylinositol) and PC (phosphatidylcholine) within each strain. The bottom panel gives the relative fatty acid chain composition of CL within each strain (16:0, palmitic acid; 16:1, palmitoleic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid). Statistical analysis was done with Kruskal-Wallis test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Data are expressed as mean±s.d. ($n=4$).

(Reaume and Tatum, 1949; Kim et al., 2002). *taz1Δ* yeast grown in glucose at 28°C had a relatively high tendency to produce ρ^-/ρ^0 cells (50% vs <5% for the *WT*) (Fig. 2C). Since ρ^+ *taz1Δ* yeast is respiratory competent at this temperature (Fig. 2A), it can be inferred that this mtDNA instability did not result from a failure in the expression of the energetic function of mitochondria (see Discussion). When grown in the synthetic galactose/ethanol medium at the non-permissive temperature (36°C), *taz1Δ* yeast produced much fewer (5-10%) *petites*, demonstrating that the mutant respiratory deficiency at elevated temperature did not result from a lack in functional mtDNA. The limited tendency of *taz1Δ* yeast to produce *petites* in these conditions is probably due to a strong counter-selection of these cells, whereas in pure fermenting conditions, they can grow efficiently.

Bioenergetics in *taz1Δ* yeast

The impact of the loss of *TAZ1* on oxidative phosphorylation was investigated using mitochondria isolated from cells grown in synthetic galactose/ethanol medium lacking uracil at 36°C. The cells were harvested when the cultures reached a density of 2-3

OD_{600nm}/ml after which the growth of the mutant (*taz1Δ*+pØ) became very slow compared with the wild-type (WT+pØ) and the mutant transformed with the plasmid borne *TAZ1* gene (*taz1Δ*+pTAZ1) (see Fig. 2B). As already mentioned, the mutant showed good mtDNA stability in these conditions, indicating that its respiratory growth defect at 36°C does not result from a lack of functional mtDNA.

Respiration

We first measured mitochondrial oxygen consumption using NADH as an electron donor, alone (basal, state 4 respiration), after further addition of ADP (state 3, phosphorylating conditions) or in the presence of the membrane proton ionophore CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; uncoupled respiration). Under state 4, the rate of respiration is controlled by the passive permeability to protons of the inner membrane (IM). Under state 3, it is generally accepted that most of the protons return to the matrix through the ATP synthase and that the contribution of the passive permeability to protons of the IM to respiration is then very small. In the presence of CCCP, the maintenance of an

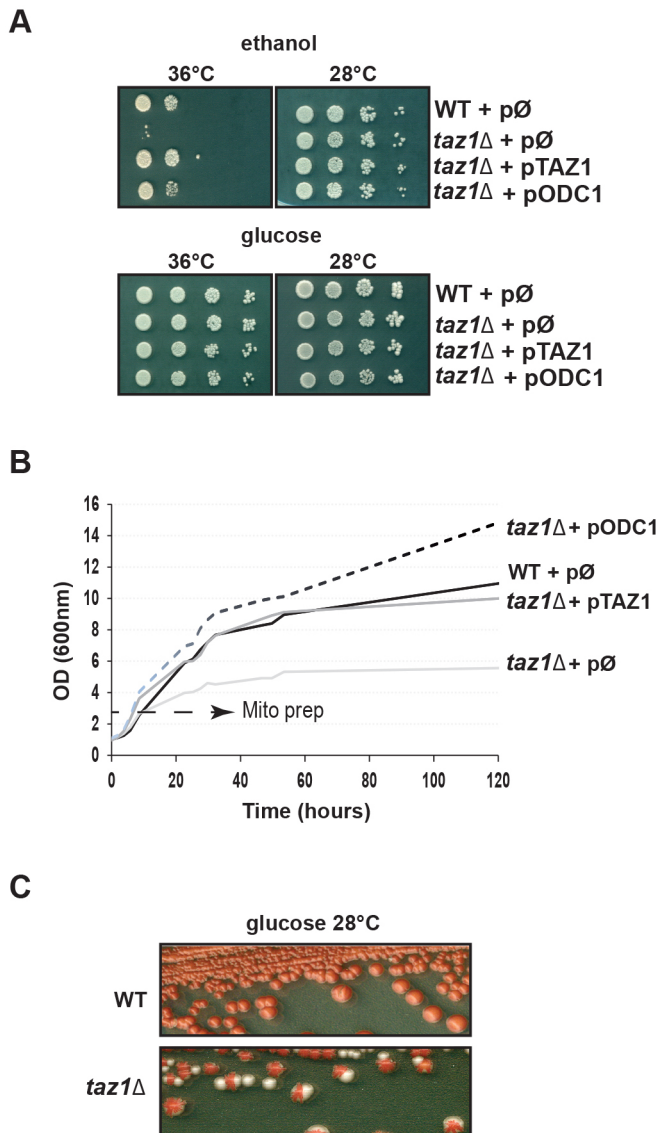


Fig. 2. Growth properties and genetic stability of yeast strains. (A) Growth on glucose and ethanol. Cells from the four analyzed strains (WT+pØ; *taz1Δ*+pØ; *taz1Δ*+pTAZ1; *taz1Δ*+pODC1) freshly grown at 28°C in complete synthetic medium (CSM) containing 2% glucose as a carbon source were serially diluted and spotted onto solid CSM+2% ethanol or CSM+2% glucose plates. The plates were photographed after 4 days of incubation at the indicated temperature. (B) Growth curves. Cells from the analyzed strains freshly grown in CSM+2% glucose at 28°C were inoculated into 50 ml of CSM+0.5% galactose +2% ethanol, and incubated at 36°C with shaking. Optical densities were measured over 1 week. The bioenergetics and biochemical investigations described in Figs 3-5 were performed with cells grown in these conditions (in 2 liters of medium) until 2-3 OD_{600 nm}/ml as indicated by the dashed arrow. (C) Production of ρ^-/ρ^0 cells. Subclones of WT and *taz1Δ* mutant strains were grown on solid glucose plates with a limiting amount of adenine. Clones with a red color were picked and streaked on the same medium. The plates were photographed after 6 days of incubation at 28°C. As explained in the text, ρ^-/ρ^0 form entirely white colonies while those predominantly made of ρ^+ cells are red.

electrical potential ($\Delta\Psi$) across the IM is impossible and respiration becomes maximal. State 4 respiration was not increased in *taz1Δ* yeast compared with the two control strains (it was even a little decreased, see Fig. 3A), indicating that the absence of CL remodeling does not render the IM more leaky to protons. State 3 vs state 4 respiration was only slightly higher in the mutant (by

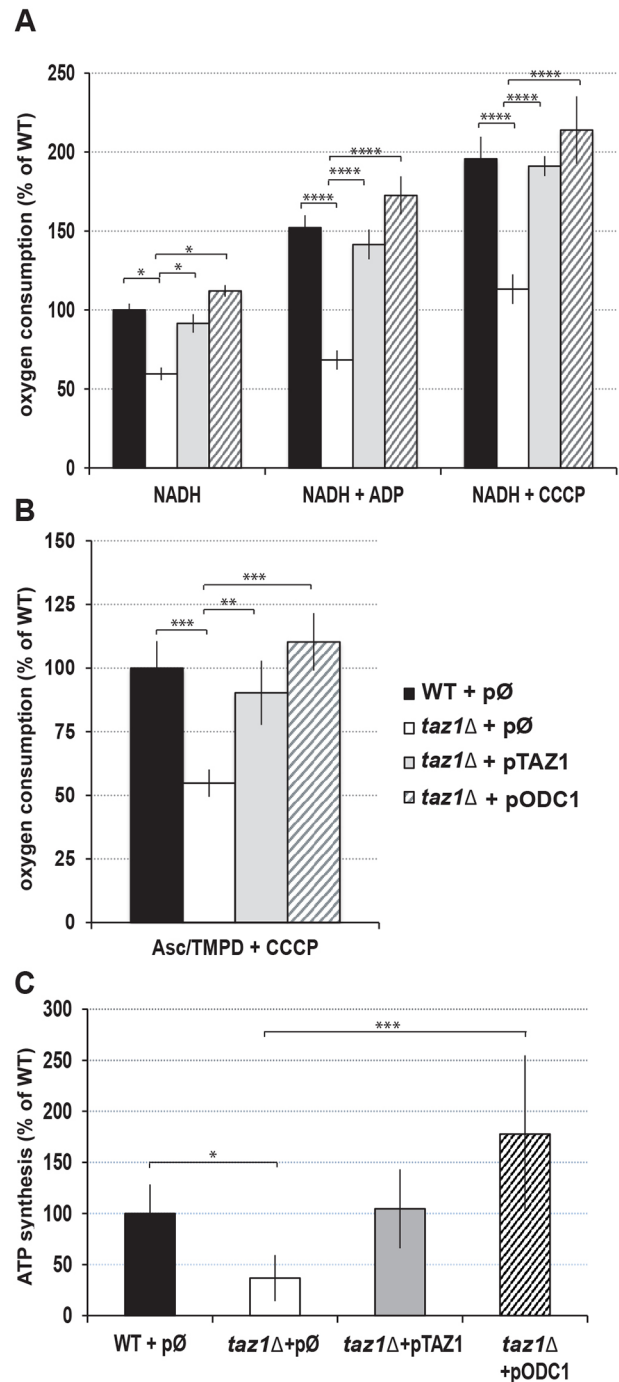


Fig. 3. Respiration and ATP synthesis in isolated mitochondria. (A) Rate of oxygen consumption measured using NADH as an electron donor, alone (NADH, state 4), after further addition of ADP (NADH+ADP, state 3) or CCCP (NADH+CCCP, uncoupled respiration). (B) Rate of oxygen consumption measured using ascorbate/TMPD as an electron source in the presence of CCCP (Asc/TMPD+CCCP). (C) Rates of ATP synthesis measured using NADH as a respiratory substrate and in the presence of a large excess of external ADP. Mitochondria were prepared from cells grown as described in Fig. 2B. Statistical analysis was done with Tukey's test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; **** P <0.0001). Data are mean \pm s.d. (n =4).

about 10%), while mitochondria from the two *TAZ1*⁺ strains responded normally to ADP with a 50% increase in respiration rate (Fig. 3A). In the presence of CCCP, the mutant mitochondria respired more rapidly, but there was still an important (45%) deficit

in oxygen consumption compared with the two CL-remodeling-competent strains (Fig. 3A). We also measured the activity of complex IV (CIV) (cytochrome *aa₃*) using ascorbate/TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) as an electron donor system in the presence of CCCP. Here also, the mutant showed a substantially (50%) reduced electron transfer activity (Fig. 3B).

ATP synthesis

We next measured the rate of mitochondrial ATP synthesis using NADH as a respiratory substrate, in the presence of a large excess of external ADP. In these conditions, ATP is synthesized only by complex V (CV) using the proton-motive force generated by complexes III and IV (there is no complex I in *S. cerevisiae*). This activity was substantially reduced in the *taz1Δ* mutant by at least 50% compared with the controls, WT+pØ and *taz1Δ*+pTAZ1 (Fig. 3C). Since state 3 respiration and ATP synthesis rates were decreased in similar proportions in the mutant, it can be inferred that the observed oxidative phosphorylation deficit mostly resulted from a slower ATP synthesis rate rather than a less-efficient coupling of the mitochondrial energy transducing system.

Membrane potential

The consequences of a lack of CL remodeling on oxidative phosphorylation were analyzed further using Rhodamine 123. This is a fluorescent cationic dye that can be used to monitor changes in the IM electrical potential ($\Delta\Psi$) in intact mitochondria (Emaus et al., 1986). Increasing $\Delta\Psi$ is followed by uptake of the dye inside the matrix space and concomitant fluorescence quenching. In a first set of experiments (Fig. 4A), we tested the capacity of externally added

ADP to consume ethanol-induced $\Delta\Psi$. Despite their 50% reduced respiratory capacity (see above), ethanol induced a large $\Delta\Psi$ variation in *taz1Δ* mitochondria, which is in agreement with previous studies showing that, in these conditions, the rate of respiration needs to be decreased by more than 80% to noticeably affect $\Delta\Psi$ (Rak et al., 2007a; Kucharczyk et al., 2009). Normally, small amounts of ADP induce a transient fluorescence increase due to $\Delta\Psi$ consumption by the ATP synthase during phosphorylation of the added ADP. This was indeed observed in mitochondria from the CL-remodeling-competent strains (WT+pØ and *taz1Δ*+pTAZ1), whereas *taz1Δ* mitochondria were mostly insensitive to ADP. KCN was then added to inhibit complex IV, which, in the control mitochondria, resulted in a rapid but partial $\Delta\Psi$ collapse. The remaining potential was due to the pumping of protons by the F_0 component of ATP synthase coupled to the hydrolysis by its F_1 sector of the ATP that accumulated in the mitochondrial matrix during phosphorylation of the added ADP. Indeed, the remaining $\Delta\Psi$ was lost upon addition of oligomycin. In *taz1Δ* mitochondria, the ethanol-induced $\Delta\Psi$ was essentially collapsed in one rapid phase after addition of KCN, which further reflected their limited capacity to produce ATP (Fig. 4A).

In another set of experiments (Fig. 4B), we directly tested the functionality of ATP synthase using externally added ATP to ensure activity was independent of the respiratory chain (Fig. 4B). The mitochondria were first energized with ethanol to remove the natural inhibitory peptide (IF1) of the F_1 -ATPase. The mitochondrial membrane potential was then collapsed with KCN, and less than 1 min later (well before IF1 rebinding; Venard et al., 2003), ATP was added. Normally, the external ATP is counter-exchanged against

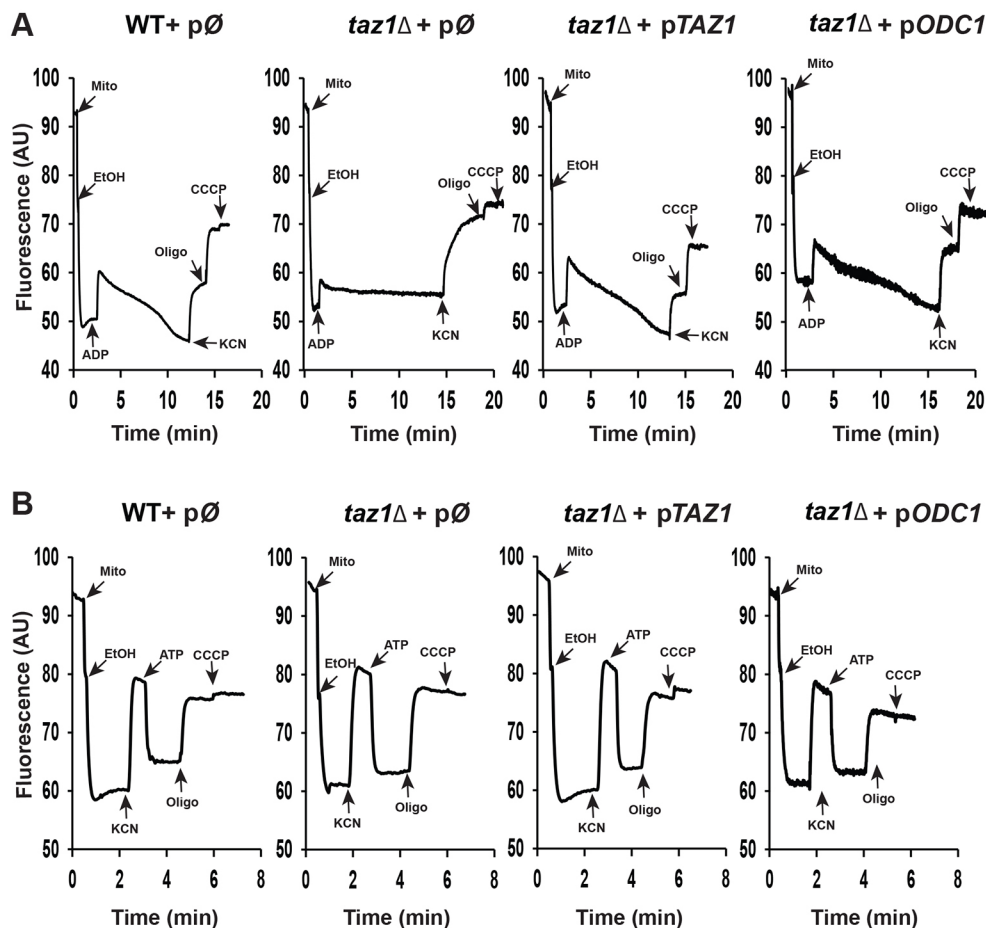


Fig. 4. Mitochondrial membrane potential. Variations in mitochondrial $\Delta\Psi$ were monitored by fluorescence quenching of Rhodamine 123. The effect of externally added ADP (A) and ATP (B) as well as 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine 123, 75 $\mu\text{g/ml}$ mitochondrial proteins (Mito), 10 μl ethanol (EtOH), 0.2 mM potassium cyanide (KCN), 50 μM ADP, 3 μM CCCP and 6 mg/ml oligomycin (oligo) on mitochondrial $\Delta\Psi$ was followed. The fluorescence traces are representative of four experimental trials. The mitochondria used in these experiments were prepared from cells grown as described in Fig. 2B.

ADP present in the matrix by the ADP/ATP translocase, which does not require any $\Delta\Psi$, and the ATP can then be hydrolyzed by F_1 coupled to F_0 -mediated proton transport out of the matrix. In both *taz1Δ* and control mitochondria (WT+p \emptyset and *taz1Δ*+pTAZI), the addition of ATP promoted a large and stable fluorescence quenching of the dye that was reversed upon F_0 inhibition with oligomycin. These results suggest that a lack in CL remodeling has limited, if any, impact on ATP synthase expression and functionality.

Assembly/stability of OXPHOS components

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses of mitochondrial proteins extracted with various concentrations of digitonin revealed that full ATP synthase complexes similarly accumulated in *taz1Δ* and wild-type mitochondria, as monomeric and dimeric units (Fig. 5A). This further suggests that the activity of Taz1p is not crucial for ATP synthase expression and assembly, and association into dimers. By contrast, the respiratory system of *taz1Δ* yeast displayed substantial defects, with a rather severe lack in CII (Fig. 5C), CIII, CIV (Fig. 5B) and cytochrome *c* (Fig. 5D). In BN gels probed with COX2 and cytochrome *b* antibodies, most of the CIV present in *taz1Δ* mitochondrial protein samples was, as in the wild type, associated with CIII within CIII₂-CIV₂ and CIII₂-CIV₁ ‘supercomplexes’. The relatively weak response to cytochrome *b* antibodies of CIII₂-CIV₂ versus CIII₂-CIV₁ is certainly due to a much better accessibility of these antibodies to CIII when the CIII dimer is associated to only one CIV. For the same reason, ‘free’ CIII dimer responds even better to the cytochrome *b* antibodies. While this makes it difficult to quantify within a given mitochondrial sample the relative amounts of CIII- and CIV-containing protein complexes, comparison between samples makes sense, and it appears from Fig. 5B that CIII dimer was not more abundant in *taz1Δ* yeast compared with the wild-type strain, indicating that CL remodeling inactivation leads to similar decreases in the CIII and CIV content.

It can be inferred from these data that the slow-growth phenotype of the *taz1Δ* mutant on respiratory carbon sources at elevated temperature results from a lack in ATP synthesis owing to the defective expression of several components involved in the transfer of electrons to oxygen.

ROS production/accumulation

Defects in the mitochondrial respiratory chain often result in a higher production/accumulation of reactive oxygen species (ROS) owing to the diversion of electrons from their normal pathway to oxygen. A lack in CL remodeling is known to provoke this phenomenon (Chen et al., 2008), which we also observed in our *taz1Δ* mutant (Fig. 6).

Overexpressing ODC1 fully restores oxidative phosphorylation in *taz1Δ* mutant

To test the capacity of Odc1p, when overexpressed, to compensate for a lack in CL remodeling, we transformed the *taz1Δ* mutant with a high copy number vector in which we have cloned *ODC1* with its own promoter (*taz1Δ*+p*ODC1*). As a result, Odc1p accumulated at more than 10-times higher levels compared with the untransformed mutant (Fig. 1A, arrow). Overexpression of Odc1p efficiently restored the ability of *taz1Δ* yeast to grow on respiratory substrates (Fig. 2A,B). The mitochondrial phospholipid profile of the modified yeast was mostly identical to that of *taz1Δ* cells that normally express *ODC1* (Fig. 1B). It can be inferred that the rescue was not induced by the restoration of CL remodeling.

Mitochondria isolated from *taz1Δ*+p*ODC1* cells grown at elevated temperature respired (Fig. 3A,B) and produced ATP efficiently (Fig. 3C), displayed normal $\Delta\Psi$ profiles (Fig. 4A), and had CIV, CIII and cytochrome *c* contents similar to those of wild-type mitochondria (Fig. 5B,D). Furthermore, the *taz1Δ* cells showed a normal production of ROS (Fig. 6). Thus, overexpression of Odc1p fully restored oxidative phosphorylation in CL-remodeling-deficient yeast cells.

Oleic acid improves respiration dependent growth of *taz1Δ* yeast

Oleic acid (OA) is known to stimulate expression of *ODC1* (Tibbetts et al., 2002). Thus, if overexpressing *ODC1* can compensate for a lack in CL remodeling, we expected that this compound should also be able to do so. To test this hypothesis, *taz1Δ* cells were spread on solid ethanol medium (YPA ethanol) and exposed to filters spotted with different amounts of OA (Fig. 7). After several days of incubation at 36°C a halo of enhanced growth appeared around the filters. Oleate did not improve growth when the medium was devoid of ethanol (YPA), which demonstrates that the halos of enhanced growth resulted from a better utilization of respiratory substrates when *taz1Δ* yeast is exposed to the fatty acid.

DISCUSSION

Consistent with previous studies using yeast as a model (Schlame and Haldar, 1993; Schlame et al., 2000; Vaz et al., 2003; Gu et al., 2004; Brandner et al., 2005), we found that a lack in CL remodeling due to inactivation of *TAZI* compromises respiration in yeast cells exposed to elevated temperatures. Our biochemical and bioenergetics analyses revealed that a lack of several components (CII-IV and cytochrome *c*) involved in electron transfer to oxygen was possibly responsible for this instead of defects in the functioning of these systems. Thus, the CL levels still present (50% vs the WT) seem thus to be sufficient to support the function of the respiratory enzymes that accumulate in the *taz1Δ* mutant. At apparent odds with this, in a recent study (Baile et al., 2014b), while the absence of the *TAZI* gene similarly affected oxygen consumption in yeast cells grown at 37°C, accumulation of respiratory chain complexes was not found to be diminished. Since this study and ours used the same host strain (W301-1A), background genetic differences are probably not responsible for this apparent discrepancy. A more likely explanation is that the two studies used very different growth conditions. In Baile et al. (2014b), the cells were grown in rich lactate medium whereas we used complete synthetic medium containing galactose and ethanol. Logically, the reduced content in electron transfer proteins we observed is probably not the primary event responsible for the impairment of respiration but rather a secondary, growth-condition-dependent consequence to some other functional impairment (see below).

To our knowledge, this is the first time that the influence of a lack of CL remodeling on the accumulation of cytochrome *c* has been tested. The reduced content of this cytochrome in the yeast tafazzin mutant is an interesting observation that further illustrates the importance of CL remodeling for preserving mitochondrial function. CL is known to be important for anchoring cytochrome *c* to the IM, which has been proposed to facilitate electron transfer from CIII to CIV (Orrenius and Zhiotovskiy, 2005). It is possible that this interaction is impaired in *taz1Δ* yeast, and the released cytochrome *c* becomes more susceptible to proteolytic degradation. The high sensitivity of cytochrome *c* to oxidative damage possibly also contributes to the reduced accumulation of this protein in *taz1Δ*

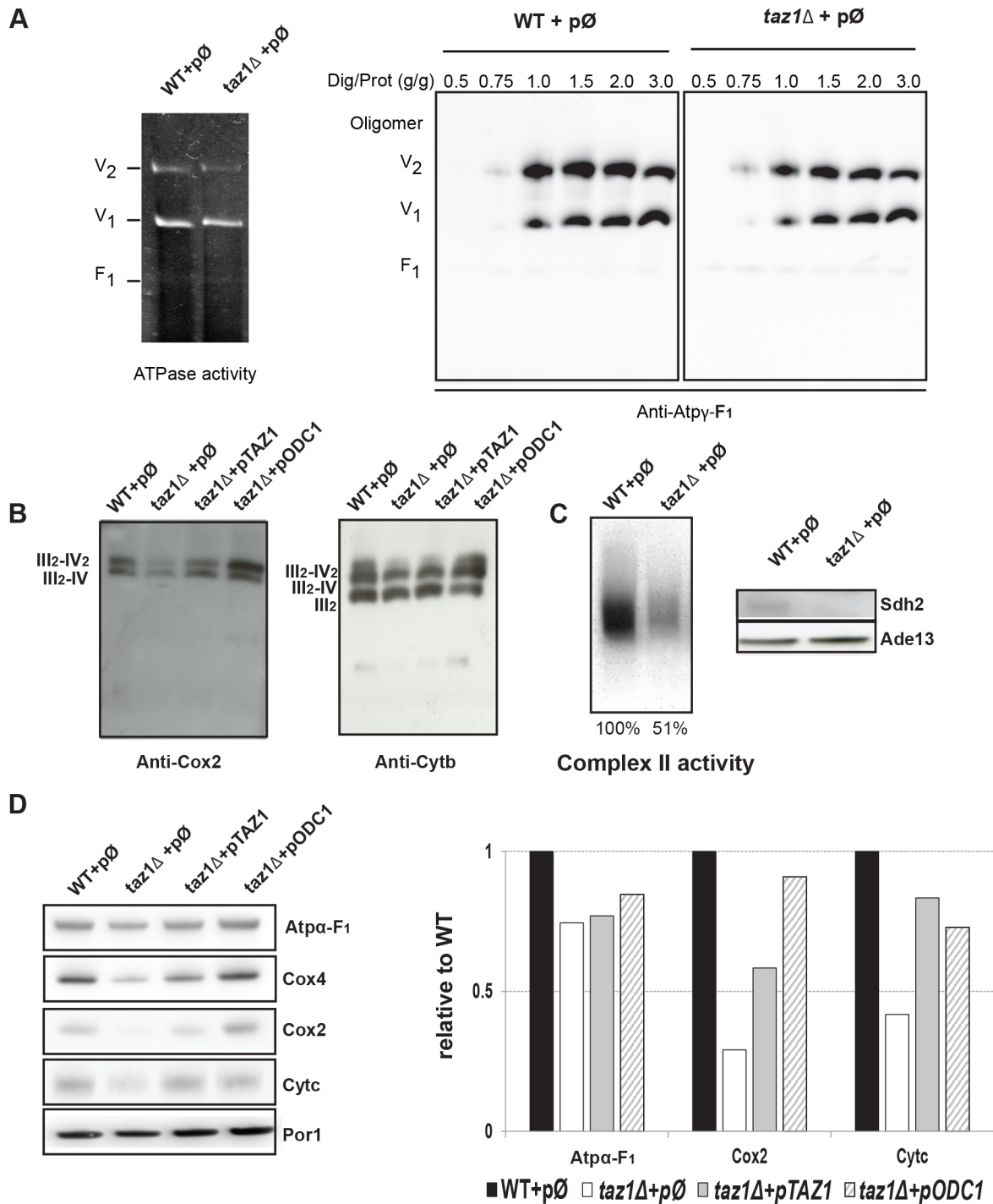


Fig. 5. BN-PAGE and SDS-PAGE analyses of mitochondrial proteins. Experiments were performed with mitochondria isolated from strains WT+pØ, *taz1Δ*+pØ, *taz1Δ*+pTAZ1 and *taz1Δ*+pODC1 grown as described in Fig. 2B. (A) BN-PAGE analyses of ATP synthase. The left panel shows a BN-gel of mitochondrial proteins (50 µg) dissolved with 2 g of digitonin per g of proteins, where ATP synthase is revealed by its ATPase activity as dimers (V₂), monomers (V₁) or free F₁ particles (F₁). In the right panel, ATP synthase was analyzed in samples (50 µg) obtained after treating the mitochondria with increasing concentrations of digitonin, from 0.5 to 3.0 g per g of protein. After their electrophoretic separation and transfer onto a nitrocellulose membrane, the proteins were probed with antibodies against the γ-F₁ subunit (ATP3) of ATP synthase. (B) BN-PAGE analysis of CIV and CIII. Mitochondrial proteins were extracted with 10 g digitonin per g of protein, separated by BN-PAGE (100 µg per lane), transferred onto a nitrocellulose membrane, and probed with antibodies against the COX2 subunit of CIV or the cytochrome *b* subunit of CIII. (C) BN-PAGE and SDS-PAGE analyses of CII. On the left panel, mitochondrial proteins were extracted with digitonin (10 g/g), separated by BN-PAGE, and assayed for in-gel complex II activity; in the right panel, 100 µg of total protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and probed antibodies against SDH2 and ADE13. (D) SDS-PAGE analyses. 100 µg of total mitochondrial proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with antibodies against the indicated proteins. The right panel shows a quantification which has been done using ImageJ. Levels of COX2, ATPα-F₁ and cytochrome *c* are related to the mitochondrial protein Por1p. The data are all relative to WT.

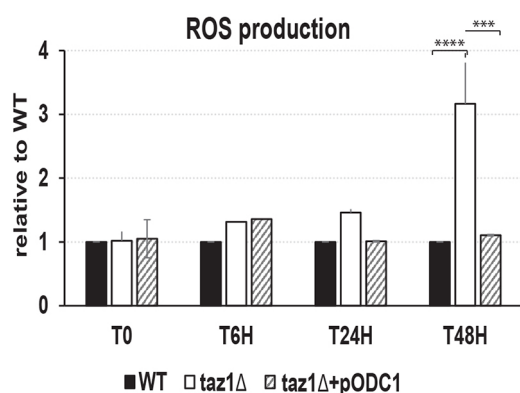


Fig. 6. ROS levels in yeast cells. The four analyzed strains (WT+pØ; *taz1Δ*+pØ; *taz1Δ+pTAZ1*; *taz1Δ+pODC1*) were grown as depicted in Fig. 2B. Cell samples were taken at the indicated times and analyzed by flow cytometry using dihydroethidium as a probe. The experiment was repeated three times for each strain. Statistical analysis was done with Tukey's test (*** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Data are expressed as mean \pm s.d. ($n=3$).

yeast owing to its enhanced propensity to produce ROS (Chen et al., 2008; this study). It will be of interest to determine whether a lack of cytochrome *c* contributes to the decreased rate of respiration in human CL-remodeling-deficient cells.

It has been established that CL is important for the association of respiratory complexes into supramolecular structures called respirasomes, and this organization is supposed to optimize respiration and minimize ROS production (Zhang et al., 2002; Pfeiffer et al., 2003; Claypool et al., 2008). There is evidence that respirasome destabilization occurs in BTHS patients, and this might contribute to the disease process (Barth et al., 1996; McKenzie et al., 2006; Gonzalez et al., 2013). While a block in CL synthesis disrupts the interactions between CIII and CIV in yeast (Baile et al., 2014b), these complexes efficiently associate into supercomplexes in *taz1Δ* yeast (Baile et al., 2014b; this study). This indicates that the remaining CL levels (50% vs WT) in *taz1Δ* yeast are sufficient for making contacts between CIII and CIV, and that the compromised ability of the yeast tafazzin mutant to transfer electrons to oxygen does not result from a less-efficient association of these complexes. While the yeast and human mitochondrial energy-transducing systems are generally believed to be highly similar, there are some important differences such as the absence of CI in yeast, which

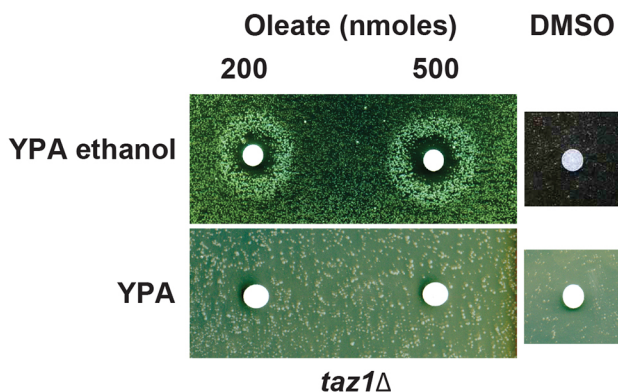


Fig. 7. Oleic acid improves respiratory growth of *taz1Δ* yeast. Cells of *taz1Δ* yeast freshly grown in glucose were spread onto rich medium with or without ethanol as a carbon source. Small sterile filters were placed on the medium and oleate (dissolved in DMSO) or DMSO alone added to the filters at the indicated quantities. The plates were photographed after 5 days of incubation at 36°C.

could explain, at least in part, why the supra-molecular structure of this system is apparently more sensitive to a lack of CL remodeling in humans than in yeast. The compromised ability of BTHS patients to express CII possibly contributes to the disorganization of the electron transport chain owing to the well-known interactions between CI and CII (Wittig and Schagger, 2009).

While *taz1Δ* cells grew well in ethanol medium at 28°C (the optimal temperature for growing *S. cerevisiae*), they exhibited a high tendency to lose mtDNA when allowed to proliferate by fermentation (in glucose), i.e. under conditions where the presence of this DNA is not essential (Fig. 2C). This result indicates that the absence of CL remodeling does have an effect on yeast mitochondria at this temperature. A reasonable explanation is that the import into mitochondria of the systems involved in mtDNA maintenance becomes less efficient. In support of this hypothesis, it has been shown that biogenesis of the protein translocase (TOM) and sorting and assembly (SAM) machineries of the outer mitochondrial membrane is less efficient in CL-remodeling-deficient yeast cells grown at 28°C, and defects in these systems are synthetic lethal with mutations in the CL-remodeling pathway (Gebert et al., 2009; Sauerwald et al., 2015). The compromised ability of *taz1Δ* mitochondria to energize the IM (Fig. 4) could additionally impact protein import through the $\Delta\Psi$ -dependent TIM23 machinery of the IM. Studies of other yeast mutants have shown that the systems involved in mtDNA maintenance are particularly sensitive to defects in mitochondrial protein import (Lefebvre-Legendre et al., 2003). The present study underscores the importance of CL maturation for efficient mitochondrial genome propagation.

Remarkably, oxidative phosphorylation and respiratory growth could be fully restored in *taz1Δ* yeast upon artificial overexpression of Odc1p, which is a protein that transports various Krebs cycle intermediates, preferentially α -ketoglutarate, across the inner mitochondrial membrane (Fiermonte et al., 2001). The level of Odc1p in *taz1Δ* yeast was not decreased compared with the wild-type strain (Fig. 1A), indicating that the respiratory deficiency of the mutant does not result from a failure to normally express/accumulate Odc1p. It is possible that the activity of Odc1p is affected by a lack in CL remodeling, in which case its overexpression would be beneficial not by stimulating but by preserving Odc1p function. While ODC1 expression can be modulated physiologically, with a 2- to 3-fold increase when yeast cells are switched from fermenting to respiratory conditions (Tibbetts et al., 2002), the levels of Odc1p in the mutant transformed with a plasmid-borne *ODC1* gene were at least 10-fold higher (Fig. 1A). Thus, yeast cells do not have the physiological capacity to increase the level of Odc1p in response to a lack of CL remodeling to a level sufficient to preserve oxidative phosphorylation. This can be achieved only artificially by way of genetic or pharmacological suppressors, which is an interesting finding that could help in developing therapeutic approaches against Barth syndrome.

Increasing the levels of Odc1p was previously shown to restore also respiration-dependent growth of a yeast mutant lacking a protein (Fmc1p) involved in the assembly of the F₁ catalytic sector of CV at elevated temperatures (Lefebvre-Legendre et al., 2003; Schwimmer et al., 2005). Both complexes III and IV are strongly downregulated in this mutant. While CV assembly remained defective in *fmc1Δ* yeast when Odc1p was overexpressed, expression of CIII and CIV recovered much better (Lefebvre-Legendre et al., 2003; Schwimmer et al., 2005). As a result, the lack in CV was compensated for by an enhanced production of ATP by substrate-level phosphorylation directly coupled to the Krebs cycle

(Schwimmer et al., 2005). As in the *fmc1Δ* mutant, increasing Odc1p accumulation restored a normal expression and activity of the electron transport chain in *taz1Δ* yeast. As a result, because of the high level of expression of CV in this mutant, ATP was again produced effectively through oxidative phosphorylation. Interestingly, Odc1p proved also, when overexpressed, to improve respiratory growth at elevated temperature of yeast cells lacking the gene (*SYM1*) encoding the homolog of human MVP17 (Dallabona et al., 2010). This is an IM protein of unknown function in which mutations have been associated with the hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome (Spinazzola et al., 2006). Whether the rescue of *sym1Δ* yeast on respiratory substrates correlates with improved expression/activity of the respiratory system is presently unknown.

How Odc1p, when overexpressed, compensates for defects in the oxidative phosphorylation system is certainly a complex process. Considering (i) the well-established function of this protein in the transport of α -ketoglutarate across the IM (Fiermonte et al., 2001), (ii) the kinetic control this transport exerts on oxidative phosphorylation (Rigoulet et al., 1985), and (iii) studies showing that some Krebs cycle enzymes like aconitase (Patil et al., 2013) and CII (Dudek et al., 2016; this study) are impaired in CL-remodeling-deficient cells, we hypothesize that the rescuing activity of Odc1p possibly results from the improved operation of the Krebs cycle. Some data reported in this study support the view that the respiratory deficiency of CL-remodeling-deficient cells does involve defects in this metabolic pathway: indeed, while the ATP synthesis rate was reduced by ~50% in *taz1Δ* mitochondria using NADH as a respiratory substrate, these mitochondria almost completely failed to phosphorylate ADP when provided with ethanol (Fig. 4A). Obviously, an effective stimulator of the Krebs cycle requires a good capacity to transfer electrons to oxygen, and this capacity is substantially compromised in our *taz1Δ* yeast owing to a reduced presence of several components involved in this transfer (CIII, CIV and cytochrome *c*). Thus a two-pronged suppressor mechanism leading to an enhanced capacity to reduce NAD^+ and a faster rate of NADH re-oxidation is required. In this respect, it should be noted that the functional state of mitochondria influences the expression of numerous nuclear genes through the so-called retrograde pathway as a means to provide the cell with a sufficient supply of metabolites entering the tricarboxylic acid cycle and anabolic reactions, and of proteins involved in oxidative phosphorylation (Jia et al., 1997; Liao and Butow, 1993; Butow and Avadhani, 2004). As we have shown, most of the genes encoding CIII and CIV subunits are strongly downregulated in *fmc1Δ* cells and regained a stronger transcriptional activity when exposed to chlorhexidine, a chemical that substantially improves the ability of these cells to grow on non-fermentable carbon sources (Couplan et al., 2011). It is possible that changing the flux of Krebs cycle intermediates across the IM in oxidation-impaired cells by overexpressing Odc1p secondarily activate the expression of genes encoding subunits of the OXPHOS system, as a means to balance the rates of reduction and re-oxidation of nicotinamide adenine nucleotides.

Our findings make the transport of oxodicarboxylic acids across the IM a potential target for the treatment of BTHS patients and other diseases caused by mitochondrial dysfunction. The rescue of *taz1Δ* (this study) and *fmc1Δ* (Couplan et al., 2011) yeasts by oleic acid – a molecule known to stimulate Odc1p expression (Tibbetts et al., 2002) – holds promise for the discovery of therapeutics targeting this key metabolite carrier.

MATERIALS AND METHODS

Growth media

The following media were used to grow yeast strains: YPAD, 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto peptone, 60 mg/l adenine and 2% (v/v) glucose; YPE, 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bacto peptone, and 2% (v/v) ethanol; CSMGE, 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 0.5% (w/v) galactose, 2% ethanol and 0.8% (w/v) of a mixture of amino acids and bases from Formedium lacking uracil; WOABDF, 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 0.5% (w/v), 2% (v/v) glucose, 50 mg/l adenine, 50 mg/l uracil, 50 mg/l histidine, and 50 mg/l leucine. Solid medium contained 2% (w/v) agar.

Construction of *taz1Δ* yeast

taz1Δ yeast was constructed by replacing the open reading frame of *TAZ1* by that of *TRP1* in strain W303-1A (*MATa ade2-1 ura3-1 his311, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*), using a previously described procedure (Longtine et al., 1998). A *taz1::TRP1* DNA cassette was PCR amplified using a plasmid containing *TRP1* (pFA6a-TRP), and the primers Taz1-del-F (CAT TTT CAA AAA AAA AAG TAA AGT TTT CCC TAT CAA egg atc ccc ggg tta att aa) and Taz1-del-R (CCT CAT ACA TGC TAG TAT TTA CAC GAA TTT AAT TGC TTA AAT T gaa ttc gag ctg gtt taa ac). The nucleotides in capital letters correspond to *TAZ1* flanking regions, those in lowercase are for *TRP1* amplification. The PCR product was purified before transformation of W303-1A. Transformants were selected on WOABDF plates. The *taz1::TRP1* allele chromosomal integration was PCR-verified using a primer internal to *TRP1* (TRP1-466-R: CAG TCA GAA ATC GAG TTC CA) and two primers specific for *TAZ1* flanking regions (Taz1-Fbis: CGC CAG GAT CTG ACA GTA T; and Taz1-Rbis: TGA ATT CTA CCA GAT TGG TTA G).

Plasmids

The *TAZ1* gene and its own promoter was PCR amplified from genomic DNA of W303-1A and primers *SacI-Taz1-F* cccgagctcgcCCA TTG TCT CTC CAA TTG GTG and *XhoI-Taz1-R* gcctcgagtcTCA ATC ATC CTT ACC CTT TGG. The *SacI* and *XhoI* restriction sites included in the primers were used for cloning the PCR product into vector pRS426 (Mumberg et al., 1994). The plasmid containing *ODCI* (referred in this study as *pODCI*) was described in a previous study, in which it is referred to as pLL16 (Schwimmer et al., 2005).

Bioenergetics experiments

Mitochondria were prepared by the enzymatic method as described (Guérin et al., 1979). Protein concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) in the presence of 5% SDS. Oxygen consumption rates were measured with a Clark electrode using 75 $\mu\text{g/ml}$ of mitochondrial proteins in respiration buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM ethylene glycol tetra-acetic acid, 5 mM Tris-phosphate, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8) as described previously (Rigoulet and Guerin, 1979) with 4 mM NADH, 12.5 mM ascorbate, 1.4 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD), 150 μM ADP and 4 μM carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). Variations in transmembrane potential ($\Delta\Psi$) were evaluated in the same respiration buffer by monitoring the quenching of Rhodamine 123 fluorescence (0.5 $\mu\text{g/ml}$) using an FLX spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco), as described previously (Emaus et al., 1986). ATP synthesis rate measurements were performed with 75 $\mu\text{g/ml}$ mitochondrial proteins in respiration buffer supplemented with 4 mM NADH and 1 mM ADP in a thermostatically controlled chamber at 28°C (Rak et al., 2007b). Aliquots were withdrawn from the oxygraph cuvette every 15 s and the reaction was stopped with 3.5% (w/v) perchloric acid, 12.5 mM EDTA. The samples were then neutralized to pH 6.5 by adding 2 M KOH/0.3 M MOPS and ATP was quantified using a luciferin/luciferase assay (ATPLite kit from Perkin Elmer) and a LKB bioluminometer. The participation of the F_1F_0 ATP synthase in ATP production was assessed by adding oligomycin (2 $\mu\text{g/ml}$).

BN-PAGE and SDS-PAGE

BN-PAGE was carried out as described previously (Schägger and von Jagow, 1991). Briefly, mitochondrial extracts solubilized with digitonin

(the concentrations used are indicated in the legend of Fig. 5) were separated in a 3-12% acrylamide continuous gradient gel and F_1F_0 complexes were revealed in gel by their ATPase activity as described (Grandier-Vazeille and Guérin, 1996) or by western blot after transferred to poly(vinylidene difluoride) (Arselin et al., 1996). Complex II activity was revealed in a solution of 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mg/ml NitroBlue Tetrazolium, 20 mM sodium succinate and 0.2 mM phenazine methosulfate. SDS-PAGE was performed as described (Rak et al., 2007b). The sources of antibodies and the dilutions at which they were used are: Atp γ -F₁ (Jean Velours, IBGC, Bordeaux, France; 1:10,000), Atp α -F₁ (Jean Velours; 1:10,000), cytochrome *c* (Stephen Manon, IBGC, Bordeaux, France; 1:10,000), Taz1 (Steven Claypool, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA; 1:5000), Ade13 (Benoît Pinson, IBGC, Bordeaux, France; 1:50,000), Cox2 (Abcam, ab110271; 1:500), Sdh2 (Cristina Dallabona, University of Parma, Italy; 1:5000), Cytb (Ulrich Brandt, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; 1:5000), Cox4 (Abcam, ab110272; 1:1000) and Porin (Martin van der Laan, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Freiburg, Germany; 1:5000). Nitrocellulose membranes were incubated with 1:2500 diluted peroxidase-labeled antibodies (Promega). Immunological signal quantification was performed with ImageJ software (Gassmann et al., 2009).

Phospholipid analysis

Mitochondrial lipids were extracted and analyzed as described (Testet et al., 2005). Briefly, mitochondria were treated with a mixture of chloroform/methanol (2:1, v/v). After centrifugation, the organic phase was separated and the remaining lipids were further extracted twice with chloroform. After the phase separation, the organic phases were pooled and evaporated to dryness. The lipids were then suspended in chloroform/methanol (2:1, v/v). Volumes equivalent to 50 μ g of acyl chains were spotted on silica plates. Polar lipids were separated by one-dimensional TLC using chloroform/methanol/1-propanol/methylacetate/0.25% KCl (10:4:10:10:3.6 by volume) as a solvent (Vitello and Zanetta, 1978). The lipids were then located by immersing the plates in a solution of 0.001% (w/v) primuline in PBS, followed by visualization under UV. The silica gel zones corresponding to the various lipids (PE, CL, PI and PC) were then scraped from the plates and added to 1 ml of methanol/2.5% H₂SO₄ containing 5 μ g of heptadecanoic acid methyl ester as a standard. After maintaining the lipids in the mixture at 80°C for 1 h, 1.5 ml of water and 400 μ l of hexane were added. After centrifugation, hexane phase containing fatty acid methyl esters (FAMES) was isolated. Separation of FAMES was performed as described (Testet et al., 2005).

ROS analyses

Cells at 0.4 OD units were taken from liquid cultures, pelleted in a microcentrifuge, suspended in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 50 μ M dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) and incubated at room temperature for 5 min. Flow cytometry was carried out on a Becton-Dickinson Accuri C6 model flow cytometer. The DHE fluorescence indicated was the direct output of the FL2A (red fluorescence) channel without compensation. A total of 100,000 cells were analyzed for each curve.

Testing the influence of oleate on taz1 Δ yeast respiratory growth

Exponentially growing cells at 0.125 OD units were spread homogeneously with sterile glass beads on a square Petri dish (12 cm \times 12 cm) containing solid YPE medium. Sterile filters were placed on the agar surface and spotted with oleic acid dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 100 mM. The plates were then incubated at 36°C for 6 days.

Acknowledgements

We gratefully thank the lipidomic platform of Bordeaux for lipid analysis on the yeast strains and J.J. Bessoule for helpful discussions.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

D.T.-T., J.-P.L., M.d.T.d.T. and Er.T. performed the experiments; Em.T. helped in BN-PAGE; D.T.-T., J.-P.L., J.-P.d.R., M.d.T.d.T. and Er.T. analyzed the data; D.T.-T., J.-P.L. and J.-P.d.R. designed the research and wrote the paper.

Funding

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM). M.d.T.d.T. was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

References

- Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D. L. and Schlame, M. (2011). Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys. J.* **100**, 2184-2192.
- Adès, L. C., Gedeon, A. K., Wilson, M. J., Latham, M., Partington, M. W., Mulley, J. C., Nelson, J., Lui, K. and Silience, D. O. (1993). Barth syndrome: clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. *Am. J. Med. Genet.* **45**, 327-334.
- Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.-V. and Velours, J. (1996). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 20284-20290.
- Baile, M. G. and Claypool, S. M. (2013). The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Front. Biosci.* **18**, 241-278.
- Baile, M. G., Lu, Y.-W. and Claypool, S. M. (2014a). The topology and regulation of cardiolipin biosynthesis and remodeling in yeast. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 25-31.
- Baile, M. G., Sathappa, M., Lu, Y.-W., Pryce, E., Whited, K., McCaffery, J. M., Han, X., Alder, N. N. and Claypool, S. M. (2014b). Unremodeled and remodeled cardiolipin are functionally indistinguishable in yeast. *J. Biol. Chem.* **289**, 1768-1778.
- Ban, T., Heymann, J. A. W., Song, Z., Hinshaw, J. E. and Chan, D. C. (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2113-2122.
- Barth, P. G., Scholte, H. R., Berden, J. A., Van der Klei-Van Moorsel, J. M., Luyt-Houwen, I. E. M., Van't Veer-Korthof, E. T., Van der Harten, J. J. and Sobotka-Plojhar, M. A. (1983). An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J. Neurol. Sci.* **62**, 327-355.
- Barth, P. G., Van den Bogert, C., Bolhuis, P. A., Scholte, H. R., van Gennip, A. H., Schutgens, R. B. H. and Ketel, A. G. (1996). X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): respiratory-chain abnormalities in cultured fibroblasts. *J. Inher. Metab. Dis.* **19**, 157-160.
- Barth, P. G., Valianpour, F., Bowen, V. M., Lam, J., Duran, M., Vaz, F. M. and Wanders, R. J. A. (2004). X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): an update. *Am. J. Med. Genet. A* **126A**, 349-354.
- Bazan, S., Mileykovskaya, E., Mallampalli, V. K. P. S., Heacock, P., Sparagna, G. C. and Dowhan, W. (2013). Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J. Biol. Chem.* **288**, 401-411.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A. and Toniolo, D. (1996). A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat. Genet.* **12**, 385-389.
- Bligny, R. and Douce, R. (1980). A precise localization of cardiolipin in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 254-263.
- Bolhuis, P. A., Hensels, G. W., Hulsebos, T. J., Baas, F. and Barth, P. G. (1991). Mapping of the locus for X-linked cardioskeletal myopathy with neutropenia and abnormal mitochondria (Barth syndrome) to Xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 481-485.
- Brandner, K., Mick, D. U., Frazier, A. E., Taylor, R. D., Meisinger, C. and Rehling, P. (2005). Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5202-5214.
- Butow, R. A. and Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* **14**, 1-15.
- Chen, X. J. and Clark-Walker, G. D. (2000). The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int. Rev. Cytol.* **194**, 197-238.
- Chen, S., He, Q. and Greenberg, M. L. (2008). Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Mol. Microbiol.* **68**, 1061-1072.
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Yanamala, N., Shrivastava, I. H., Mohammadyani, D. et al. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1197-1205.
- Chu, C. T., Bayir, H. and Kagan, V. E. (2014). LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy* **10**, 376-378.
- Claypool, S. M. (2009). Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2059-2068.

- Claypool, S. M., McCaffery, J. M. and Koehler, C. M. (2006). Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *J. Cell Biol.* **174**, 379-390.
- Claypool, S. M., Boontheung, P., McCaffery, J. M., Loo, J. A. and Koehler, C. M. (2008). The cardiolipin transacylase, tafazzin, associates with two distinct respiratory components providing insight into Barth syndrome. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5143-5155.
- Claypool, S. M., Whited, K., Srijumnong, S., Han, X. and Koehler, C. M. (2011). Barth syndrome mutations that cause tafazzin complex lability. *J. Cell Biol.* **192**, 447-462.
- Contamine, V. and Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 281-315.
- Couplan, E., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Kabala, A., Ezkurdia, N., Gagneur, J., St. Onge, R. P., Salin, B., Soubigou, F., Le Cann, M. et al. (2011). A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11989-11994.
- Dallabona, C., Marsano, R. M., Arzuffi, P., Ghezzi, D., Mancini, P., Zeviani, M., Ferrero, I. and Donnini, C. (2010). Sym1, the yeast ortholog of the MPV17 human disease protein, is a stress-induced bioenergetic and morphogenetic mitochondrial modulator. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1098-1107.
- DeVay, R. M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L. L., Hoppins, S., Stahlberg, H. and Nunnari, J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* **186**, 793-803.
- Dudek, J., Cheng, I.-F., Balleininger, M., Vaz, F. M., Streckfuss-Bömeke, K., Hübscher, D., Vukotic, M., Wanders, R. J. A., Rehling, P. and Guan, K. (2013). Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res.* **11**, 806-819.
- Dudek, J., Cheng, I.-F., Chowdhury, A., Wozny, K., Balleininger, M., Reinhold, R., Grunau, S., Callegari, S., Toischer, K., Wanders, R. J. et al. (2016). Cardiac-specific succinate dehydrogenase deficiency in Barth syndrome. *EMBO Mol. Med.* **8**, 139-154.
- Emaus, R. K., Grunwald, R. and Lemasters, J. J. (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 436-448.
- Ferri, L., Donati, M. A., Funghini, S., Malvagia, S., Catarzi, S., Lugli, L., Ragni, L., Bertini, E., Vaz, F. M., Cooper, D. N. et al. (2013). New clinical and molecular insights on Barth syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 27.
- Fiermonte, G., Dolce, V., Palmieri, L., Ventura, M., Runswick, M. J., Palmieri, F. and Walker, J. E. (2001). Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* **276**, 8225-8230.
- Francisci, S., Montanari, A., De Luca, C. and Frontali, L. (2011). Peptides from aminoacyl-tRNA synthetases can cure the defects due to mutations in mt tRNA genes. *Mitochondrion* **11**, 919-923.
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. and Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**, 1845-1855.
- Gebert, N., Joshi, A. S., Kutik, S., Becker, T., McKenzie, M., Guan, X. L., Mooga, V. P., Stroud, D. A., Kulkarni, G., Wenk, M. R. et al. (2009). Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr. Biol.* **19**, 2133-2139.
- Gedeon, A. K., Wilson, M. J., Colley, A. C., Silience, D. O. and Mulley, J. C. (1995). X linked fatal infantile cardiomyopathy maps to Xq28 and is possibly allelic to Barth syndrome. *J. Med. Genet.* **32**, 383-388.
- Gonzalez, F. and Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* **12**, 877-885.
- Gonzalez, F., D'Aurelio, M., Boutant, M., Moustapha, A., Puech, J.-P., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Vial, G., Taleux, N., Slomianny, C. et al. (2013). Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1194-1206.
- Grandier-Vazeille, X. and Guérin, M. (1996). Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal. Biochem.* **242**, 248-254.
- Gu, Z., Valianpour, F., Chen, S., Vaz, F. M., Hakkaart, G. A., Wanders, R. J. A. and Greenberg, M. L. (2004). Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast taz1 mutant: a model for Barth syndrome. *Mol. Microbiol.* **51**, 149-158.
- Guérin, B., Labbe, P. and Somlo, M. (1979). Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol.* **55**, 149-159.
- Hatch, G. M. (1998). Cardiolipin: biosynthesis, remodeling and trafficking in the heart and mammalian cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* **1**, 33-74.
- Heit, B., Yeung, T. and Grinstein, S. (2011). Changes in mitochondrial surface charge mediate recruitment of signaling molecules during apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C33-C41.
- Hoch, F. L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 71-133.
- Hostetler, K. Y., van den Bosch, H. and van Deenen, L. L. M. (1972). The mechanism of cardiolipin biosynthesis in liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **260**, 507-513.
- Hsu, P., Liu, X., Zhang, J., Wang, H.-G., Ye, J.-M. and Shi, Y. (2015). Cardiolipin remodeling by TAZ/tafazzin is selectively required for the initiation of mitophagy. *Autophagy* **11**, 643-652.
- Ikon, N., Su, B., Hsu, F.-F., Forte, T. M. and Ryan, R. O. (2015). Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 580-585.
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J. and Butow, R. A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1110-1117.
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. and Greenberg, M. L. (2000). Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **275**, 22387-22394.
- Joshi, A. S., Zhou, J., Gohil, V. M., Chen, S. and Greenberg, M. L. (2009). Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 212-218.
- Joshi, A. S., Thompson, M. N., Fei, N., Huttemann, M. and Greenberg, M. L. (2012). Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **287**, 17589-17597.
- Kadenbach, B., Mende, P., Kolbe, H. V. J., Stipan, I. and Palmieri, F. (1982). The mitochondrial phosphate carrier has an essential requirement for cardiolipin. *FEBS Lett.* **139**, 109-112.
- Kim, G., Sikder, H. and Singh, K. K. (2002). A colony color method identifies the vulnerability of mitochondria to oxidative damage. *Mutagenesis* **17**, 375-381.
- Kim, T.-H., Zhao, Y., Ding, W.-X., Shin, J. N., He, X., Seo, Y.-W., Chen, J., Rabinowich, H., Amoscato, A. A. and Yin, X.-M. (2004). Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3061-3072.
- Koshkin, V. and Greenberg, M. L. (2000). Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem. J.* **347**, 687-691.
- Koshkin, V. and Greenberg, M. L. (2002). Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem. J.* **364**, 317-322.
- Kucharczyk, R., Salin, B. and di Rago, J.-P. (2009). Introducing the human Leigh syndrome mutation T9176G into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA leads to severe defects in the incorporation of Atp6p into the ATP synthase and in the mitochondrial morphology. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2889-2898.
- Lasserre, J.-P., Dautant, A., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczzen, N., Reynier, P. et al. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis. Model. Mech.* **8**, 509-526.
- Lefebvre-Legendre, L., Balguerie, A., Duvezin-Caubet, S., Giraud, M.-F., Slonimski, P. P. and Di Rago, J.-P. (2003). F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol. Microbiol.* **47**, 1329-1339.
- Li, X.-X., Tsoi, B., Li, Y.-F., Kurihara, H. and He, R.-R. (2015). Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* **63**, 301-311.
- Liao, X. and Butow, R. A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* **72**, 61-71.
- Longine, M. S., McKenzie, A., Ill, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-961.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Manganelli, V., Capozzi, A., Recalchi, S., Signore, M., Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Degli Esposti, M. and Sorce, M. (2015). Altered traffic of cardiolipin during apoptosis: exposure on the cell surface as a trigger for "antiphospholipid antibodies". *J. Immunol. Res.* **2015**, 847985.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R. and Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* **361**, 462-469.
- McMillin, J. B. and Dowhan, W. (2002). Cardiolipin and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 97-107.
- Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2014). Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 42-48.
- Montanari, A., Besagni, C., De Luca, C., Morea, V., Oliva, R., Tramontano, A., Bolotin-Fukuhara, M., Frontali, L. and Francisci, S. (2008). Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects. *RNA* **14**, 275-283.
- Montanari, A., De Luca, C., Frontali, L. and Francisci, S. (2010). Aminoacyl-tRNA synthetases are multivalent suppressors of defects due to human equivalent mutations in yeast mt tRNA genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 1050-1057.

- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5767-5768.
- Neuwald, A. F. (1997). Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency. *Curr. Biol.* **7**, R462-R466.
- Noel, H. and Pande, S. V. (1986). An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. Lipid requirement of carnitine acylcarnitine translocase. *Eur. J. Biochem.* **155**, 99-102.
- Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2005). Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 188-189.
- Park, H., Davidson, E. and King, M. P. (2008). Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *RNA* **14**, 2407-2416.
- Patil, V. A., Fox, J. L., Gohil, V. M., Winge, D. R. and Greenberg, M. L. (2013). Loss of cardiolipin leads to perturbation of mitochondrial and cellular iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **288**, 1696-1705.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L. and Schagger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 52873-52880.
- Rak, M., Tetaud, E., Duvezin-Caubet, S., Ezkurdia, N., Bietenhader, M., Rytka, J. and di Rago, J.-P. (2007a). A yeast model of the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) T8993G mutation in the mitochondrial ATP synthase-6 gene. *J. Biol. Chem.* **282**, 34039-34047.
- Rak, M., Tetaud, E., Godard, F., Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S., Slonimski, P. P., Rytka, J. and di Rago, J.-P. (2007b). Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* **282**, 10853-10864.
- Reaume, S. E. and Tatum, E. L. (1949). Spontaneous and nitrogen mustard-induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem.* **22**, 331-338.
- Rigoulet, M. and Guerin, B. (1979). Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett.* **102**, 18-22.
- Rigoulet, M., Velours, J. and Guerin, B. (1985). Substrate-level phosphorylation in isolated yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **153**, 601-607.
- Robinson, N. C. (1993). Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 153-163.
- Rorbach, J., Yusoff, A. A., Tuppen, H., Abg-Kamaludin, D. P., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., McFarland, R. and Lightowlers, R. N. (2008). Overexpression of human mitochondrial valyl tRNA synthetase can partially restore levels of cognate mt-tRNAVal carrying the pathogenic C25U mutation. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3065-3074.
- Sasarman, F., Antonicka, H. and Shoubridge, E. A. (2008). The A3243G tRNA^{Leu}(UUR) MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3697-3707.
- Sauerwald, J., Jores, T., Eisenberg-Bord, M., Chuartzman, S. G., Schuldiner, M. and Rapaport, D. (2015). Genome-wide screens in *Saccharomyces cerevisiae* highlight a role for cardiolipin in biogenesis of mitochondrial outer membrane multispan proteins. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3200-3211.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schlame, M. (2013). Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 582-588.
- Schlame, M. and Haldar, D. (1993). Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 74-79.
- Schlame, M., Rua, D. and Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **39**, 257-288.
- Schlame, M., Kelley, R. I., Feigenbaum, A., Towbin, J. A., Heerdt, P. M., Schieble, T., Wanders, R. J. A., DiMauro, S. and Blanck, T. J. J. (2003). Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1994-1999.
- Schlame, M., Acehan, D., Berno, B., Xu, Y., Valvo, S., Ren, M., Stokes, D. L. and Epand, R. M. (2012). The physical state of lipid substrates provides transacylation specificity for tafazzin. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 862-869.
- Schwimmer, C., Lefebvre-Legendre, L., Rak, M., Devin, A., Slonimski, P. P., di Rago, J.-P. and Rigoulet, M. (2005). Increasing mitochondrial substrate-level phosphorylation can rescue respiratory growth of an ATP synthase-deficient yeast. *J. Biol. Chem.* **280**, 30751-30759.
- Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., Carrara, F., D'Adamo, P., Calvo, S., Marsano, R. M., Donnini, C., Weiher, H., Strisciuglio, P. et al. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **38**, 570-575.
- Testet, E., Laroche-Traineau, J., Noubhani, A., Coulon, D., Bunoust, O., Camougrand, N., Manon, S., Lessire, R. and Bessoule, J.-J. (2005). Ypr140wp, 'the yeast tafazzin', displays a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochem. J.* **387**, 617-626.
- Tibbetts, A. S., Sun, Y., Lyon, N. A., Ghrist, A. C. and Trotter, P. J. (2002). Yeast mitochondrial oxodicarboxylate transporters are important for growth on oleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 96-104.
- Valianpour, F., Mitsakos, V., Schlemmer, D., Towbin, J. A., Taylor, J. M., Ekert, P. G., Thorburn, D. R., Munnich, A., Wanders, R. J., Barth, P. G. et al. (2005). Monolysocardiolipins accumulate in Barth syndrome but do not lead to enhanced apoptosis. *J. Lipid Res.* **46**, 1182-1195.
- Vaz, F. M., Houtkooper, R. H., Valianpour, F., Barth, P. G. and Wanders, R. J. A. (2003). Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 43089-43094.
- Venard, R., Brêthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J. and Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* **42**, 7626-7636.
- Vitello, F. and Zanetta, J.-P. (1978). Thin-layer chromatography of phospholipids. *J. Chromatogr. A* **166**, 637-640.
- Vreken, P., Valianpour, F., Nijtmans, L. G., Grivell, L. A., Plecko, B., Wanders, R. J. A. and Barth, P. G. (2000). Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 378-382.
- Wittig, I. and Schägger, H. (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 672-680.
- Xu, Y., Sutachan, J. J., Plesken, H., Kelley, R. I. and Schlame, M. (2005). Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab. Invest.* **85**, 823-830.
- Xu, Y., Condell, M., Plesken, H., Edelman-Novemsky, I., Ma, J., Ren, M. and Schlame, M. (2006). A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11584-11588.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 43553-43556.

Répartition des différents phospholipides (%)

A	PE	CL	PI	PC
WT+pØ	33,0 ± 2,4	12,5 ± 2,3	8,1 ± 0,2	46,4 ± 0,1
Δtaz1+pØ	32,4 ± 1,2	6,4 ± 0,5	17,5 ± 1,6	43,7 ± 0,4
Δtaz1+pTAZ1	35,9 ± 1,9	11,7 ± 1,2	11,1 ± 0,7	41,3 ± 3,4
Δtaz1+pODC1	30,1 ± 0,1	8,5 ± 0,5	14,7 ± 0,6	46,7 ± 1,1

Composition en acides gras des PE (%)

B	16:0	16:1	18:0	18:1	AG saturés	AG insaturés
WT+pØ	11,8 ± 1,0	39,7 ± 2,6	1,8 ± 0,4	46,7 ± 1,7	13,6	86,4
Δtaz1+pØ	10,5 ± 0,3	45,6 ± 1,0	1,3 ± 0,1	42,6 ± 0,9	11,8	88,2
Δtaz1+pTAZ1	9,4 ± 0,2	42,2 ± 1,1	1,2 ± 0,2	47,2 ± 0,9	10,7	89,3
Δtaz1+pODC1	10,7 ± 0,2	44,6 ± 1,5	1,5 ± 0,3	43,1 ± 1,1	12,3	87,7

Composition en acides gras des CL (%)

C	16:0	16:1	18:0	18:1	AG saturés	AG insaturés
WT+pØ	12,2 ± 2,7	27,9 ± 2,8	5,7 ± 0,5	54,2 ± 0,3	17,9	82,1
Δtaz1+pØ	18,8 ± 1,4	26,9 ± 1,6	10,1 ± 1,2	44,1 ± 1,1	29,0	71,0
Δtaz1+pTAZ1	8,1 ± 0,4	33,2 ± 2,3	4,6 ± 0,4	54,2 ± 2,8	12,6	87,4
Δtaz1+pODC1	21,1 ± 1,1	25,2 ± 2,0	8,7 ± 2,0	45,1 ± 1,0	29,8	70,2

Composition en acides gras des PI (%)

D	16:0	16:1	18:0	18:1	AG saturés	AG insaturés
WT+pØ	23,1 ± 1,0	16,3 ± 0,9	19,2 ± 0,7	41,4 ± 1,3	42,3	57,7
Δtaz1+pØ	25,2 ± 1,4	18,3 ± 1,0	14,1 ± 0,8	42,4 ± 1,1	39,3	60,7
Δtaz1+pTAZ1	23,2 ± 0,9	19,0 ± 0,4	16,8 ± 0,5	41,1 ± 0,6	40,0	60,0
Δtaz1+pODC1	23,8 ± 0,6	19,0 ± 0,6	15,2 ± 0,4	42,0 ± 0,5	39,0	61,0

Composition en acides gras des PC (%)

E	16:0	16:1	18:0	18:1	AG saturés	AG insaturés
WT+pØ	11,7 ± 0,3	41,2 ± 1,6	9,4 ± 0,8	37,6 ± 1,4	21,2	78,8
Δtaz1+pØ	8,3 ± 0,4	42,0 ± 0,8	7,8 ± 0,4	41,9 ± 0,6	16,1	83,9
Δtaz1+pTAZ1	9,2 ± 1,2	41,2 ± 3,0	9,1 ± 1,0	40,6 ± 1,0	18,2	81,8
Δtaz1+pODC1	9,0 ± 0,6	43,9 ± 1,1	6,6 ± 0,2	40,6 ± 1,4	15,6	84,4

Tableau 6 : Quantification et composition en chaînes acyles de différents phospholipides mitochondriaux (n=3). A) Composition des membranes mitochondriales en phosphatidyléthanoline (PE), cardiolipines (CL), phosphatidylinositols (PI) et phosphatidylcholine (PC). Les phosphatidylsérines et les acides phosphatidiques étaient présents en trop faible quantité pour être quantifiés. Répartition des acides gras au sein des différents phospholipides : B) PE, C) CL, D) PI et E) PC. 16:0 acide palmitique, 16:1 acide palmitoléique, 18:0 acide stéarique et 18:1 acide oléique.

IV. Résultats complémentaires

IV.1. Analyse lipidomique

Étant donné la fonction, maintenant bien décrite, de la protéine Taz1p dans le remodelage des cardiolipines, nous nous sommes intéressés à la composition lipidique des membranes mitochondriales des différentes souches. Comme attendu, les résultats indiquent que la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ présente une diminution de son contenu en cardiolipines (CL) d'environ 50% et une augmentation de 50% des phosphatidylinositols (PI) (Tableau 6). Les autres phospholipides (PE et PC) ne sont pas affectés par la perte de la tafazzine. Nous avons ensuite déterminé la composition en chaînes acyles de ces différents phospholipides. Conformément à ce qui a été décrit pour les patients et de nombreux modèles du BTHS, le contenu en acides gras saturés du mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ est augmenté d'environ 35% pour l'acide palmitique (C16:0) et 40% pour l'acide stéarique (C18:0). En contrepartie, les acides gras insaturés sont diminués, notamment les acides oléiques (C18:1) comme déjà montré par Gu *et al.*, ou Testet *et al.* (Gu *et al.*, 2004 # Testet *et al.*, 2005). Ces résultats, conformes à ce qui avait déjà été publié, permettent de valider notre souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$.

Il est connu que la tafazzine exerce sa fonction de transacylase préférentiellement entre les CL et les PC (Testet *et al.*, 2005). Elle transfère donc des chaînes acyles insaturées des PC sur les monolysocardiolipines (MLCL). Ici, les résultats montrent une légère augmentation des chaînes acyles insaturées dans les PC de la souche $\Delta taz1+p\emptyset$. La composition en chaînes acyles des PI et PE n'est pas affectée par la mutation $\Delta taz1+p\emptyset$.

La surexpression de la protéine Taz1p permet de restaurer un profil lipidique similaire au sauvage. En effet, la quantité de CL et de PI sont sensiblement les mêmes entre la souche $\Delta taz1+pTAZ1$ et la souche sauvage WT+p \emptyset . Ces résultats montrent donc que l'absence de la tafazzine est bien responsable du défaut en phospholipides observé. D'autre part, la surexpression du transporteur Odc1p dans la souche $\Delta taz1+pODC1$ ne permet pas de retrouver des quantités de CL et PI normales. Ce résultat indique que la restauration d'une respiration mitochondriale normale ne passe pas par la restauration du défaut primaire qui est la diminution des CL.

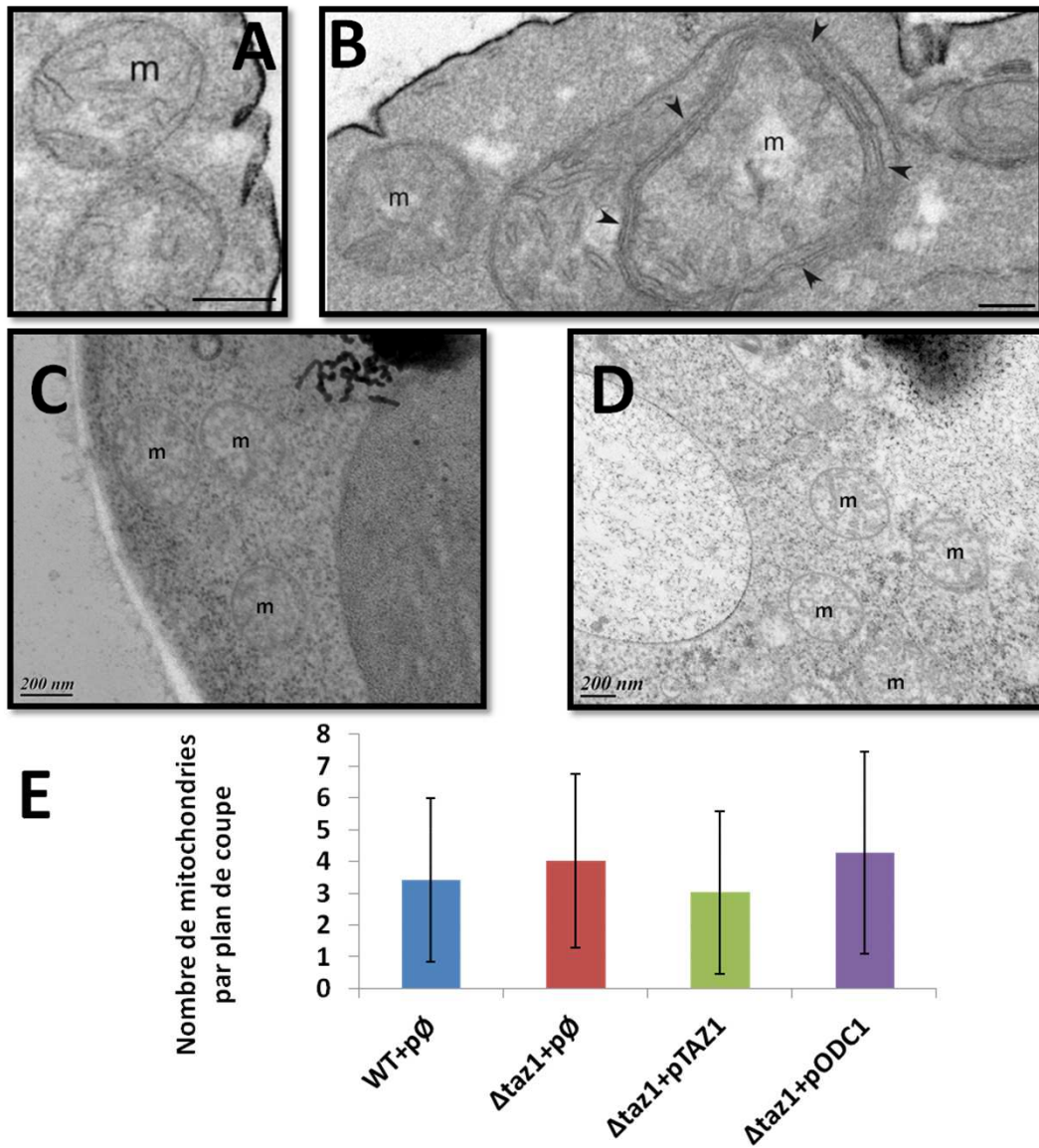


Figure 35 : Analyses en Microscopie Electronique à Transmission A) Morphologie de mitochondries (m) de levures sauvages de fond génétique GA74-1A (d'après Claypool et al, 2008). B) Morphologie de mitochondries (m) de levures mutantes $\Delta taz1$ (d'après Claypool et al, 2008). Les mitochondries présentent des crêtes anormales, hypertrophiées et circularisées. C) Morphologie de mitochondries (m) de levures sauvages de fond génétique W303 (modèle du laboratoire). D) Morphologie de mitochondries (m) de levures mutantes $\Delta taz1$ (modèle du laboratoire). E) Comptage du nombre de mitochondries par coupe. Afin d'avoir un comptage homogène d'une souche à l'autre, seules les coupes présentant à la fois le noyau et la vacuole sont prises en compte. Échelle : 200 nm

IV.2. Analyse des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET)

Des défauts morphologiques mitochondriaux sont souvent décrits pour les cellules de patients du BTHS (Barth *et al.*, 1983). Nous avons donc observé l'ultrastructure des mitochondries des levures mutantes $\Delta taz1$ en microscopie électronique à transmission (MET) pour vérifier ce phénotype. Curieusement, aucune variation morphologique n'a pu être mise en évidence dans notre modèle levure (Fig. 35). Il est à noter que les mitochondries, y compris les mitochondries issues de la souche sauvage WT+p \emptyset , ne présentent que très peu de crêtes, rendant difficile la mise en évidence d'un défaut.

La MET a aussi permis de compter le nombre de mitochondries par sections. Afin de réaliser un comptage homogène, nous avons compté les mitochondries présentes dans des plans de coupe montrant à la fois le noyau et la vacuole. Bien qu'aucune différence statistique ne soit observée, une tendance semble se dégager. En effet, la délétion du gène *TAZ1* semble augmenter légèrement le nombre de mitochondries par section passant de 3,4 pour la souche WT+p \emptyset à 4 mitochondries en moyenne pour le mutant $\Delta taz1$ +p \emptyset . Dans la souche $\Delta taz1$ +p*TAZ1*, la surexpression de la tafazzine semble légèrement diminuer ce nombre de mitochondries à 3 mitochondries par section. La surexpression du transporteur Odc1p ne modifie pas le nombre de mitochondries par section (4,3 mitochondries en moyenne pour la souche $\Delta taz1$ +p*ODC1* versus 4 mitochondries pour le mutant $\Delta taz1$ +p \emptyset). La légère augmentation observée dans le mutant $\Delta taz1$ +p \emptyset par rapport à la souche sauvage WT+p \emptyset pourrait être due à une biogénèse mitochondriale augmentée.

IV.3. Estimation de la biogénèse mitochondriale

Dans de nombreuses maladies mitochondriales, une biogénèse mitochondriale accrue est observée. En effet, il semble assez logique de penser qu'une diminution d'une ou plusieurs activités de la mitochondrie puisse être contrebalancée par une augmentation du réseau mitochondrial.

Afin de mesurer la biogénèse mitochondriale, nous avons utilisé un plasmide portant le gène rapporteur *LACZ* sous le contrôle du promoteur du gène *SDH3* (gentiment donné par Bertrand Daignan-Fornier, Daignan-Fornier *et al.*, 1994). Ainsi, l'activité β -galactosidase est

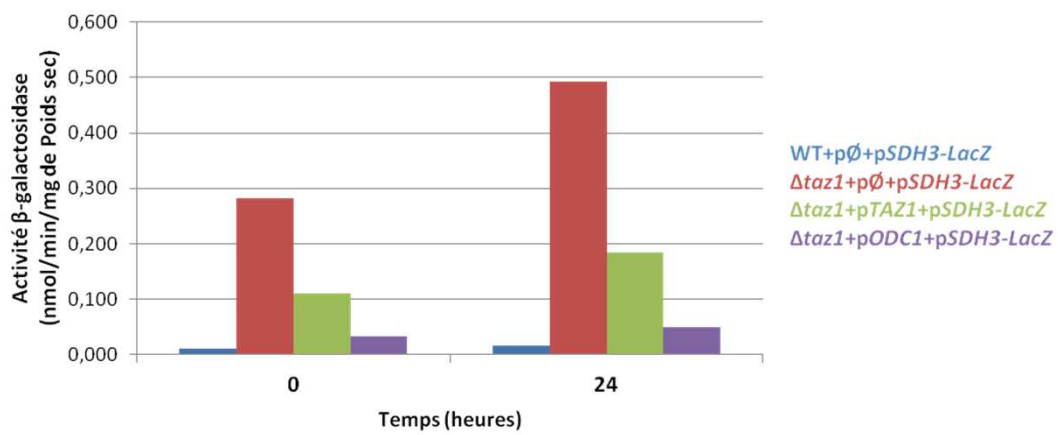


Figure 36 : Suivi de la biogénèse mitochondriale. La biogénèse mitochondriale est suivie par l'activité β -galactosidase portée par un plasmide contenant la protéine de fusion du gène SDH3-lac z.

dépendante de l'induction du promoteur du gène *SDH3*, qui, en temps normal, régule la transcription d'une sous-unité protéique du complexe II de la chaîne respiratoire. L'activité β -galactosidase devrait donc être proportionnelle à la biogénèse mitochondriale. Les résultats obtenus sont issus de deux expériences indépendantes (Fig. 36). Après une pré-culture dans un milieu pauvre CSM contenant 0,5% galactose et 2% éthanol à 28°C, l'activité β -galactosidase est mesurée avant la mise en culture à 36°C (conditions permissives) puis 24 heures après le passage à 36°C (conditions restrictives). Bien que non statistiques ($n=2$), les résultats tendent à montrer que l'activité β -galactosidase est élevée dans le mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ dès le temps 0 (presque 30 fois supérieure à l'activité de la souche WT+p \emptyset) et qu'elle est encore augmentée d'un facteur 1,5 après 24 heures dans le milieu restrictif. La surexpression d'*ODC1* permet de revenir à un niveau proche de la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la biogénèse mitochondriale observée dans la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ est rétablie à un niveau proche de la souche sauvage après surexpression du suppresseur *ODC1*.

III.4. Mitophagie

En conditions permissives (ou non restrictives), le mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ a une activité β -galactosidase supérieure à celle du sauvage qui est cohérente avec l'augmentation de la quantité de mitochondries observée dans les cellules de patients BTHS (Barth *et al.*, 1983 # Xu *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que dans nos conditions, le comptage des mitochondries en MET ne montrait qu'une faible augmentation dans la souche $\Delta taz1+p\emptyset$ comparé à la souche sauvage WT+p \emptyset . Il semble donc qu'il y ait un décalage entre ces deux types d'expériences. Cette différence pourrait s'expliquer peut-être par une mitophagie accrue dans la souche $\Delta taz1+p\emptyset$. En effet, l'activité β -galactosidase nous permet de mesurer la biogénèse mitochondriale alors que la MET permet de compter le nombre de mitochondries à un instant T. Entre la biogénèse mitochondriale et le nombre final de mitochondries, il peut se passer plusieurs événements dont la dégradation des mitochondries défectueuses par mitophagie.

Pour estimer l'influence de la mitophagie sur l'abondance mitochondriale, nous avons transformé nos souches avec un plasmide portant un gène codant pour la protéine chimère Idp1-GFP (gentiment fourni par Nadine Camougrand, IBGC # Deffieu *et al.*, 2012). La

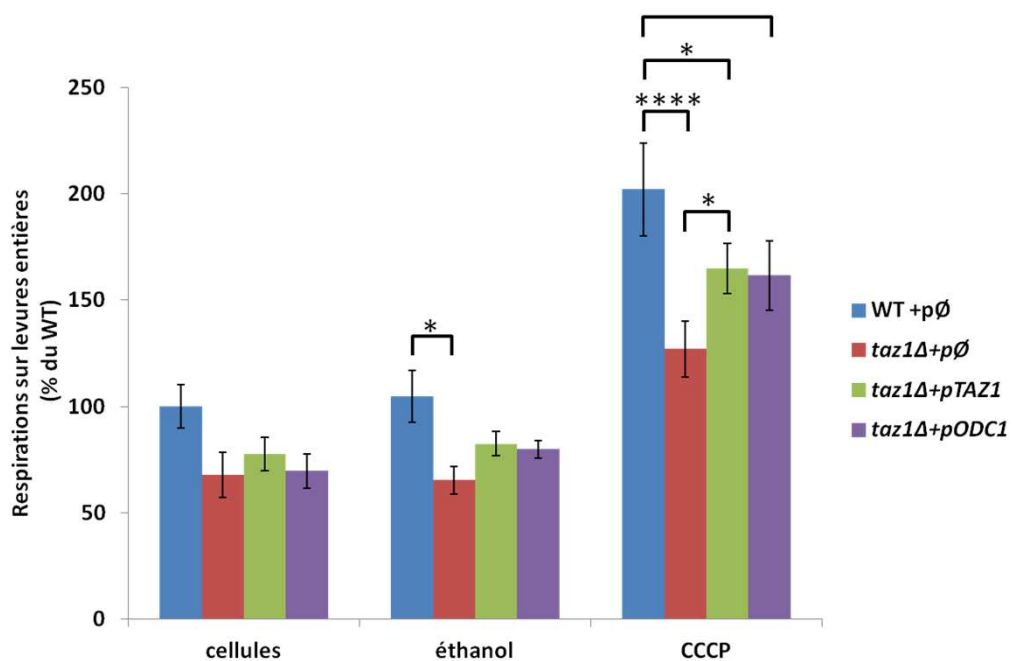


Figure 37 : Respirations sur cellules entières. La consommation d'oxygène d'une UDO de levures a été suivie à l'aide d'une électrode de Clark en présence de 10 μ L d'éthanol puis de 10 μ L de CCCP 1M dans un volume final de 1,2 mL de milieu de culture CSM+0,5% galactose. Test de Tukey, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$

protéine Idp1p étant l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale, la protéine chimérique Idp1-GFP est donc adressée dans la matrice mitochondriale. En cas de mitophagie, les protéines mitochondriales sont dégradées par les hydrolases de la vacuole. Dans le cas de la protéine de fusion Idp1-GFP, la partie Idp1 sensible à la protéolyse est dégradée alors que la partie GFP est plus résistante. L'accumulation de GFP libre reflète donc une induction de la mitophagie. À ce jour, les résultats obtenus sont très variables et ne permettent pas de tirer de conclusions sur l'induction de la mitophagie dans le cas de la mutation $\Delta taz1$. Les conditions expérimentales doivent être affinées.

IV.5. Respiration sur cellules entières

Avant de réaliser l'isolement des mitochondries, des cellules issues de la culture sont récupérées et utilisées pour réaliser des mesures de respiration sur cellules entières. Rapidement, l'expérience consiste à mesurer la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode de Clark. Quatre mesures sont réalisées successivement : la consommation d'oxygène par (i) les cellules seules ; (ii) après ajout d'éthanol, un substrat respiratoire ; (iii) après ajout de l'agent découplant qu'est le CCCP ; (iv) après l'ajout d'antimycine, un inhibiteur du complexe III pour vérifier que la consommation d'oxygène mesurée est bien due à l'activité de la chaîne respiratoire et ainsi s'assurer de l'absence de contaminations éventuelles. Même si les différences observées sont moins fortes que celles observées sur mitochondries isolées, les tendances sont les mêmes (Fig. 37). En effet, en présence de CCCP, on observe une diminution de la respiration d'environ 40% dans le mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ comparé à la souche sauvage. La surexpression de la protéine Taz1p ou du transporteur Odc1p permet d'améliorer la respiration. Curieusement, alors que sur mitochondries isolées la respiration des souches $\Delta taz1+pTAZ1$ et $\Delta taz1+pODC1$ retourne à des valeurs proches de la souche sauvage WT+p \emptyset , sur cellules entières, cette restauration n'est que partielle.

IV.6. Implication de la voie rétrograde

Il est connu que la voie rétrograde qui permet la communication entre la mitochondrie et le noyau permet une adaptation métabolique de la cellule notamment en

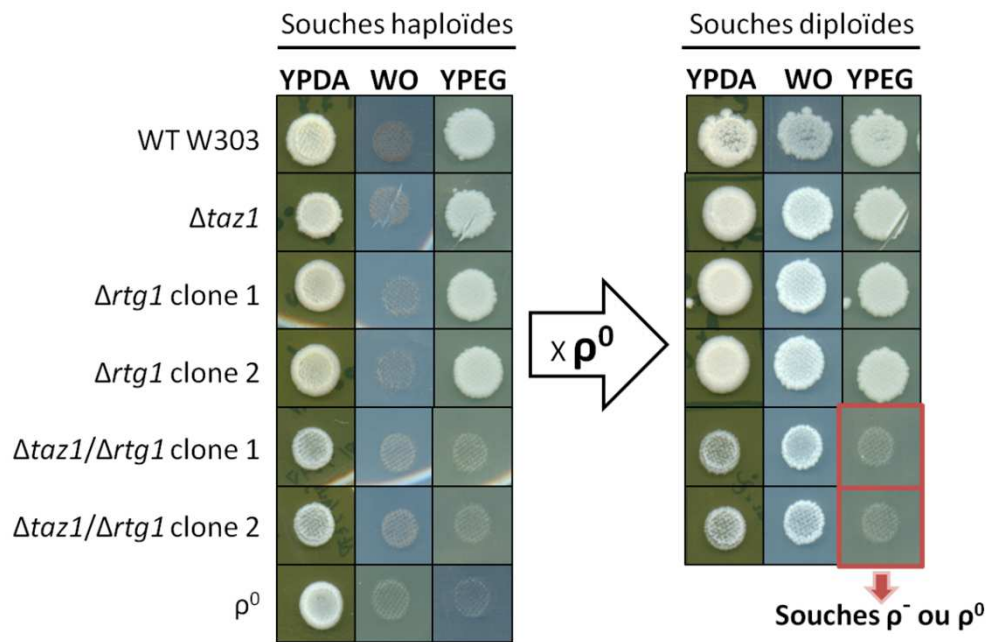


Figure 38 : Vérification du contenu en ADN mitochondrial des souches $\Delta rtg1$. Différentes souches, délétées pour le gène *TAZ1*, *RTG1* ou les deux et construites dans le fond W303 (*MATa ade2-1 ura3-1 his311, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*) ont été croisées avec une souche ρ^0 déficiente en ADNmt (*MATa met-*) sur un milieu fermentaire YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adénine). Les gouttes obtenues ont ensuite été répliquées par velours sur milieu minimum WO (milieu sans acides aminés, avec du glucose comme source de carbone) et sur milieu respiratoire YPEG (Yeast Peptone Ethanol Glycerol). Sur milieu WO, seuls les diploïdes peuvent pousser grâce aux prototrophies apportées respectivement par l'une et l'autre des souches. Ce milieu sert donc de contrôle de croisement. Sur milieu YPEG, seules peuvent pousser les souches ρ^+ . Des défauts de croissance des diploïdes en milieu respiratoires sont obligatoirement dus à des défauts de l'ADNmt (souches ρ^- ou ρ^0), puisque des défauts de l'ADN nucléaire sont compensés par l'ADN nucléaire « sauvage » de la souche ρ^0 utilisée pour les croisements.

conditions physio-pathologiques (Butow & Avadhani, 2004). La protéine Rtg1p est l'une des principales protéines de cette voie.

Alors que les simples mutants $\Delta taz1$ et $\Delta rtg1$ sont viables en milieu respiratoire (YPEG), les doubles mutants $\Delta taz1/\Delta rtg1$ ne le sont pas. Cependant, ils sont viables en milieu fermentaire (YPDA) (Fig. 38). Nous nous sommes demandés si cette létalité synthétique en milieu respiratoire était due à une perte de l'ADNmt. Pour répondre à cette question, nous avons croisé les souches mutantes haploïdes avec une souche ρ^0 haploïde. Pour s'assurer que les croisements ont bien eu lieu, les diploïdes présumés ont été placés en milieu WO. Ce milieu minimum ne contenant aucun acide aminé, les souches à tester qui sont auxotrophes pour l'adénine, l'uracile, l'histidine, le tryptophane et la leucine et la souche ρ^0 qui est auxotrophe pour la méthionine ne peuvent pas croître. En revanche, les diploïdes (souche à tester x ρ^0) sont aptes à pousser puisque les prototrophies d'une souche compensent les auxotrophies de l'autre. La croissance des doubles mutants en WO nous permet de confirmer que le croisement a bien eu lieu et que les souches sont diploïdes. De plus, si le défaut de croissance respiratoire des doubles mutants $\Delta taz1/\Delta rtg1$ est dû à des mutations nucléaires récessives, ce défaut devrait être compensé par le génome nucléaire de la souche ρ^0 qui est de type sauvage. En revanche, si le défaut est dû à une perte partielle ou totale de l'ADNmt, la souche ρ^0 ne pourra pas le compenser. Comme nous l'avions suspecté, les doubles mutants diploïdes ne peuvent pas se développer en milieu respiratoire YPEG, ce qui indique que les doubles mutants haploïdes sont soit ρ^- soit ρ^0 . La perte à la fois de la protéine Taz1p et de la protéine Rtg1p semble donc fortement déstabiliser le génome mitochondrial.

V. Discussion

V.1. Défauts des OXPHOS

Les défauts de croissance de la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ aussi bien en milieu solide que liquide sont cohérents avec la description du BTHS réalisée par Barth *et al.* (Barth *et al.*, 1983), et les nombreux modèles du BTHS (Ma *et al.*, 2004 # Dudek *et al.*, 2013). Les résultats montrent que ce retard de croissance est bien dû à l'absence de la tafazine puisque la réintroduction du gène *TAZ1* dans les cellules mutantes $\Delta taz1$ ($\Delta taz1+pTAZ1$) permet de corriger ce défaut de croissance. En accord avec certaines études antérieures utilisant le

modèle levure (Schlame & Haldar, 1993 # Schlame *et al.*, 2000 # Vaz *et al.*, 2003 # Gu *et al.*, 2004 # Brandner *et al.*, 2005), nous trouvons que l'absence de la tafazzine compromet la respiration mitochondriale. Plus précisément, les analyses de biochimie et de bioénergétique révélèrent une diminution d'environ 50% du cytochrome c et de la sous-unité Cox2p du complexe IV, tous deux impliqués dans le transfert d'électrons à l'oxygène. Ces résultats semblent mettre en cause des défauts d'abondance plutôt que des problèmes de fonctionnalité de ces protéines et complexes protéiques.

V.1.1. Résultats similaires avec d'autres études

Les conséquences des mutations dans le gène *TAZ* rapportées dans la bibliographie peuvent être assez hétérogènes. Cependant, certaines études sont très comparables dans les résultats obtenus. Sur des mitochondries isolées à partir de biopsies musculaires de patients, Barth *et al.* ont aussi montré une diminution de la vitesse respiratoire lorsque la chaîne est stimulée par du succinate (substrat du complexe II), ou par de l'ascorbate + TMPD (Tri Méthyl Phénylène Diamide, substrat du complexe IV) similaire à celle trouvée dans notre étude. Ces diminutions sont corrélées, dans leur étude, à une diminution de différents cytochromes (diminution de 50% des cytochromes b, 70% des cytochromes c+c1, 80% du cytochrome c mesuré seul et 40% des cytochromes aa3). Du fait de l'implication des cytochromes dans la composition des différentes sous-unités de la chaîne respiratoire, cette diminution explique probablement les défauts respiratoires observés (Barth *et al.*, 1983). D'autre part, il est aujourd'hui bien admis que le cytochrome c (Cyt_c) et les CL peuvent interagir par des liaisons hydrophobes (III.4.2.5. – Cardiolipines et apoptose). Cette interaction bloque le Cyt_c qui perd alors sa faculté à transporter les électrons. D'autre part, cette interaction entraîne l'acquisition d'une fonction peroxydase par le Cyt_c induisant la peroxydation des chaînes acyles des CL. Cette peroxydation entraîne à son tour le relargage du cytochrome c qui serait alors plus sensible à la dégradation. Ceci expliquerait la diminution en Cyt_c que nous observons (Fig. 5D de l'article I, p107). De plus, comme trouvé par Chen *et al.*, le mutant $\Delta taz1$ produit des ROS (Chen *et al.*, 2008) qui sont responsables de la perte de l'affinité des CL hydroperoxydées (CL-OOH) pour le cytochrome c, aggravant le relargage du Cyt_c. Dans nos résultats, nous montrons aussi une augmentation des ROS (Fig. 6 de l'article I, p108).

Gonzalvez *et al.*, sur mitochondries isolées à partir de fibroblastes de patients, ont aussi observé ces défauts respiratoires en utilisant le succinate et l'ascorbate+TMPD. Ils ont aussi mesuré une diminution de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Ces déficiences sont associées à une réduction quantitative de sous-unités des complexes I et IV, ainsi qu'à une déstabilisation de 50% des supercomplexes I-III₂-IV_n. La déstabilisation de ces supercomplexes a aussi été observée dans des lymphoblastes de patients (MacKenzie *et al.*, 2006). Nous avons aussi observé cette déstabilisation uniquement pour les supercomplexes III₂-IV₂ et III₂-IV₁ car la levure ne possède pas de complexe I (Fig. 5B de l'article I, p107). Dans ces études, les défauts respiratoires, ainsi que la diminution de synthèse d'ATP, sont compensés à l'échelle cellulaire par une augmentation de la masse mitochondriale (Gonzalvez *et al.*, 2013). Bien que non statistique, il semblerait que cette compensation existe aussi dans la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ puisque nous observons non seulement une augmentation de l'activité β -galactosidase mais aussi un nombre de mitochondrie par section légèrement augmenté. De plus, les différences observées entre les souches WT+p \emptyset et mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ lors de la respiration basale (cellules seules) sur cellules entières (Fig. 38) sont plus faibles que les différences observées pour la respiration basale (mitochondrie + NADH) sur mitochondries isolées (Fig. 3 A de l'article I, p104). Une augmentation de la masse mitochondriale pourrait expliquer ce résultat.

V.1.2. Des résultats légèrement différents

Alors que certaines études montrent des résultats similaires, d'autres études peuvent avoir quelques résultats qui diffèrent légèrement. Par exemple, l'étude de Baile *et al.*, en 2014, montre effectivement une diminution de la respiration mitochondriale dans la souche mutante $\Delta taz1$ cultivée à 37°C (Baile *et al.*, 2014). Cependant, contrairement à notre étude, aucune diminution des protéines ou complexes protéiques n'a été observée. Étant donné que la souche utilisée est la même (W303), les différences observées ne peuvent pas s'expliquer par un fond génétique différent. Une explication beaucoup plus probable réside dans le fait que les milieux de culture utilisés sont différents. En effet, alors que notre étude a été réalisée en milieu CSM contenant du galactose et de l'éthanol, Baile *et al.* utilisent un milieu riche contenant du lactate.

V.1.3. Des études très différentes

Curieusement certains modèles donnent des résultats très différents et ne montrent pas de diminution de la respiration mitochondriale. Au contraire, certaines études ont montré une augmentation de la respiration sur mitochondrie isolée. Ainsi, dans leur modèle de levure mutante *Δtaz1*, Testet *et al.* ont mis en évidence un état 3 (mitochondries + NADH) et un état 4 (mitochondries + NADH + ADP) multipliés par deux dans la souche mutante *Δtaz1* vs la souche WT (Testet *et al.*, 2005). Cette différence importante pourrait s'expliquer par deux différences majeures entre cette étude et la nôtre. En effet, la souche BY4742 utilisée dans leur étude a un fond génétique différent de la souche W303 utilisée dans notre étude. Une autre différence importante est le substrat respiratoire utilisé. Alors qu'ils donnent du lactate comme substrat respiratoire lors de la culture des cellules, nous utilisons un autre substrat qui est l'éthanol additionné d'une petite quantité de galactose. Ces différences majeures pourraient donc expliquer les différences de résultats. D'ailleurs, il est à noter que dans nos conditions, la souche BY4742 ne présentait pas de phénotype de croissance respiratoire. Les défauts au niveau des OXPHOS semblent donc dépendants des substrats utilisés lors de la culture des cellules et du fond génétique de ces dernières. Dans l'étude de Kiebish *et al.*, il est justement montré que, dans le modèle murin *TazKD*, l'impact de l'absence de la tafazine sur la respiration mitochondriale est très variable selon le substrat utilisé. Ainsi, sur mitochondries isolées, l'utilisation de pyruvate comme seul substrat respiratoire n'a pas de conséquence, alors que le pyruvate associé au glutamate ou au palmitoyl-L-carnitine seul diminuent la respiration. En revanche, le glutamate seul augmente la respiration à l'état 3 (Kiebish *et al.*, 2013).

Étant donné que les défauts observés au niveau des OXPHOS dans les mutants *Δtaz1* semblent dépendants des conditions de culture et des souches, il est logique de penser que ce défaut ne soit pas un défaut primaire, mais plutôt un défaut secondaire consécutivement à l'absence d'autres fonctions.

V.2. Perte de l'ADNmt

Le mutant *Δtaz1+p∅* utilisé dans notre étude montre une certaine tendance à perdre son ADNmt lorsqu'il est cultivé en milieu fermentaire glucose. Dans ces conditions

fermentaires, l'ADNmt n'est plus indispensable. Étant donné que toutes les protéines impliquées dans le maintien de l'ADNmt sont codées par l'ADN nucléaire puis importées dans la mitochondrie, l'augmentation de cellules $p^{-/0}$ observée pourrait être due à un défaut d'import de ces protéines. Il est, en effet, bien connu que la biogénèse des systèmes d'import mitochondriaux de la membrane externe (TOM, SAM) est moins efficace dans une souche déficiente pour le remodelage des CL (III.4.2.5.- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales). En effet, des défauts dans ces systèmes d'import associés à des défauts du remodelage des CL sont synthétiques létaux (Gebert *et al.*, 2009 # Sauerwald *et al.*, 2015). D'autres études ont déjà montré qu'un problème d'import dans la mitochondrie pouvait conduire à la perte de l'ADNmt (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2003). Dans notre étude, l'absence de la tafazzine conduit à une diminution de CL insaturées qui entrainerait des changements de propriétés des membranes mitochondriales aboutissant à des problèmes d'import. Les protéines impliquées dans les systèmes de maintien de l'ADNmt étant moins bien importées, l'ADNmt aurait tendance à être perdu au cours du temps.

V.3. Composition lipidique des membranes mitochondriales

V.3.1. Le défaut en CL : un phénotype robuste

La diminution des CL est une caractéristique retrouvée chez les patients du BTHS (Vreken *et al.*, 2000) et dans tous les modèles de cette pathologie décrits à ce jour (cellules iPS : Wang *et al.*, 2014 # levures : Gu *et al.*, 2004 # Testet *et al.*, 2005 # Claypool *et al.*, 2008 # drosophile : Xu *et al.*, 2006 # souris : Kiebish *et al.*, 2013). Le modèle levure utilisé dans notre étude, dans les conditions de culture utilisées, montre aussi une diminution de 50% des CL (Fig. 1B de l'article I, p103 , Tableau 6).

V.3.2. Qu'en est-il des autres phospholipides ?

En revanche, les proportions des autres phospholipides sont moins documentées et peuvent varier d'une étude à l'autre. Vreken *et al.*, sur fibroblastes de patients, ont montré que, mis à part les CL, les autres phospholipides ne sont pas significativement affectés par la mutation du gène *TAZ* (Vreken *et al.*, 2000).

Chez des levures délétées pour le gène *TAZ1*, Gu *et al.* ont mis en évidence, en plus de la diminution des CL, une diminution des PA d'environ 40% et une augmentation des PE et PS d'environ 30% et 40%, respectivement (Gu *et al.*, 2004). Dans notre analyse, les PA et PS étaient présents en trop faible quantité pour être quantifiés. En revanche, notre modèle et celui de Testet *et al.* montrent une augmentation des PI mais pas d'augmentation des PE (Testet *et al.*, 2005). L'augmentation du PI n'étant pas retrouvée dans tous les modèles, ce phénotype n'est probablement pas directement lié à la mutation du gène $\Delta taz1$. Les différences de fond génétique ne sont probablement pas en cause non plus, puisque notre étude et celle de Gu *et al.*, qui présentent des résultats différents, ont été menées dans le fond W303 alors que celle de Testet *et al.*, qui donne les mêmes résultats, a été menée dans un fond BY4742.

L'hypothèse la plus simple pour expliquer l'augmentation des PI, dans notre étude est que la synthèse des cardiolipines est ralentie par la délétion du gène *TAZ1*, entraînant une accumulation de précurseurs et notamment de CDP-DAG (Cytidine DiPhosphate DiAcylGlycérol), qui va alors être métabolisé en PI grâce à la protéine *Pis1p* (PhosphatidyInositol Synthase1). Cependant, plusieurs études ont montré que la synthèse des CL est, au contraire, augmentée (Gu *et al.*, 2004 # Xu *et al.*, 2016).

Une autre hypothèse est que les variations de la quantité de PI entre les différents modèles seraient liées aux différents milieux et conditions de culture utilisés. En effet, nous avons utilisé, dans notre étude, un milieu minimum (CSM) complété avec 2% d'éthanol et 0,5% de galactose. La souche sauvage consomme progressivement cet éthanol. Le mutant $\Delta taz1$, en revanche, semble ne pas pouvoir utiliser de manière optimale l'éthanol comme substrat (Fig. 2B de l'article I, p104). La concentration en éthanol sera donc probablement supérieure dans le milieu de culture de la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ comparée à celle du milieu de culture de la souche sauvage WT+p \emptyset . Or, il a été montré qu'une augmentation des PI permet une meilleure tolérance à l'éthanol (Chi *et al.*, 1999). De plus, il semblerait que la température soit un facteur environnemental qui entraînerait une augmentation des PI (Henderson *et al.*, 2013). L'augmentation des PI dans la souche $\Delta taz1+p\emptyset$ pourrait donc être probablement une adaptation au milieu et à la haute température utilisée. Gu *et al.* ont, avec une souche isogénique à la nôtre, utilisé un milieu riche avec, pour source de carbone, 3% de glycérol et seulement 0,95% d'éthanol à la température de 30°C. Ces conditions sont

certainement moins drastiques et ne demandent pas la même adaptation. Enfin, il est vrai que Testet *et al.* ont aussi utilisé un milieu riche mais avec 2% de lactate à la température de 30°C. Cependant la souche utilisée est différente puisqu'il s'agit de la souche BY4742 qui ne présente pas de phénotype de retard de croissance dans nos conditions.

V.3.3. La composition des chaînes d'acide gras de la CL

Dans notre modèle levure, parmi les CL restantes, la composition en chaînes acyles est altérée : les chaînes insaturées, notamment l'acide oléique (C18:1), diminuent au profit des chaînes saturées. Ceci est cohérent avec l'implication de la tafazzine dans le maintien des chaînes acyles insaturées. Ce résultat est similaire à celui trouvé dans d'autres études utilisant la levure (Testet *et al.*, 2005 # Gu *et al.*, 2004) (Fig.1B de l'article I, p103 et Tableau 6). Même si les chaînes d'acyles sont différentes d'un modèle à l'autre, cette diminution de chaînes acyles insaturées au profit de chaînes acyles saturées semble être une caractéristique constante. En effet, dans les fibroblastes de patients, ce sont principalement les acides linoléiques (C18:2) qui sont affectés, même si les acides oléiques sont, eux aussi, diminués (Vreken *et al.*, 2000). De plus, même si ce n'est pas statistique, il est intéressant de noter que dans notre étude et celle de Testet *et al.*, la quantité de PC insaturée (C18:1) semble légèrement augmentée. Ce résultat pourrait indiquer que la PC est un donneur privilégié de chaînes d'acyles pour les CL.

V.4. Morphologie mitochondriale

L'observation de cellules de patients du BTHS en microscopie électronique à transmission a montré la présence de mitochondries morphologiquement anormales (Barth *et al.*, 1983). Ceci a été montré aussi dans les modèles murins (Acehan *et al.*, 2011), drosophile (Xu *et al.*, 2006) ou encore levure (Claypool *et al.*, 2008). Ces défauts affectent notamment les crêtes mitochondriales qui sont irrégulières, empilées les unes sur les autres, et circularisées (Fig. 35 A et B).

Dans notre étude, aucun défaut morphologique n'a pu être mis en évidence (Fig. 35 C et D). Cependant, étant donné le faible nombre de crêtes observées dans la souche mutante

$\Delta taz1+p\emptyset$, y compris dans le sauvage WT+p \emptyset , nous avons pu passer à côté d'un défaut s'il était très léger. Nous pouvons nous demander pourquoi, pour la même mutation, des défauts ont été observés dans le modèle levure de Claypool *et al.* (Claypool *et al.*, 2008), et pas dans le nôtre. Deux hypothèses pourraient expliquer ces différences. Premièrement, on peut penser que ces variations peuvent être « fond génétique » dépendantes. En effet, Claypool *et al.* ont utilisé des levures avec le fond génétique GA74-1A alors que nous avons utilisé des levures avec le fond génétique W303. La deuxième hypothèse est que les variations morphologiques de mitochondries entre les différentes études sont dues aux différences de conditions de culture. En effet, l'étude de S. Claypool *et al.* a été faite en milieu riche (YP+lactate) à 30°C. Dans notre cas, les cellules ont été cultivées en milieu synthétique CSM supplémenté avec 0,5% de galactose et 2% d'éthanol, et la culture est réalisée à 36°C. On peut penser que le faible nombre de crêtes observées dans notre étude soit dû aux conditions de culture différentes. Notre modèle ne semble donc pas être adapté pour l'observation de défauts morphologiques mitochondriaux. Cependant, il serait intéressant de refaire notre analyse de MET en utilisant en parallèles des cultures en milieu riche et en milieu minimum synthétique pour vérifier cette hypothèse.

L'absence de défaut au niveau des crêtes mitochondriales pourrait aussi s'expliquer par le fait que nous n'avons pas de défaut sur l'ATP synthase dans notre souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$. En effet, l'ATP synthase est connue pour être impliquée dans la formation et le maintien des crêtes (Paumard *et al.*, 2002). D'ailleurs, Acehan *et al.* ont mis en évidence, chez la drosophile *tazKD* que les défauts des crêtes mitochondriales sont corrélés à une diminution des dimères d'ATP synthase (Acehan *et al.*, 2011). Gonzalez *et al.*, quant à eux, ont aussi observé des morphologies mitochondriales anormales associées à une forte diminution de la quantité totale de complexes V dans des lymphoblastes immortalisés de patients (Gonzalez *et al.*, 2013).

V.5. Abondance mitochondriale

D'autres études ont mis en évidence, en plus des défauts morphologiques, une augmentation des mitochondries dans certains modèles du BTHS.

L'hyperprolifération mitochondriale est un signe retrouvé dans différentes maladies telles que le syndrome MELAS (Kaufmann *et al.*, 1996) ou le syndrome MERRF, syndrome

pour lequel l'aspect rouge et déchiqueté des fibres musculaires est dû à une accumulation anormale de mitochondries. Cette hyperprolifération semble assez logique. En effet, il est assez facile d'imaginer que pour contrebalancer un déficit « d'activité mitochondriale », la cellule augmente sa masse mitochondriale. Ainsi, à partir des années 1960, la prolifération excessive des mitochondries était utilisée comme marqueur de myopathies mitochondriales pour le diagnostic de patients présentant des faiblesses musculaires et des intolérances à l'exercice. Il est généralement considéré que cette augmentation quantitative de mitochondries permet de contrebalancer la diminution qualitative de ces dernières.

Une telle augmentation a été rapportée chez des patients du BTHS (Barth *et al.*, 1983) et pour plusieurs autres modèles. Acehan *et al.*, par exemple, ont montré, dans un modèle de souris TAZ *knockdown*, une augmentation d'un facteur quatre du ratio ADN mitochondrial/ADN nucléaire par rapport aux cellules contrôles. Il est intéressant de noter que, dans les muscles, cette augmentation n'est que d'un facteur 1,5 et qu'aucune augmentation n'est observée dans le cerveau ou le foie. Il y a donc un effet tissu spécifique avec une atteinte principale du cœur, organe majoritairement touché chez les patients du BTHS. Les auteurs expliquent cet effet par le besoin énergétique élevé du cœur et des muscles (Acehan *et al.*, 2011).

L'accumulation de mitochondries dans des lymphoblastes immortalisés de patients a aussi été démontrée dès 2005 par Xu *et al.*, qui avaient remarqué une augmentation du marquage des mitochondries par le MitoTracker. Ils ont ensuite montré une augmentation non seulement du nombre de mitochondries mais aussi de la surface des membranes internes des mitochondries de la souche mutante par rapport à la souche contrôle. Ayant aussi remarqué une diminution du potentiel de membrane sur mitochondries isolées qui ne se répercutait pas sur la production d'ATP à l'échelle cellulaire, ils en ont déduit que cette compensation était due à l'augmentation de la masse mitochondriale (Xu *et al.*, 2005). Cet effet sur les lymphoblastes immortalisés de patients a été confirmé en 2013 par Gonzalez *et al.* (Gonzalez *et al.*, 2013). En effet, comme dans l'étude de Xu *et al.*, dans l'étude de Gonzalez *et al.*, non seulement le nombre de mitochondries par section est doublé mais la surface qu'elles occupent est aussi quasiment doublée dans les lymphoblastes de patients par rapport aux lymphoblastes contrôles.

Nous avons donc nous aussi compté le nombre de mitochondries par section dans notre modèle *Δtaz1*. Les résultats montraient des tendances, mais aucune qui ne soit significative.

En effet, les levures présentaient un faible nombre de mitochondries par section. À cause de ce faible nombre de mitochondries, la moindre variation entraîne de forts écarts types. Pour essayer de compenser cette faiblesse, nous avons réalisé les comptages sur un assez grand nombre de cellules (75 cellules pour la souche WT+pØ et 100 pour la souche mutante $\Delta taz1+pØ$). Bien que ces résultats ne soient pas significatifs, les tendances observées sont cohérentes avec la littérature scientifique. De plus, la surexpression du gène *TAZ1* permet de réduire cette augmentation pour retrouver une valeur proche de celle du sauvage WT+pØ suggérant que cette augmentation observée pour le mutant $\Delta taz1+pØ$ reflète un effet physiologique. L'effet étant faible, on peut penser que la technique choisie, la microscopie électronique à transmission, n'était pas optimale. En effet, avec le modèle murin du BTHS, Acehan *et al.* n'ont pas pu mettre en évidence une hyperprolifération des mitochondries en microscopie électronique à transmission alors qu'ils ont observé, par PCR quantitative, une forte augmentation de la quantité d'ADN mitochondrial. Cette approche est donc beaucoup plus sensible et pourrait être envisagée pour notre étude.

Comme décrit dans les résultats, la biogénèse mitochondriale dans la souche mutante $\Delta taz1+pØ$ semble être fortement augmentée (Fig. 36) alors que le nombre de mitochondries n'est que très légèrement augmenté (Fig. 35E). Ces différences pourraient s'expliquer, par exemple, par une augmentation de la mitophagie. Nos résultats ne nous ont pas permis de conclure sur ce point. Cependant, la littérature semble indiquer une altération de la mitophagie dans les cellules défectueuses en tafazine (III.4.2.5.- Cardiolipines et mitophagie).

Dans le cas où la mitophagie serait effectivement bloquée, une autre hypothèse pourrait être avancée. La mesure de l'activité β -galactosidase montre que la protéine de fusion est efficacement synthétisée et nous indique l'activation transcriptionnelle de la biogénèse mitochondriale. On peut donc penser que c'est aussi le cas pour les autres protéines codées par le génome nucléaire nécessaires à la mitochondrie. Malgré l'augmentation de la synthèse des protéines mitochondriales codées par l'ADNn, il ne semble pas qu'il y ait, *in fine*, une augmentation forte de la masse mitochondriale. On peut donc penser que le processus d'import soit ralenti voire défectueux (III.4.2.5.- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales). Ainsi, les protéines impliquées dans la biogénèse mitochondriale sont bien synthétisées mais n'arrivent pas à la mitochondrie. Ces résultats tendraient à montrer un problème d'homéostasie des protéines dans les cellules déficientes en tafazine.

V.6. Sauvetage du mutant $\Delta taz1$ par la surexpression du gène *ODC1* et par l'oléate

Comme les résultats le montrent, la surexpression du gène *ODC1* (Fig. 2A de l'article I, p104) dans la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ permet la restauration de la croissance en milieu respiratoire à 36°C, la restauration de l'assemblage des super-complexes III₂-IV₂ et III₂-IV₁ de la chaîne respiratoire, corrélée à une meilleure respiration ainsi qu'une meilleure synthèse d'ATP (Fig. 3 et 5 de l'article I, p104 et 107). *ODC1* est un gène bien conservé dans l'évolution puisque l'on retrouve des orthologues de ce gène chez la levure, la drosophile, le nématode, le rat, mais aussi chez l'Homme (Fiermonte *et al.*, 2001).

Connaissant le rôle de ce transporteur *ODC1* (Article I : II.3.1. Choix du gène *ODC1*), comment la surexpression de cette protéine peut-elle restaurer la croissance du mutant $\Delta taz1$? Avant de répondre à cette question, il est important de rappeler que la surexpression de cette protéine peut aussi sauver deux autres souches mutantes : $\Delta fmc1$ (Schwimmer *et al.*, 2005) et $\Delta sym1$ (Dallabona *et al.*, 2010). Basé sur les connaissances de ces deux mutants et nos résultats, notre hypothèse, pour expliquer le sauvetage de ces trois mutants ($\Delta taz1$, $\Delta fmc1$ et $\Delta sym1$) est que la surexpression du gène *ODC1* permettrait non seulement la stimulation du cycle de Krebs, en favorisant l'entrée d'intermédiaires de ce cycle (Palmieri *et al.*, 2001) mais aussi l'activation de la voie rétrograde.

V.6.1. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant $\Delta fmc1$ par la surexpression de gène *ODC1*

La surexpression du gène *ODC1* est déjà connue pour restaurer la croissance respiratoire à 36°C de la souche mutante $\Delta fmc1$ chez *Saccharomyces cerevisiae* (Schwimmer *et al.*, 2005). Le gène nucléaire *FMC1* code pour une protéine impliquée dans l'assemblage et la stabilité de la sous-unité F₁ de l'ATP synthase, notamment en conditions de stress (Température, forte concentration d'éthanol...). Par conséquent, les phénotypes respiratoires des deux souches mutantes $\Delta fmc1$ et $\Delta taz1$ sont assez similaires, présentant, comme dit précédemment, un fort défaut de croissance en milieu respiratoire à la

température élevée de 36°C. Concernant le mutant $\Delta fmc1$, ce défaut de croissance est provoqué par une chute drastique de la quantité en ATP synthase qui entraîne une diminution de la synthèse d'ATP par oxydations phosphorylantes. De plus, la diminution du complexe en ATP synthase provoque une diminution de l'expression des autres complexes de la chaîne respiratoire (Epstein *et al.*, 2001 # Tzagoloff *et al.*, 1975). Cette influence de l'ATP synthase pourrait donc expliquer la diminution du contenu en cytochromes observée par Schwimmer *et al.* (Schwimmer *et al.*, 2005). La diminution de la chaîne respiratoire ralentit la ré-oxydation du NADH et du FADH₂, qui concourt probablement à ralentir le cycle de Krebs et donc la production d'ATP par cette voie. La quantité d'ATP alors produite est très faible et l'ensemble des processus mitochondriaux (Systèmes de contrôle qualité, systèmes d'import...) voire cellulaires ayant besoin d'ATP peuvent se retrouver ralentis. Ces impacts vont amplifier le défaut mitochondrial et plonger la cellule dans une sorte de spirale négative qui ne permet plus à la cellule de survivre sur un milieu respiratoire. Par exemple, un moins bon import ATP dépendant des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire va entraîner un moins bon assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Si cette dernière fonctionne moins bien, alors le potentiel de membrane ne sera pas propice à l'import des protéines...et ainsi de suite. La surexpression du gène *ODC1* dans la souche $\Delta fmc1$ permet de remonter significativement l'activité de la chaîne respiratoire et la production d'ATP. Schwimmer *et al.* proposent que cette restauration soit due à l'augmentation de l'entrée de substrats du cycle de Krebs via le transporteur Odc1p. Le sauvetage du mutant $\Delta fmc1$ serait donc dû à la stimulation de ce cycle. En effet, le cycle de Krebs stimulé va produire un peu plus d'ATP par phosphorylation du substrat. Cette légère augmentation d'ATP serait donc suffisante pour permettre un meilleur fonctionnement des processus mitochondriaux évoqués précédemment (Systèmes de contrôle qualité, import ...). On aurait donc, cette fois-ci, plutôt une spirale positive. De plus, il est important de rappeler que si l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire est fortement diminué, il n'est cependant pas nul. Par conséquent, si les protéines impliquées dans la chaîne respiratoire sont bien importées, alors, de l'ATP peut être à nouveau synthétisé par les OXPHOS, même si c'est en petite quantité. En effet, cette production d'ATP reste minoritaire par rapport à la production d'ATP par phosphorylation du substrat très majoritaire. En effet, il suffit de comparer la synthèse d'ATP entre les souches WT et $\Delta fmc1+ODC1$, pour remarquer que dans la souche sauvage WT, 66% de l'ATP est synthétisé par l'ATP synthase

alors que dans la souche $\Delta fmc1+ODC1$ seulement 23% de l'ATP provient de ce complexe V. Ce constat va dans l'idée que la production d'ATP par phosphorylation du substrat au niveau du cycle de Krebs permet de maintenir les processus mitochondriaux nécessaires à la survie de la cellule mutante $\Delta fmc1+ODC1$ dans des conditions respiratoires à 36°C. Deux critères sont nécessaires pour que cette production d'ATP par le cycle de Krebs continue. Tout d'abord, il faut que le substrat ne soit pas limitant. Il faut donc que le transporteur Odc1p soit largement surexprimé pour pouvoir fournir suffisamment de substrat, notamment de l' α -cétoglutarate. Ainsi l'expression du gène *ODC1* à partir d'un plasmide centromérique, présent donc en une seule copie dans la cellule, ne permet pas la restauration de la croissance du mutant. Deuxièmement, il faut que le NADH et le FADH₂ produits par le cycle de Krebs soient ré-oxydés au fur et à mesure. La restauration de la chaîne respiratoire, mise en évidence par l'augmentation de l'abondance du contenu en cytochromes dans les souches surexprimant le gène *ODC1*, est donc essentielle au sauvetage. Le sauvetage du mutant $\Delta fmc1$ par la surexpression du gène *ODC1* ne passe donc pas par une correction du défaut primaire, à savoir l'assemblage de l'ATP synthase, mais par une modification du métabolisme.

Dans notre cas, la mutation $\Delta taz1$ a des conséquences sur les OXPHOS différentes de la mutation $\Delta fmc1$ qui semblent bien moins drastiques. En effet, alors que le mutant $\Delta fmc1$ a un problème au niveau de l'assemblage de l'ATP synthase, le mutant $\Delta taz1$ a des problèmes, même s'ils sont secondaires, au niveau de l'assemblage des super-complexes III₂-IV₂ et III₂-IV ainsi qu'au niveau du cytochrome c. Ces défauts aboutissent à une diminution de la consommation d'oxygène sur mitochondries isolées de seulement 50% dans le mutant $\Delta taz1$ alors qu'il y a une perte de 90% dans le mutant $\Delta fmc1$. Ces différences indiquent un système OXPHOS encore partiellement fonctionnel dans notre souche mutante $\Delta taz1$. En effet, dans la souche mutante $\Delta taz1$, la chaîne respiratoire, qui semble fonctionner à seulement 50%, ne peut créer un gradient de protons optimal pour une production suffisante d'ATP pour les différents processus mitochondriaux. De plus, cette déficience de la chaîne respiratoire peut diminuer le potentiel de membrane qui est un paramètre moteur de l'import de certaines protéines. Par conséquent, ce déficit en ATP et la diminution de potentiel de membrane pourraient, par exemple, impacter l'import de protéines. Dans ces conditions, nous sommes, tout comme pour le mutant $\Delta fmc1$ dans une spirale négative qui ne permet pas à la cellule

mutante de bien croître. Tout comme pour le mutant $\Delta fmc1$, la surexpression du gène *ODC1* permettrait l'augmentation de l'entrée des intermédiaires du cycle de Krebs. Cet afflux de substrats pour le cycle de Krebs permet la production d'ATP par phosphorylation du substrat. Le regain d'ATP permet aux différents processus mitochondriaux de se relancer, ce qui permet une meilleure respiration et non seulement un gradient de protons plus propice à une augmentation de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase puisque cette dernière n'est pas affectée dans le mutant $\Delta taz1$. De plus, la chaîne respiratoire récrée un potentiel de membrane plus adéquat pour un meilleur import des protéines dans la mitochondrie. Le système est relancé...

V.6.2. Ce que l'on peut déduire du sauvetage du mutant $\Delta sym1$ par la surexpression du gène *ODC1*

La protéine Sym1p, l'orthologue chez la levure de la protéine humaine MPV17, qui est impliquée dans la neurohépatopathie de type Navajo, est une protéine mitochondriale dont la fonction exacte reste inconnue. De façon assez similaire à la mutation $\Delta taz1$, l'absence de cette protéine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* entraîne des défauts de croissance respiratoire, notamment en présence d'éthanol à température élevée 36°C (Trott & Morano, 2004 # Dallabona *et al.*, 2010). Des résultats au laboratoire (non publiés) semblent montrer que l'assemblage des complexes III et IV est diminué alors que l'assemblage de l'ATP synthase n'est pas affecté. Il est aussi intéressant de noter que, comme pour le mutant $\Delta taz1$, la consommation d'oxygène mesurée sur mitochondries isolées est diminuée de seulement 50%. Ce résultat indique donc un système des OXPHOS qui fonctionne partiellement. Cette situation est très similaire à la souche mutante $\Delta taz1$. On peut penser que les conséquences de ces défauts sont relativement proches et que la surexpression du transporteur Odc1p permet donc une augmentation de l'entrée d'intermédiaires du cycle de Krebs qui vont alimenter et « booster » ce dernier. Ainsi, la quantité d'équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) est, elle aussi, augmentée. Ces équivalents réducteurs vont alimenter et stimuler la chaîne respiratoire créant ainsi une meilleure différence de potentiel et un gradient de protons respectivement propices à un

import correct des protéines mitochondriales et une synthèse d'ATP par l'ATP synthase qui soit suffisante pour les différents processus mitochondriaux mais aussi cellulaires.

V.6.2.1. La voie rétrograde serait-elle impliquée ?

Grâce à une analyse *in silico* du gène *SYM1*, Dallabona *et al.* ont mis en évidence la présence d'une séquence de fixation du facteur de transcription Rtg1-Rtg3. Ces deux protéines, qui fonctionnent en hétérodimères, font partie de la voie rétrograde (Liu & Butow, 1999). Cette voie, induite notamment en cas de dysfonction mitochondriale, permet l'adaptation du métabolisme pour faire face à ces défauts en relocalisant le dimère Rtg1-Rtg3 au noyau. Une fois au noyau, le facteur de transcription active l'expression d'un certain nombre de gènes permettant, *in fine*, d'accroître la synthèse d' α -cétoglutarate, précurseur du glutamate, qui est lui-même le précurseur d'autres acides aminés (glutamine, arginine et proline), qui sont donc essentiels pour la survie cellulaire (I.4.1.1. Le cycle de Krebs) (Fig. 4). En retour, le glutamate pourrait agir comme senseur du fonctionnement mitochondrial, d'autant qu'il exerce un rétrocontrôle négatif sur l'induction des gènes activés par la voie rétrograde (Butow & Avadhani, 2004). Il est intéressant de noter que dans des souches ρ^0 , la protéine Sym1p est surexprimée. Cette surexpression est perdue si la souche est $\Delta rtg1$ ou $\Delta rtg3$. Ceci, associé à la présence d'un site de fixation à Rtg1-Rtg3 au niveau du promoteur du gène *SYM1*, est une indication forte pour penser qu'il y a un lien entre ce gène et la voie rétrograde. Etant donné que la surexpression du transporteur Odc1p, qui peut transporter l' α -cétoglutarate, restaure la croissance respiratoire de la souche mutante $\Delta sym1$, on peut se demander s'il n'existe pas un lien entre ce sauvetage et la voie rétrograde.

V.6.2.2. Lien entre le transporteur Odc1p et la voie rétrograde

Une interaction entre l'oléate, le transporteur Odc1p et la voie rétrograde a déjà été rapportée en 2005 par Trotter *et al.* (Trotter *et al.*, 2005). En cas de dysfonctionnement mitochondrial, et notamment de diminution de la respiration cellulaire, le facteur de transcription Rtg1/3p induit par la voie rétrograde, est relocalisé au noyau où il induit l'expression des gènes *CIT1* (citrate synthase mitochondriale), *ACO1* (aconitase), et *IDH1* et 2

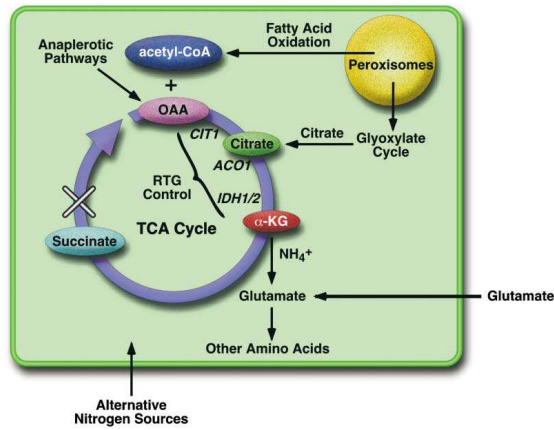


Figure 39 : Induction rétrograde de voies métaboliques dans des cellules déficientes pour la respiration. La voie rétrograde permet à des cellules déficientes pour la respiration de maintenir un apport en glutamate en stimulant différentes réaction anaplerotiques du peroxyosome ou de la mitochondrie. Cette adaptation métabolique favorise ainsi la biogénèse d'α-cétoglutarate, un précurseur du glutamate. La voie rétrograde met aussi en place des mécanismes de transport pour accroître l'entrée de glutamate et de sources d'azotes exogènes. (d'après Butow & Avadhani, 2004).

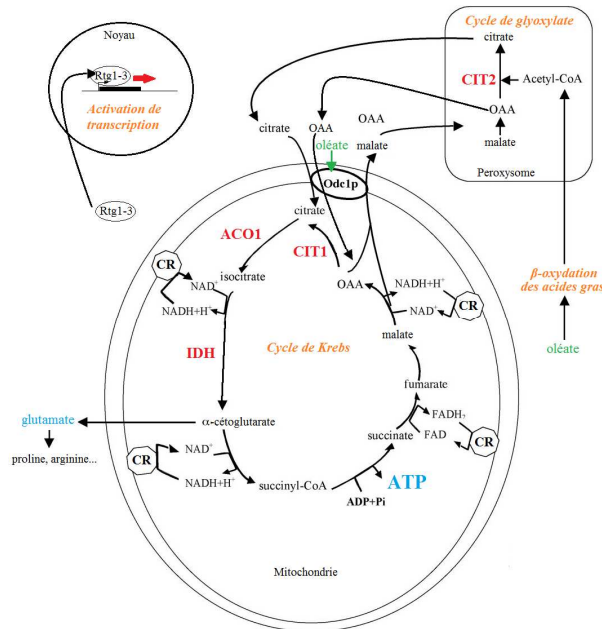


Figure 40 : Schema du *bypass* métabolique possiblement mis en place par la levure *Δtaz1* en cas de surexpression du gène *ODC1*. En cas de mutation du gène *TAZ1*, le chaîne respiratoire est déstabilisée ce qui, par voie de conséquence ralentit le cycle de Krebs. Ce ralentissement du cycle de Krebs induit une réduction de la production d'α-cétoglutarate et donc de glutamate qui en découle. La diminution du niveau en glutamate est perçue par la voie rétrograde, ce qui se traduit par une relocalisation au noyau des facteurs de transcription Rtg1 et 3p. La transcriptions des gènes des citrates synthases 1 et 2 (*CIT1* et 2), de l'aconitase (*ACO1*) et des Isocitrates déshydrogénases 1 et 2 (*IDH*) et la quantité des enzymes correspondantes (en rouge) est donc augmentée. Ceci entraîne une stimulation du cycle de Krebs dans la mitochondrie et du cycle du glyoxylate dans le peroxyosome, ce qui permet une augmentation de la production d'ATP par phosphorylation du substrat (en bleu). La surexpression du transporteur *Odc1p* génétiquement ou par l'oléate va rendre ce processus encore plus efficace, puisqu'il peut transporter différents intermédiaires des cycles de Krebs et du glyoxylate. Il pourra notamment importer le citrate ou l'oxaloacétate (OAA) produits par le cycle du glyoxylate, qui serviront de substrat pour le cycle de Krebs afin de générer davantage d'ATP par phosphorylation du substrat. Par ailleurs, le cycle de Krebs régénère du NADH et du FADH₂ qui pourront servir de substrat pour les chaînes respiratoires (CR) qui ne sont pas totalement déstabilisées dans le mutant *Δtaz1* et qui à leur tour régénéreront du NAD⁺ et du FAD pour le cycle de Krebs. (adapté de Schwimmer *et al.*, 2005)

(isocitrates déshydrogénases) (Liu & Butow, 1999) (Fig. 39). En parallèle, l'hétérodimère Rtg1/3p induit une augmentation de la biogénèse des peroxysomes et augmente aussi fortement l'expression de l'enzyme Cit2p, une isoforme peroxysomale de la protéine Cit1p. Cette augmentation des peroxysomes favorise aussi une augmentation de la β -oxydation des acides gras, notamment de l'oléate, pour générer de l'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA va être combiné avec l'oxaloacétate, *via* l'enzyme Cit2p, et entrer dans le cycle du glyoxylate. Le transporteur Odc1p pourrait faire alors le lien entre le peroxysome et la mitochondrie (Fig. 40). En effet, il va permettre l'entrée de métabolites générés par le peroxysome dans la matrice mitochondriale, tel que le citrate, issu du cycle du glyoxylate. Le citrate sert de substrat pour les enzymes Cit1p, Aco1p et Idh1/2p dont l'abondance est augmentée par la réponse rétrograde. Ces changements vont aboutir à une augmentation de synthèse d' α -cétoglutarate et donc de glutamate. L'hypothèse d'une implication du transporteur Odc1p dans cette réponse est renforcée par les constatations suivantes : (i) la surexpression du gène *ODC1* permet le sauvetage d'un mutant incapable de croître dans un milieu contenant de l'oléate comme substrat, (ii) inversement, le mutant $\Delta odc1$ est incapable de croître en milieu oléate, (iii) enfin, le gène *ODC1* possède deux ORE (*Oleate Response Element*), qui sont des séquences caractéristiques des gènes induits par l'oléate. Effectivement, Tibetts *et al.* ont montré que la transcription du gène *ODC1* est fortement induite en présence d'oléate, conduisant à une augmentation de l'abondance de la protéine Odc1p (Tibetts *et al.*, 2002).

Il est important de remarquer que, tout comme le mutant $\Delta sym1$, notre souche mutante $\Delta taz1$ est sauvée par la surexpression du gène *ODC1*. Étant donné ces fortes similitudes entre les deux souches mutantes, nous avons voulu voir dans quelle mesure la réponse rétrograde pouvait être impliquée dans le sauvetage du mutant $\Delta taz1$ par la surexpression du gène *ODC1*. Pour cela, nous avons délété le gène *RTG1* dans la souche $\Delta taz1$. Ce double mutant $\Delta taz1/\Delta rtg1$ est « synthétique létal » en milieu respiratoire. Cette létalité semble due à une déstabilisation du génome mitochondrial qui n'est pas présente dans la souche simple mutante $\Delta taz1$ en milieu respiratoire comme semblent l'indiquer nos résultats (IV.6. Implication de la voie rétrograde et Fig.38). Cette létalité synthétique permet donc de confirmer l'importance de la voie rétrograde mise en place dans le mutant $\Delta taz1$. A cause de cette létalité synthétique, nous ne pouvons malheureusement pas vérifier si l'effet

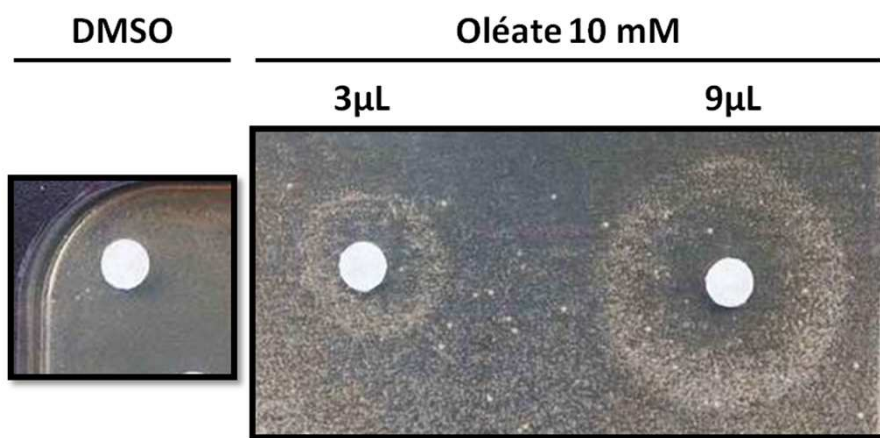


Figure 41 : Restauration de la croissance respiratoire du mutant $\Delta sym1$ par l'oléate.

Des levures $\Delta sym1$, cultivées en milieu glucose, sont étalées sur un milieu solide riche complétement en éthanol. Des disques de papier stériles sont ensuite déposés sur le milieu, et l'oléate dissout en DMSO est déposé sur ces disques. Les boîtes sont photographiées après 5 jours d'incubation à 36°C. Le DMSO seul sert de contrôle négatif.

de la surexpression du gène *ODC1* passe par la réponse rétrograde. Pour contourner ce biais, nous envisageons donc une étude sans à priori telle que la protéomique. Une telle étude pourrait, nous l'espérons, mettre en évidence la surexpression de certaines enzymes clés de la voie rétrograde, telles que les enzymes Cit1p et Cit2p, Aco1p, ou Idh1p et Idh2p.

La stimulation simultanée de la voie rétrograde et la surexpression du gène *ODC1* dans le mutant $\Delta taz1$ pourraient expliquer la restauration de la croissance respiratoire et la production d'ATP par oxydations phosphorylantes dans un milieu respiratoire à 36°C.

V.6.2.3. Sauvetage par l'oléate

Tibetts *et al.* ont montré que l'oléate induit l'expression du gène *ODC1* (Tibetts *et al.*, 2002). Afin de confirmer pharmacologiquement l'effet de sauvetage génétique du mutant $\Delta taz1$ par le gène *ODC1*, nous avons donc testé l'effet de l'oléate. Comme attendu, l'oléate restaure la croissance du mutant $\Delta taz1$ sur milieu respiratoire à 36°C (Fig. 7 de l'article I, p108). Les mutants $\Delta fmc1$ et $\Delta sym1$, qui sont sauvés par la surexpression du gène *ODC1* sont, eux aussi, sauvés par l'oléate (Fig. 41) (Couplan *et al.*, 2011). Dans la perspective d'un potentiel traitement, la capacité d'induire l'expression du gène *ODC1* par l'oléate est intéressante puisque pour le moment la thérapie génique est très difficile à mettre en place, alors que le développement de molécules médicamenteuses a déjà fait ses preuves. D'ailleurs, l'oléate est bénéfique pour des cybrides du syndrome NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire), dont les symptômes sont similaires à ceux causés par la mutation $\Delta fmc1$ (Couplan *et al.*, 2011).

La croissance des levures dans un milieu contenant des acides gras nécessitant la mise en place de la voie rétrograde et l'expression du gène *ODC1* (Trotter *et al.*, 2005), nous pensons que le sauvetage des mutants $\Delta taz1$ et $\Delta fmc1$ par l'oléate passe par l'induction de ces deux processus. Mais, Chen *et al.*, qui ont déjà rapporté le sauvetage d'un modèle *Saccharomyces cerevisiae* du BTHS par l'oléate (C18:1), proposent un mécanisme de sauvetage différent (Chen *et al.*, 2008). En effet, ils ont observé que tous les phospholipides mitochondriaux issus de cellules cultivées en milieu enrichi en oléate présentent un léger

décalage de migration en chromatographie sur couche mince. Ils en ont déduit que les phospholipides sont enrichis en C18:1. Concernant la CL, ceci est intrigant puisque les cellules *Δtaz1* sont totalement dépourvues de tafazzine qui est, à ce jour, la seule transacylase mitochondriale connue chez la levure. Comment se fait l'enrichissement en C18:1 dans ces conditions ? Si ce décalage est dû à un remodelage des phospholipides, les CL de la souche *Δtaz1*, privées de leur système de remodelage, devraient ne pas montrer ce décalage. On peut toutefois imaginer que l'excès d'oléate va favoriser son intégration au cours de la synthèse des phospholipides, ce qui expliquerait que l'ensemble des phospholipides dont la CL soit affecté par ce décalage de migration. Par ailleurs, si les CL sont effectivement enrichies en chaînes insaturées C18:1, elles sont similaires aux CL matures et devraient pouvoir interagir normalement avec les différentes protéines de la membrane mitochondriale interne (complexe III, transporteur Aac2p...). Cette liaison aux protéines est connue pour justement stabiliser les CL (Xu *et al.*, 2016). Dans ce cas, pourquoi le niveau de CL ne remonte-t-il pas et, pourquoi le niveau de MLCL ne diminue-t-il pas ? Cette hypothèse d'un enrichissement en C18:1 est donc plausible, mais mériterait d'être étayée par une quantification des chaînes acyles.

Conceptuellement, l'hypothèse d'un enrichissement des CL en un acide gras présent dans le milieu de culture est plus facile à envisager chez les mammifères qui possèdent plusieurs autres acyltransférases différentes de la tafazzine (ALCAT, MLCLAT et α TFP), contrairement à la levure qui ne semble en posséder qu'une seule à ce jour (III.4.2.3. Remodelage des CL). Valianpour *et al.* ont montré que dans des fibroblastes de patients du BTHS, l'ajout d'acide linoléique (C18:2), qui est l'acide gras majoritaire des cellules de mammifères, restaure la croissance cellulaire des fibroblastes qui était diminuée par la mutation du gène *TAZ*. Ceci est corrélé à une augmentation de la quantité de CL enrichies en C18:2 proche de la CL sauvage. Il est intéressant de noter que cet enrichissement n'est pas spécifique des CL. Il est, en effet, retrouvé au niveau des autres phospholipides, tout comme cela était suggéré par le changement de migration de l'ensemble des phospholipides induit par l'oléate dans l'étude de Chen *et al.* Mais contrairement à la levure, les cellules de mammifères possèdent d'autres transacylases pour les MLCL. On peut donc proposer que cet enrichissement passe par un remodelage global des phospholipides selon le cycle de Lands (i.e. une déacylation par une phospholipase suivie d'une réacylation par une

transacylase, Shindou & Shimizu, 2009). Dans ce cas, on peut supposer que l'enrichissement des CL est médié par une transacylase autre que la tafazine mutée, notamment par la protéine MLCLAT. Cette hypothèse est aussi corroborée par le fait que, dans un modèle de rat déficient au niveau cardiaque, une diminution de la protéine TAZ est observée alors que l'enzyme MLCLAT augmente (Claypool & Koehler, 2012), et que cette enzyme MLCLAT a une affinité particulière pour l'acide linoléique (Taylor & Hatch, 2009).

IV.7. Conclusions

La surexpression du gène *ODC1* est donc capable de restaurer la croissance respiratoire de mutants très variés tels que les mutants $\Delta fmc1$, $\Delta sym1$ et $\Delta taz1$. En effet, le défaut primaire des souches mutantes $\Delta fmc1$ est une diminution drastique de l'assemblage de l'ATP synthase alors que celui de la souche $\Delta taz1$ se situe au niveau des CL. Le défaut primaire consécutif à l'absence de la protéine Sym1p n'est pas identifié car la fonction de cette protéine mitochondriale n'est pas connue. Bien que ces défauts primaires soient différents, le résultat aboutit à une diminution de la respiration mitochondriale plus ou moins forte. La surexpression du gène *ODC1* étant capable de sauver ces différents mutants, il est probable que les mécanismes d'action mis en place par la surexpression du gène *ODC1* soient assez généraux sans pour autant restaurer spécifiquement le défaut primaire induit par la mutation. C'est ce que l'on appelle un « *by pass* » métabolique. Comme discuté précédemment, il semble donc que la surexpression du gène *ODC1* passe par plusieurs éléments.

Le premier fait, est que cette surexpression permet la synthèse d'ATP par phosphorylation du substrat au niveau du cycle de Krebs. Cet afflux supplémentaire d'ATP permet de relancer l'ensemble des processus mitochondriaux tel l'import qui permettent à la chaîne respiratoire de mieux fonctionner créant ainsi un potentiel de membrane mitochondrial et un gradient de protons adéquat pour un import des protéines mitochondriales plus performant et une synthèse d'ATP meilleure. Dans ces mutants, la surexpression du gène *ODC1* permet donc de restaurer complètement le fonctionnement des OXPHOS.

Un autre élément, qui participe au sauvetage de ces mutants, est la réponse rétrograde. En effet, il est bien connu que des défauts mitochondriaux, point commun à ces trois mutants, induisent la réponse rétrograde. Cette réponse rétrograde, via les facteurs de transcription Rtg1p et Rtg3p, induit l'expression d'enzymes impliquées dans les cycles de Krebs et du glyoxylate. Ces processus générant différents substrats transportables par la protéine mitochondriale Odc1p, il est fort probable que l'effet bénéfique de la surexpression du gène *ODC1* passe par l'induction de la voie rétrograde. Afin de vérifier cette hypothèse, nous envisageons un dosage de l'activité de différentes enzymes du cycle de Krebs ainsi qu'une analyse cellulaire sans à priori telle que la protéomique sur les souches mutantes $\Delta taz1$, $\Delta taz1+pODC1$ et sauvage WT+p ϕ . Nous espérons que cette stratégie permettra de mettre en évidence la surexpression de certaines enzymes clés de la voie rétrograde.

Par ailleurs, l'oléate, qui est connu pour induire la surexpression du gène *ODC1*, est capable de sauver ces trois mutants ($\Delta fmc1$, $\Delta sym1$, $\Delta taz1$). Ce résultat conforte l'idée d'un mode d'action général. Mais dans le cas du mutant $\Delta taz1$, l'oléate étant l'un des éléments principaux des CL, nous ne pouvons pas exclure, en parallèle, un mode de sauvetage plus spécifique par une restauration de la composition des CL en chaînes C18:1. Dans ce mutant, l'oléate aurait donc un double impact.

Il a été montré que l'oléate restaure la croissance de cybrides modélisant le syndrome NARP, dont certains symptômes sont reproduits par le mutant $\Delta fmc1$. Si, comme nous le pensons, l'effet de l'oléate passe bien par la surexpression du gène *ODC1*, nous pouvons espérer que l'oléate puisse aussi être efficace sur des modèles supérieurs puis, *in fine*, chez les patients du BTHS.

Article II

Une légère diminution de la synthèse protéique cytosolique restaure les oxydations phosphorylantes de levures déficientes en Tafazzine

“Tout est poison, rien n’est poison : c’est la dose qui fait le poison.”

Paracelse (1493-1541)

Sommaire

I. Introduction	138
II. Article II : <i>Decreasing cytosolic translation is beneficial to yeast and human Tafazzin-deficient cells</i>	140
III. Résultats complémentaires.....	162
III.1. Comptage des mitochondries par microscopie électronique à transmission	162
III.2. Suivi de la biogénèse mitochondriale	162
III.3. Respiration sur cellules entières	163
III.3.1. Restauration de la respiration par les doubles délétions $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$	163
III.3.2. Restauration de la respiration par la cycloheximide	164
III.4. Suivi de la synthèse protéique cytosolique et mitochondriale par pulse	164
IV. Discussion	165
IV.1. Qu’est-ce que le stress protéostatique ?	166
IV.1.1. La réponse UPR _{mt}	167
IV.1.2. Les réponses à un stress protéostatique chez la levure	167
- IV.1.2.1. Réponse au stress mPOS	168
- IV.1.2.2. Réponse UPR _{am}	168
IV.2. Un défaut en tafazzine induit-il un stress protéostatique	169
IV.3. Bénéfices d’une diminution de la synthèse protéique cytosolique en cas de dysfonctions mitochondriales	171
IV.4. Toxicité de la cycloheximide	175
V. Conclusion.....	176

I. Introduction

La cycloheximide (CHX), à cause de son effet inhibiteur sur la synthèse protéique cytosolique, souffre d'une réputation de poison. Proposer de traiter une maladie, tel que le syndrome de Barth, avec cette molécule éveille souvent le scepticisme. Pourtant, nous avons observé que, dans notre modèle *Saccharomyces cerevisiae* délété pour le gène *TAZ1*, l'orthologue du gène humain *TAZ* impliqué dans le syndrome de Barth, la cycloheximide permettait à la souche mutante « malade » de croître mieux sur milieu respiratoire.

Après avoir caractérisé le mutant $\Delta taz1$, comme décrit dans la partie résultats- Article I, nous avons utilisé ce modèle levure pour rechercher des molécules susceptibles de restaurer la croissance respiratoire de la souche mutante $\Delta taz1$. Environ 2 000 molécules ont été testées et, parmi celles donnant un résultat positif (21 Hits positifs), trois d'entre elles ont particulièrement attiré notre attention : la cycloheximide, l'anisomycine et l'émétine (Cette molécule n'était pas dans les chimiothèques, elle a été testée indépendamment). Ces trois drogues sont connues pour leur effet inhibiteur de la synthèse protéique cytosolique. Nous nous sommes concentrés sur la CHX car elle présente une efficacité supérieure aux deux autres drogues. Ainsi, la CHX induit les mêmes effets positifs que l'anisomycine et l'émétine à des doses 30 fois inférieures. Afin de nous assurer que l'effet bénéfique était bien dû à l'inhibition de la synthèse protéique cytosolique, nous avons utilisé une approche génétique qui a consisté à déléter deux gènes non essentiels impliqués dans la biogénèse des ribosomes cytosoliques, *REI1* et *RPL6b*. Ces mutations, provoquant une légère baisse de la synthèse protéique cytosolique, comme le fait la cycloheximide (Wang *et al.*, 2008), permettent aussi de restaurer la croissance respiratoire. Nous en avons déduit qu'une légère diminution de la synthèse protéique cytosolique est bénéfique pour le mutant $\Delta taz1$.

Dans l'article qui suit, nous nous sommes attachés à montrer l'effet bénéfique, non seulement de la cycloheximide mais aussi des mutations $\Delta rei1$ et $\Delta rpl6b$ sur le mutant, par différentes approches. Pour cela, nous avons notamment montré que, dans les souches doubles mutantes ou bien dans la souche simple mutante $\Delta taz1$ cultivée en présence de cycloheximide, la chaîne respiratoire était restaurée aussi bien au niveau de son assemblage que de son activité. Par voie de conséquence, la respiration, la synthèse d'ATP par

oxydations phosphorylantes et la production de ROS sont ramenées à des niveaux proches de celles des cellules sauvages WT. Nous montrons aussi que la légère diminution de la synthèse protéique cytosolique permet une meilleure stabilité de l'ADNmt. Ces améliorations peuvent expliquer la meilleure croissance respiratoire du mutant $\Delta taz1$ en présence de cycloheximide et des souches doubles mutantes $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$. Ces résultats encourageants nous ont poussé à investir des expérimentations sur l'effet de la cycloheximide sur des modèles plus proches de l'Homme. Dans cet article, des premiers résultats sur des cellules HeLa, dans lesquelles l'expression de la protéine TAZ est fortement diminuée par shARN, sont présentés et semblent très encourageants.

L'ensemble de ces résultats confirme donc l'effet bénéfique de l'inhibition partielle de la traduction cytosolique dans nos modèles du BTHS. Cependant, le mécanisme d'action moléculaire exact reste à caractériser. Après avoir aussi présenté quelques résultats complémentaires non publiés, nous discuterons les résultats et le mécanisme d'action suspecté.

II. Article II

Ce manuscrit doit être soumis prochainement dans le journal MIC (Microbial cell).

Decreasing cytosolic translation is beneficial to yeast and human Tafazzin-deficient cells

Running title: Tafazzin deficiency compensation

Maxence de Taffin de Tilques^{1§}, Jean-Paul Lasserre^{1§*}, François Godard¹, Elodie Sardin¹, Marine Bouhier¹, Marina Le Guedard^{2,3}, Roza Kucharczyk⁴, Patrice X. Petit⁵, Eric Testet², Jean-Paul di Rago¹, Déborah Tribouillard-Tanvier^{1#*}

¹ Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR5095, Université de Bordeaux, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux cedex, France.

² Laboratoire de Biogenèse Membranaire, CNRS UMR 5200, Université de Bordeaux, INRA Bordeaux Aquitaine, Villenave d'Ornon, France.

³LEB Aquitaine Transfert-ADERA, FR-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

⁴Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁵INSERM S-1124, Université Paris-Descartes, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

#Research associate from INSERM.

[§]These authors equally contributed

*Correspondence should be addressed to Déborah Tribouillard-Tanvier (deborah.tribouillard-tanvier@ibgc.cnrs.fr) or Jean-Paul Lasserre (jean-paul.lasserre@ibgc.cnrs.fr). Phone: +33 5 56 99 90 39, Fax: +33 5 56 99 90 51

Keywords: Mitochondrial disease; oxidative phosphorylation; Barth syndrome; cytosolic protein synthesis; cycloheximide; cardiolipin remodeling

Abstract

Cardiolipin (CL) optimizes diverse mitochondrial processes, including oxidative phosphorylation (OXPHOS). To function properly, CL needs to be unsaturated, which requires the acyltransferase Tafazzin (TAZ). Loss-of-function mutations in the TAZ gene are responsible for the Barth syndrome (BTHS), a rare X-linked cardiomyopathy, presumably because of a diminished OXPHOS capacity linked to the non-maturation of the cardiolipins. Here we show that a partial inhibition of cytosolic protein synthesis, either chemically with the use of cycloheximide or by specific genetic mutations, fully restores biogenesis and the activity of the oxidative phosphorylation system in a yeast BTHS model (*taz1Δ*). Interestingly, the defaults in CL were not suppressed, indicating that they are not primarily responsible for the OXPHOS deficiency in *taz1Δ* yeast. Similarly, low concentrations of cycloheximide in the picomolar range were beneficial to TAZ-deficient HeLa cells, displayed by the successful recovery of a good proliferative capacity. Our study sheds light on the pathogenesis of the Barth syndrome and identifies cytosolic protein synthesis as a potential target towards the development of novel treatment of this disease.

Introduction

The Barth Syndrome (BTHS) is a rare X-linked recessive mitochondrial disorder that is characterized by cardiac and skeletal myopathies, growth retardation, hypocholesterolemia, increased urine levels of 3-methylglutaconic acid and high susceptibility to bacterial infections, due to cyclic neutropenia [1-3]. This disease is caused by mutations in Tafazzin, a mitochondrial protein involved in the remodeling of cardiolipin (CL). This phospholipid is mainly found in mitochondria, [4-10] where it optimizes numerous processes including oxidative phosphorylation (OXPHOS) [11-13], fusion [14], fission [15, 16], protein import [17, 18], iron-sulfur cluster biogenesis [19], mitophagy [20-23], apoptosis [7, 23-28] and the transport of metabolites across the mitochondrial inner membrane [6, 17, 29-36]. Tafazzin is an acyltransferase required for the maintenance of unsaturated carbon-carbon bonds in CL fatty acyl chains [1, 2, 3, 37-45]. Loss-of-function mutations in Tafazzin lead to reduced levels of unsaturated CL and the accumulation of CL species with an incomplete set of fatty acyl chains (such as monolysocardiolipin, MLCL) [45-47]. This in turn results in multiple mitochondrial alterations that ultimately compromise the OXPHOS capacity [24, 48-51].

Simple model organisms such as *Saccharomyces cerevisiae* or Barker's yeast are an important resource for the study of mitochondrial diseases. Mitochondria from these single-celled fungi and humans show many similarities [52-56]. Being easily amenable to genetic manipulation of mitochondrial function [57, 58], and owing to the ability of yeast to survive the loss of oxidative phosphorylation; yeast models of human mitochondrial diseases can be easily created and kept alive when provided with fermentable substrates [59, 60]. The common respiratory growth defect of these models enables large-scale screening of genetic and pharmacological suppressors [60-62]. Yeast has in this way already pointed to several potential druggable therapeutic intervention points, such as the oxodicarboxylic acid carrier [63] and mitochondrial protein import [64], among others.

Herein we report that reducing cytosolic protein synthesis preserves oxidative phosphorylation in CL remodeling deficient yeast and improves the growth rate and viability of human HeLa cells lacking Tafazzin. This study sheds light on the pathogenesis of the Barth syndrome and identifies cytosolic protein synthesis as a potential intervention point for the development of new treatments for the disease.

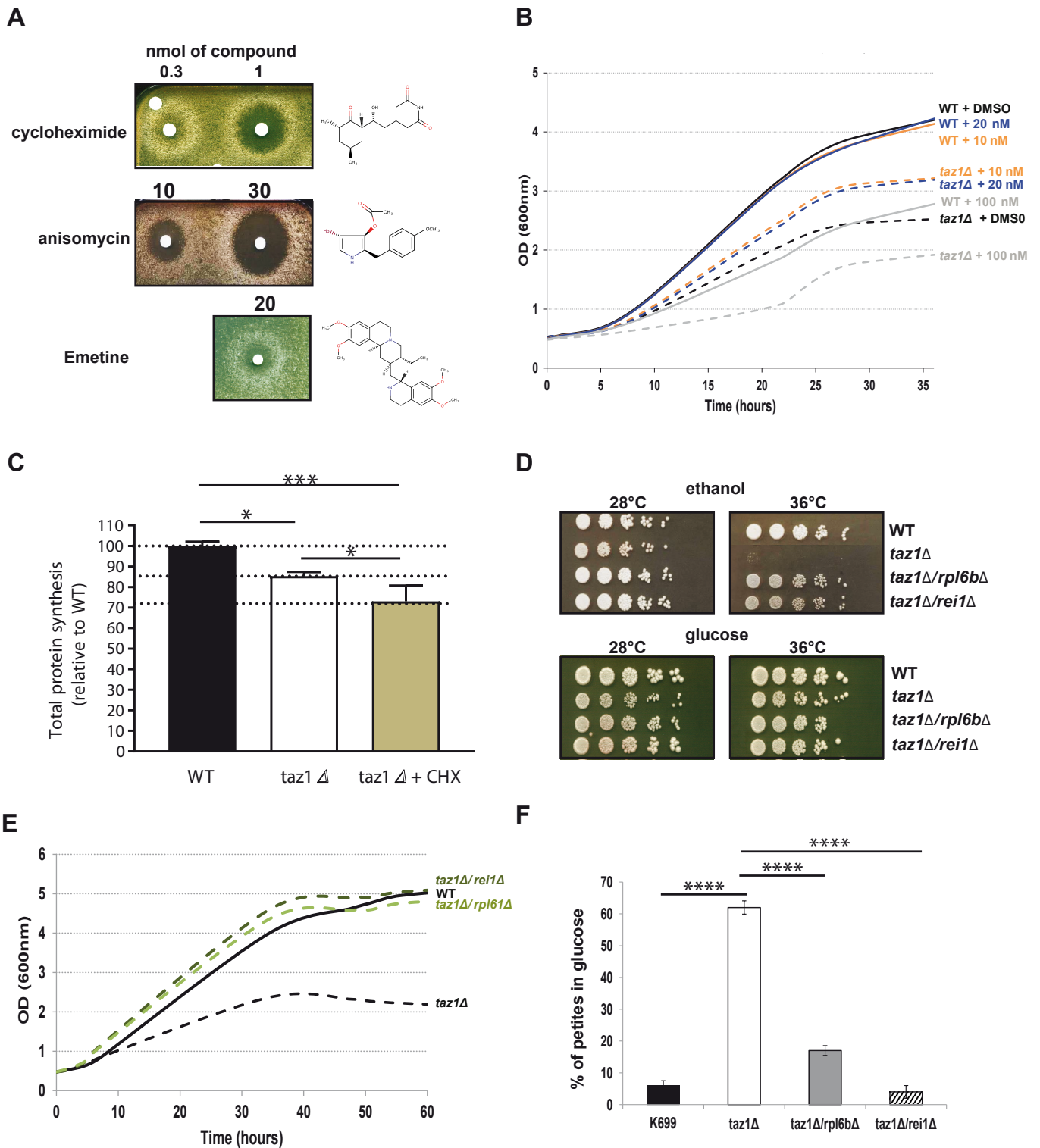


Figure 42. Partially decreasing cytosolic translation in Taffazin-deficient (*taz1Δ*) yeast improves respiration-dependent growth and mtDNA maintenance. **A.** *taz1Δ* yeast cells were spread as dense layers onto rich ethanol solid media and then exposed to sterile filters spotted cycloheximide, anisomycin or emetine (dissolved in DMSO). The plates were scanned after 5 days of incubation at 36°C. The filter at the top left was spotted with DMSO alone to provide a negative control. **B.** Determination in liquid cultures of CHX concentrations that optimally rescue *taz1D* yeast. Complete synthetic media (CSM) containing 0.5% galactose + 2% ethanol supplemented or not with cycloheximide at the indicated concentrations were inoculated with WT and *taz1Δ* cells pre-grown in CSM containing 2% glucose at 28°C. The cultures were performed at 36°C and cells densities (OD_{600nm}) taken over a period of 36 hours. **C.** Rate of protein synthesis. Total proteins were labeled →

with a mixture of [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine for 20 min in whole cells from wild type and *taz1Δ* yeast grown for 24 hours in 0.5% galactose + 2% ethanol at 36°C, and *taz1Δ* cells grown in the same conditions in presence of 10 nM cycloheximide (CHX). After the labeling reactions, total protein extracts were prepared and separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel (75 mg per lane). The gels were dried and analyzed with a PhosphorImager. Quantification was performed using Image J. Data are expressed in % relative to the WT (n=3). Statistical analysis was done with Tukey's test (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001). **D.** Genetic ablation of *REI1* (*rei1Δ*) or *RPL6B* (*rpl6bΔ*) improves respiratory growth of *taz1D* yeast. *WT*, *taz1Δ*, *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6bΔ* cells freshly grown at 28°C in rich glucose were serially diluted and spotted onto rich ethanol and glucose plates. The plates were scanned after 4 days of incubation at the indicated temperature. **E.** Growth of *WT*, *taz1Δ*, *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6bΔ* strains in liquid complete synthetic media containing 0.5% galactose + 2% ethanol at 36°C. The cultures were inoculated with cells grown in CSM containing 2% glucose at 28°C. The cultures were performed at 36°C and cell densities (OD_{600nm}) taken over a period of 60 hours. **F.** Genetic ablation of *REI1* (*rei1Δ*) or *RPL6B* (*rpl6bΔ*) in *taz1Δ* yeast preserves mtDNA maintenance. Proportions of *r/r⁰* cells produced in glucose cultures at 28°C of strains *WT*, *taz1Δ*, *taz1Δ/reiΔ*, and *taz1Δ/rpl6bΔ* were determined using the procedure described in [63] (n=3). Data are expressed in % relative to the WT and were statistically analyzed using Tukey's test (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Results

Decreasing cytosolic protein synthesis improves respiratory growth of taz1Δ yeast

We [63] and others [65] showed that yeast cells lacking the gene encoding Taz1p (*taz1Δ*) grow poorly on respiratory carbon sources at 36°C, compared to the wild-type (WT) *TAZ1*⁺ strain. Using a drug screening procedure previously described [61], we found that cytosolic protein synthesis inhibitors such as, cycloheximide (hereafter abbreviated as CHX), anisomycin and emetine suppressed this phenotype in a dose-dependent manner. In the tests shown in Fig. 1A, *taz1Δ* cells freshly grown by fermentation in glucose were spread on plates containing ethanol (respiratory carbon source) and then exposed to paper disks spotted with the drugs dissolved in DMSO. After five days of incubation at 36°C, halos of enhanced growth appeared around the filters, whereas DMSO alone had no effect. In this assay the compounds diffused into the medium, explaining why growth was improved only at some distance around the filters, beyond which it was totally absent due to a too high concentration of the protein synthesis inhibitors. CHX was active at 20-30 fold lower concentrations compared to anisomycin and emetine (Fig. 42A). The optimal rescuing concentration range of CHX was determined by growth tests in liquid media containing 2% ethanol and 0.5% galactose, at 36°C. After consumption of the galactose, which is a fermentable substrate, growth of *taz1Δ* yeast was much less efficient compared to the wild type, owing to its failure to properly express mitochondrial function (Fig. 42B). The best growth improvement of *taz1Δ* yeast was observed in the presence of 10-20 nM CHX. At these concentrations, growth of the wild type was unaffected (Fig. 42B). At 100 nM of CHX, both the wild type and the mutant grew much less efficiently. Pulse labeling of proteins with S³⁵-methionine and S³⁵-cysteine revealed that the rate of protein synthesis was decreased by about 30% in *taz1Δ* yeast grown in the presence of 10 nM CHX, in comparison to the WT (Fig. 42C). Interestingly, cytosolic translation was already decreased in the mutant grown in the absence of the drug by

about 15%, possibly as a means to attenuate the deleterious consequences of a lack in CL remodeling (see below).

If CHX is a well-known inhibitor of cytosolic translation, one cannot exclude that it has other effects in cells that could be responsible for the improved respiratory growth of *taz1Δ* yeast. We therefore tested the effects on *taz1Δ* yeast of null mutations in the genes *REI1* and *RPL6B* that partially inhibit cytosolic protein synthesis by 20% and 30% respectively [66, 67]. The double mutants *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6BΔ* grew efficiently on respiratory carbon sources (Fig. 42D, E), which confirmed that the beneficial effect of CHX in *taz1Δ* yeast resulted clearly from a decreased rate of protein synthesis.

Decreasing cytosolic protein synthesis improves mtDNA maintenance in taz1Δ yeast

We previously showed that *taz1Δ* yeast grown by fermentation at 28°C has an increased propensity to produce ρ^-/ρ^0 cells issued from large deletions in the mitochondrial genome (60% vs 5% in the WT) [63]. A possible explanation is that the import into mitochondria of the systems involved in mtDNA maintenance is less efficient in *taz1Δ* yeast than in the wild type. In line with this, loss of CL remodeling was shown to partially compromise the biogenesis of the protein translocase (TOM) and the sorting and assembly machinery (SAM) of the outer mitochondrial membrane [18, 68]. Additionally, *taz1Δ* mitochondria do not properly energize the inner membrane ([63], see below), which could impact protein import through the $\Delta\Psi$ -dependent TIM23 machinery. The diminished mtDNA stability of *taz1Δ* yeast in glucose is not responsible for its slow growth from respiratory carbon sources at 36°C. Indeed, in these conditions, ρ^-/ρ^0 cells cannot grow and do not accumulate, whereas in glucose they do so efficiently. Especially noteworthy is that, the double mutants *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6BΔ* produced five to ten times less ρ^-/ρ^0 cells than *taz1Δ* yeast in glucose cultures (Fig. 42F). Thus, partially decreasing cytosolic translation preserves a proper

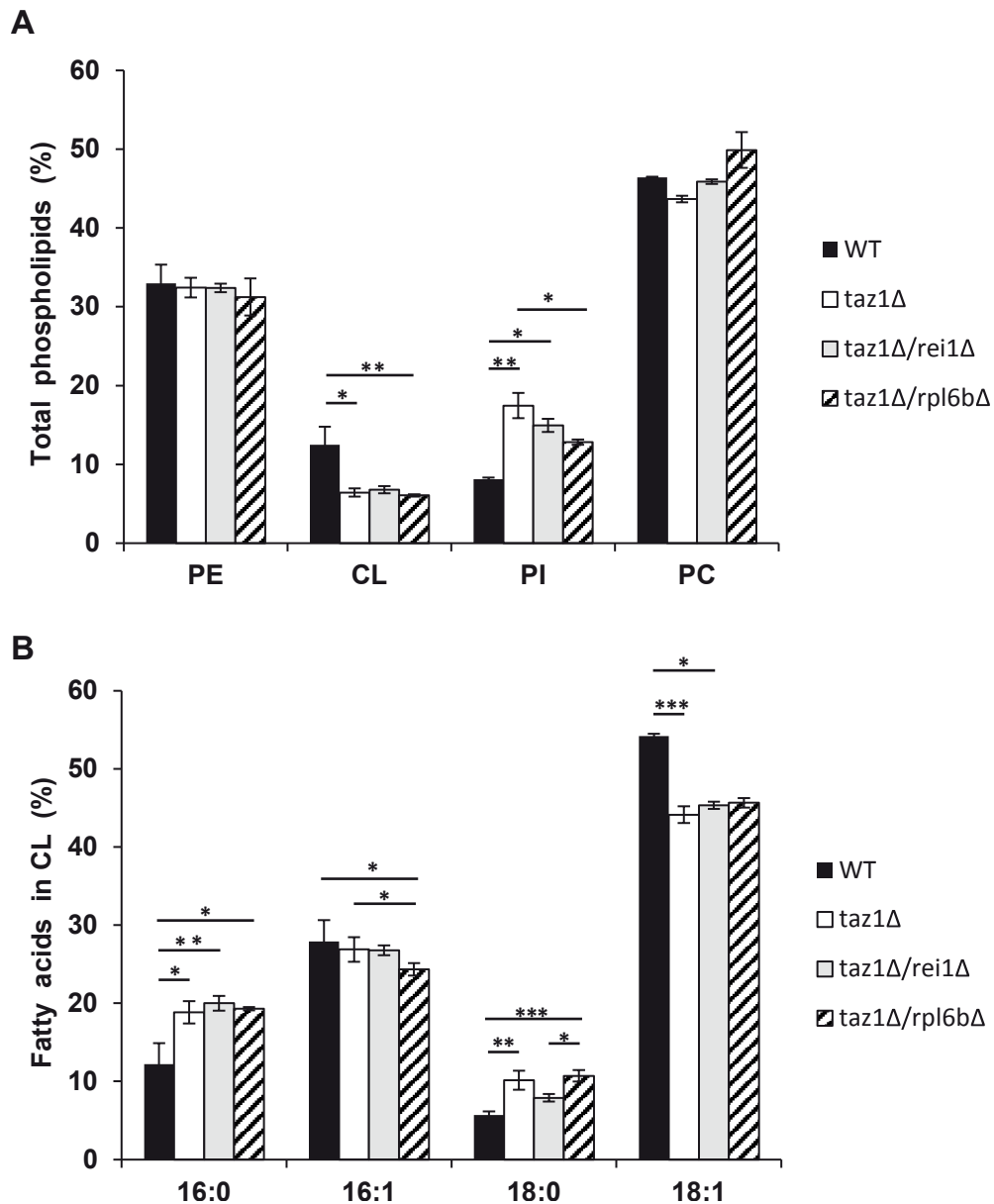


Figure 43. Genetic ablation of REI1 or RPL6B in *taz1D* yeast does not restore cardiolipin remodeling. Lipids were extracted from mitochondria isolated from WT (black bars), *taz1Δ* (open bars), *taz1Δ/rei1Δ* (grey bars) and *taz1Δ/rpl6bΔ* (striped bars) cells grown in CSM 0.5% galactose + 2% ethanol at 36°C until a density of 2-3 OD_{600nm}. A. Relative contents of PE (phosphatidylethanolamine), CL (cardiolipin), PI (phosphatidylinositol) and PC (phosphatidylcholine) within each strain. B. Relative fatty acid chain composition of CL within each strain (16:0, palmitic acid; 16:1, palmitoleic acid; 18:0, stearic acid; 18:1: oleic acid). Statistical analysis was done with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001). Data are expressed as mean±s.d. (n=4). The data for WT and *taz1Δ* strains were reported previously [63].

maintenance of mtDNA in CL deficient yeast cells. This observation indicates that the decreased mtDNA stability in CL remodeling deficient cells might not primarily be caused by a less efficient protein import into mitochondria, otherwise this phenotype should have been exacerbated by slowing down cytosolic translation.

Reducing cytosolic translation does not restore CL remodeling in *taz1Δ* yeast. As reported [39, 63, 65], mitochondria from *taz1Δ* yeast, compared to those from the WT, have 50% less CL, a 2-fold higher content in phosphatidylinositol (PI), whereas phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) are accumulated normally (Fig. 43A). Additionally, the remaining CL species are less unsaturated suggested by the decreased levels in oleic acid chains (C18:1) and increased stearic (C18:0) and palmitic (C16:0) groups compared to CL molecules extracted from the WT (Fig. 43B). Strains *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6BΔ* showed very similar phospholipid profiles (Fig. 43A, B), indicating that mitochondrial function recovery in *taz1Δ* yeast upon partial inhibition of cytosolic translation did not result from an enhanced production of mature CL species.

Partially decreasing cytosolic protein synthesis fully restores oxidative phosphorylation in *taz1Δ* yeast. As we have shown [63], the reduced ability of *taz1Δ* yeast to grow at 36°C in 2% ethanol + 0.5% galactose (shown in Fig. 42B) correlated with a decreased rate of oxygen consumption. This additionally agreed with diminished levels of key components involved in the transfer of electrons to oxygen, including complexes II-IV and cytochrome *c*. The accumulation of these proteins (Fig. 44A, B) and oxygen consumption, measured with either NADH or Ascorbate-TMPD as electron donors, were substantially improved after eliminating *REI1* or *RPL6B* (Fig. 44C) or growing *taz1Δ* yeast in the presence of 10 nM CHX (Fig. 44D).

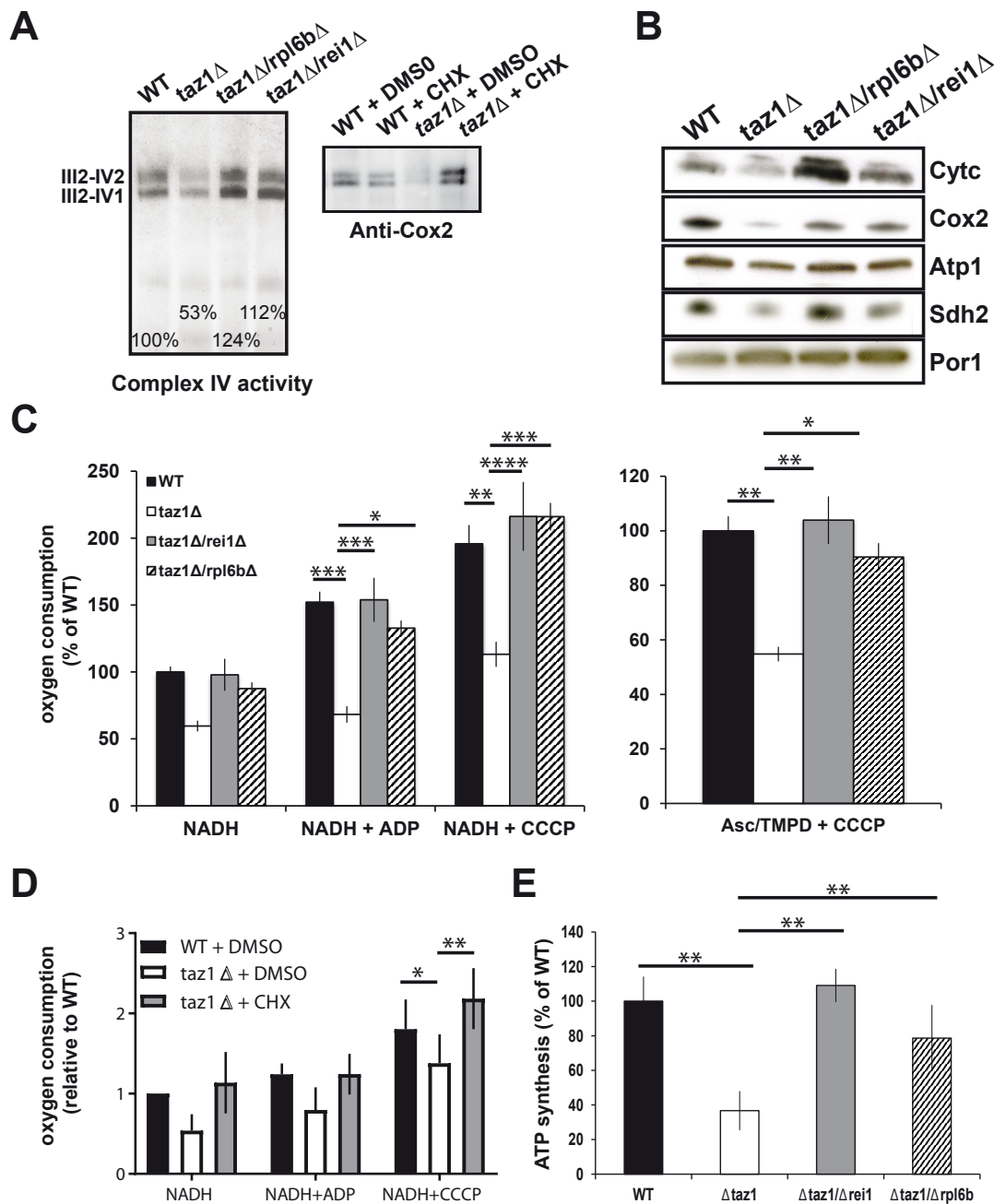


Figure 44. Partially decreasing cytosolic translation preserves oxidative phosphorylation in *taz1*Δ yeast. **A.** The experiments here described were performed using mitochondria isolated from cells grown for 24 hours at 36°C in CSM containing 0.5% galactose + 2% ethanol, supplemented or not as indicated with 10 nM CHX, until a density of 2-3 OD_{600nm}. **A, B.** Steady-state levels of proteins involved in the transfer of electrons to oxygen. **A.** Proteins were extracted from the mitochondrial samples using 2 g digitonin per g of proteins. The supercomplexes III₂-IV₂ and III₂-IV₁ were revealed by the complex IV activity after separation by CN-PAGE or by western blot with antibodies against Cox2 in BN-PAGE gels. **B.** Total mitochondrial protein samples were resolved by SDS-PAGE (50 μg per lane) and probed with antibodies against the indicated proteins. The shown gels are representative of at least 3 experiments. **C.** Genetic ablation of *REI1* or *RPL6B* in *taz1*Δ yeast preserves mitochondrial respiration. On the left are the rates of oxygen consumption from NADH (4 mM) alone (state 4), after further addition (150 μM) of ADP (state 3) or CCCP (4 μM) (uncoupled respiration). The data are expressed in % of *WT* state 4 respiration (mean±s.d, n=4). On the right are the oxygen consumption rates from electrons delivered directly to complex IV by ascorbate 12.5 mM/TMPD 1.4 mM in the presence of CCCP. Data are expressed relative to the *WT* (mean±s.d, n=4). **D.** Mitochondrial respiration is preserved in *taz1*Δ yeast grown in the presence of 10 nM CHX. NADH was used as the electron donor, as described in panel C (n=4). **E.** ATP synthesis was measured using NADH as a respiratory substrate in the presence of 1 mM ADP. Data are expressed as mean±s.d. (n=4) relative to the *WT*. The data for *WT* and *taz1*Δ strains were reported previously [63].

Consequently, the rate of mitochondrial ATP synthesis was restored to almost normal levels (Fig. 44E).

These observations were corroborated by monitoring changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) with Rhodamine 123. As we showed [63], adding ADP to respiring *taz1Δ* mitochondria did not decrease $\Delta\Psi$, due to their poor capacity to synthesize ATP. Consistent with their good ability to produce ATP, those from strains *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6BΔ* efficiently responded to ADP as WT mitochondria (Figure 45). Furthermore, after a subsequent addition of KCN, to block the respiratory chain, $\Delta\Psi$ collapsed in one single rapid phase in *taz1Δ* mitochondria, whereas a residual potential was preserved in those from *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6BΔ* and wild type yeasts. This residual potential is due to the pumping of protons by ATP synthase, coupled by the hydrolysis of the ATP that accumulated in the mitochondrial matrix during phosphorylation of the added ADP. As demonstrated by the loss of this potential by inhibiting ATP synthase with oligomycin (Fig. 45).

Taken together, these observations demonstrate that partially decreasing cytosolic translation preserves the biogenesis and activity of the OXPHOS system in CL remodeling deficient yeast.

Partially decreasing cytosolic protein synthesis suppresses the enhanced production of ROS in *taz1Δ* yeast.

Defects in the mitochondrial respiratory chain often result in a higher production/accumulation of reactive oxygen species (ROS) owing to an enhanced diversion of electrons from their normal pathway to oxygen, which was observed in CL remodeling deficient cells [69]. Thus, it was expected that, *taz1Δ* yeast should produce less ROS after deleting *REI1* or *RPL6B* or during growth in the presence of 10 nM CHX, which was indeed observed (Fig. 46).

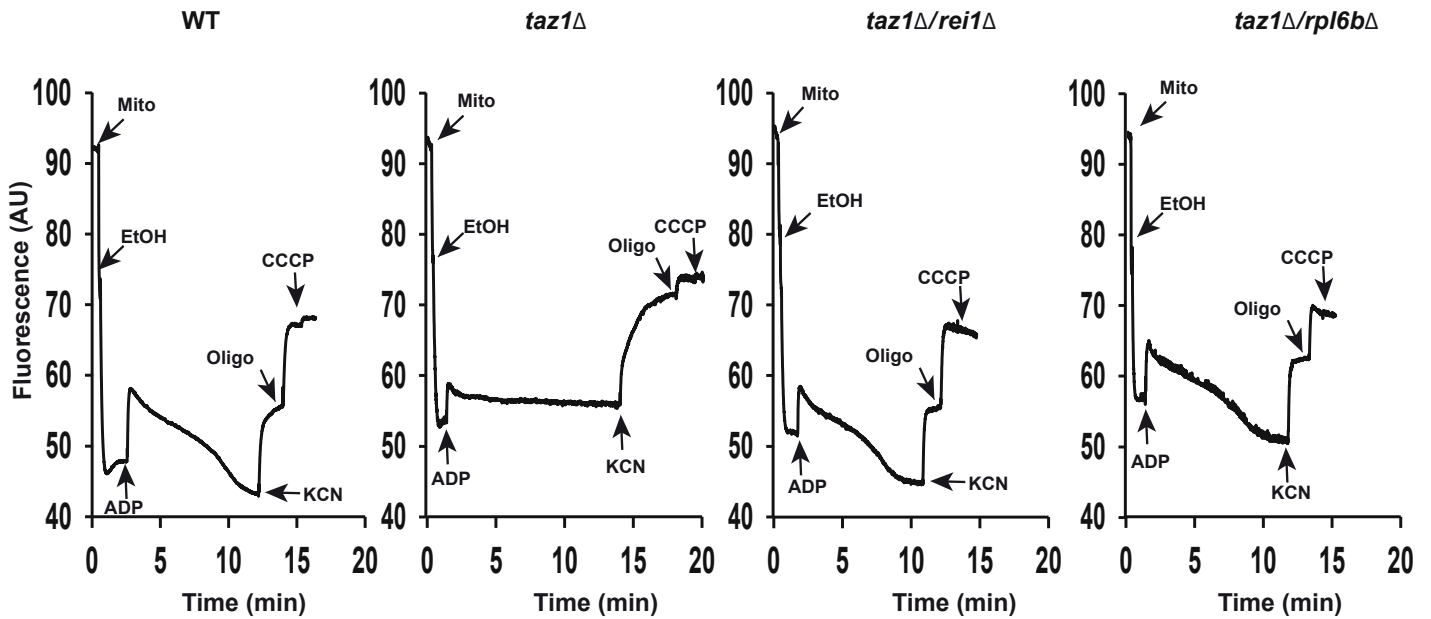


Figure 45. Mitochondrial membrane potential. Variations in mitochondrial $\Delta\Psi$ were monitored by fluorescence quenching of Rhodamine 123, using intact, osmotically-protected, mitochondria isolated from WT, *taz1Δ*, *taz1Δ/rei1Δ* and *taz1Δ/rpl6bΔ* cells grown in CSM containing 0.5% galactose + 2% ethanol at 36°C until a density of 2-3 OD_{600nm} . The additions were 75 μ M ADP, 0.5 μ g/ml Rhodamine 123, 75 μ g/ml mitochondrial proteins (Mito), 10 μ l ethanol (EtOH), 2 mM potassium cyanide (KCN), 4 μ M CCCP (carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazine) and 4 μ g/ml oligomycin (oligo). The shown tracings are representative of four experimental trials. The data for WT and *taz1D* strains were reported previously [63].

Decreasing cytosolic protein synthesis is also beneficial to tafazzin-deficient human cells.

We aimed to understand whether partially decreasing cytosolic translation could also benefit human cells lacking Tafazzin. To this end, we used our previously described HeLa cells, in which the TAZ gene was knocked down by RNA interference (shTaz1) and two control cell lines, shWT1 and shTaz1R in which the expression of TAZ1 was not inhibited. As reported, ShTaz1 poorly accumulates Tafazzin, is defective in CL maturation, presents a destabilization of the supercomplexes, produces abnormally enlarged cells and has a higher content in mitochondria compared to shWT1 and shTaz1R, as do cells from Barth syndrome patients [24, 51, 70].

Herein we report that ShTaz1 cells proliferate four times slower and die more rapidly, in comparison to ShWT1 and ShTazR1 cells (Fig.47 A, B). We took advantage of these differences to test the capacity of CHX at counteracting the detrimental effects of a lack in CL maturation in human cells. A large beneficial effect was observed at a 50 pM concentration of CHX. In the experiment shown in Fig. 47C, the drug was added 24-25 hours after inoculating 200 μ l of media with 5000 cells. CHX induced a 48h lag phase, after which the cells grew for a long-lasting period of 170 hours, before dying and detaching from their support. In the absence of CHX, death was observed much more rapidly, after 72 hours of continuous growth. These observations indicate that a partial decrease in cytosolic translation is, as in *taz1* Δ yeast, beneficial to human cells defective in CL remodeling.

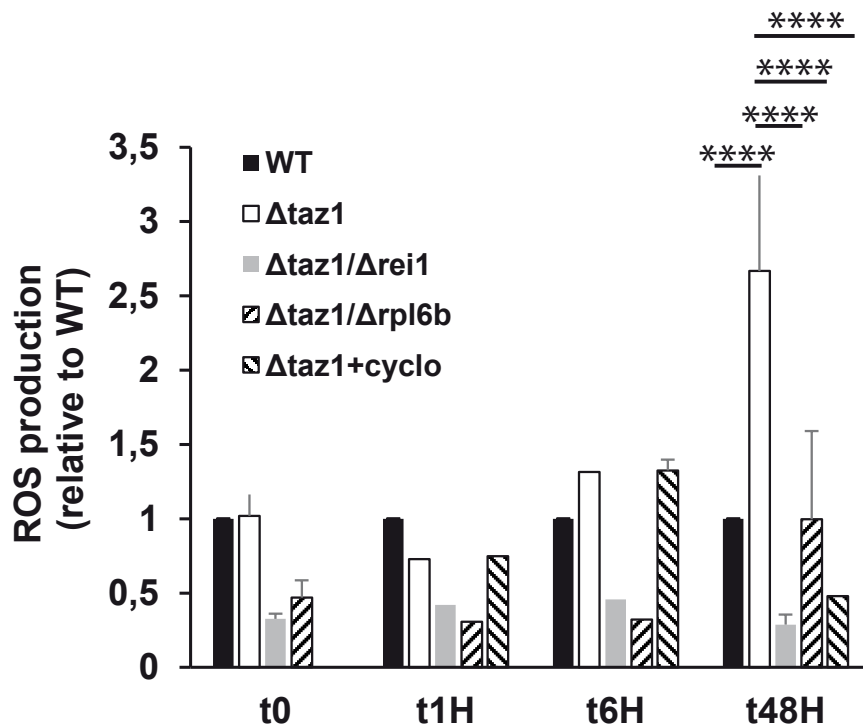


Figure 46. Partially decreasing cytosolic translation in *taz1D* yeast preserves a normal production of ROS. The cells were grown in CSM containing 0.5% galactose + 2% ethanol at 36°C four 48 hours. At the indicated times, ROS levels were measured by flow cytometry using dihydroethidium as a probe. The data are expressed in % relative to the *WT* at T0 (n=3). Statistical analysis was done with Tukey's test (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001). The data for *WT* and *taz1D* strains were reported previously [63].

Discussion

While a general inhibition of cytosolic protein synthesis would obviously be detrimental to the cell, our study reveals that a partial (30%) decrease in this activity preserves the biogenesis and activity of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system in a yeast model of the Barth syndrome, a mitochondrial disease associated to defects in the remodeling of cardiolipin (CL). Importantly, CL remodeling was still deficient in the rescued *taz1Δ* cells. This finding has two important corollaries: (i) the CL species remaining in *taz1Δ* yeast (50% vs the WT) are sufficient for a proper biogenesis and functioning of the OXPHOS system, and (ii) the oxidative phosphorylation deficit in *taz1Δ* yeast is secondary to some other cellular dysfunction(s) that can be suppressed by decreasing cytosolic translation. At low concentration (50 pM), CHX proved to also be beneficial in tafazzin-deficient human cells, as evidenced by an improved capacity of these cells to proliferate. This indicates that yeast and human CL remodeling deficient cells face similar difficulties that can be attenuated by targeting cytosolic translation.

Previous work revealed that decreasing cytosolic translation can also rescue yeast models of disease caused by mutations in ANT, a protein that exchanges adenine nucleotides across the mitochondrial inner membrane [71]. In addition to a defective exchange of adenine nucleotides, these mutations compromise the impermeability to protons of the inner membrane. Consequently, a sufficient electrical potential cannot be maintained across this membrane and this impedes many proteins to reach the organelle. This has deleterious consequences, not only for mitochondria, but also for the cytosol that is confronted with the over-accumulation and the misfolding of mitochondrial precursor proteins [72]. This protein stress, which was termed mitochondrial precursor over-accumulation (mPOS), was shown to induce a cellular response, named response activated by mistargeted mitochondrial proteins (UPRam), that is characterized by a decreased rate of cytosolic protein synthesis and a faster

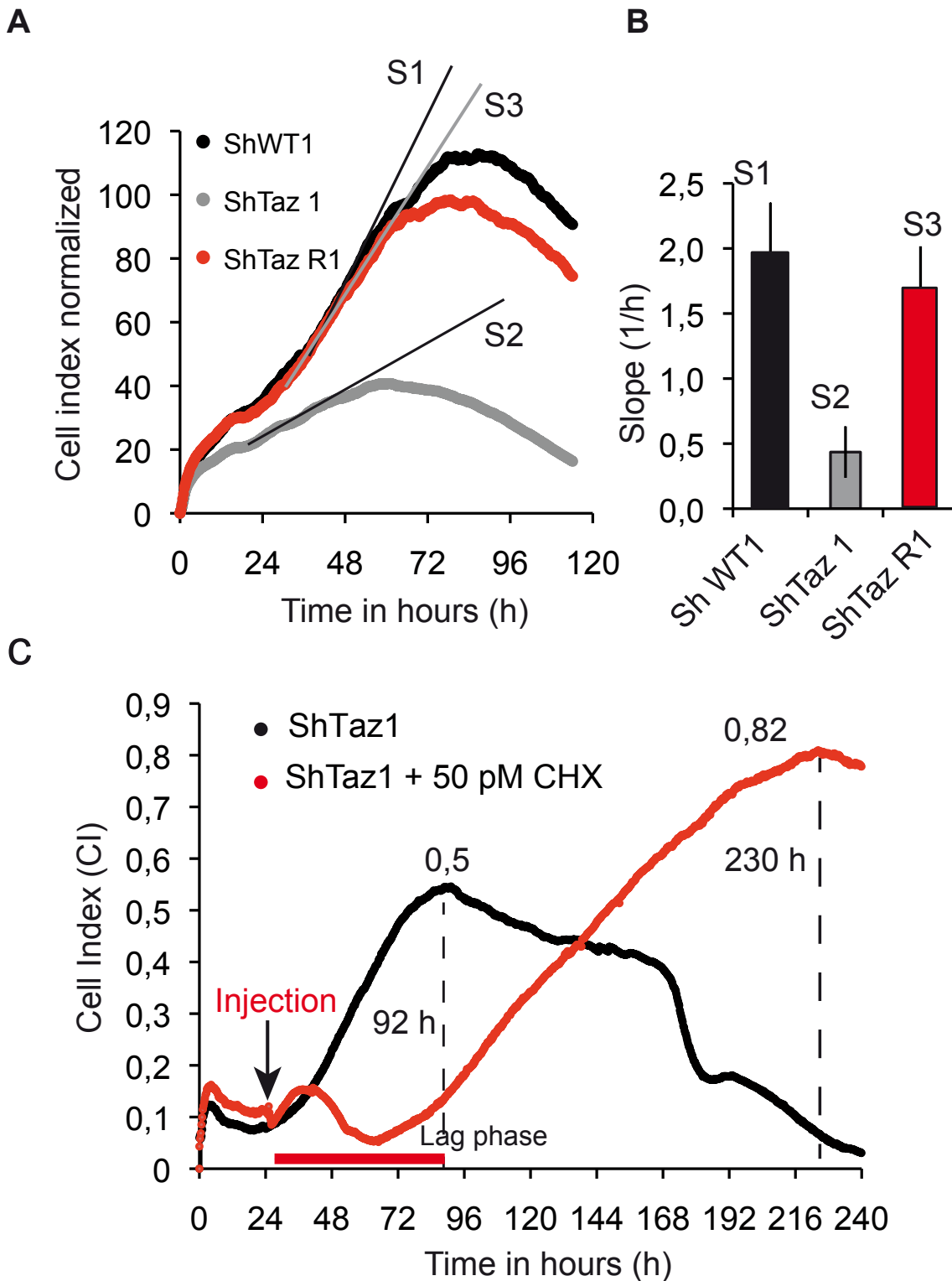


Figure 7. CHX improves cell proliferation and viability of human Tafazzin-deficient cells. These experiments used our previously described HeLa cells in which TAZ gene has been knocked down by RNA interference (shTaz1) and two control cell lines, shWT1 and shTaz1R, in which expression of TAZ1 is not inhibited [87]. **A.** Growth curves in 200 mL wells inoculated with 7 500 cells. After reaching a plateau, the cells die and detach from their support. **B.** Relative slopes of proliferation curves shown in panel A. **C.** xCELLigence recording of ShTaz1 proliferation in absence or presence of CHX at a concentration of 50 pM. CHX was added (Black arrow) after a 24 hour adhesion step. The cultures were inoculated with $5 \cdot 10^3$ cells in 200 μ L wells. The optimal Cell Index values are indicated along the curves as well as the time (in hours) taken to reach the inflexion point. The horizontal red bar stands for the 48 hours lag phase induced by CHX. The shown curves are representative of four independent experiments with 4 wells for each growth condition (16 wells in total for establishing mean values).

rate of protein clearance by the proteasome [71, 73]. Consistent with these findings, mutations in proteins, directly involved in the transport of proteins into mitochondria, were found to similarly poison the cytosol with mitochondrial proteins triggering the cell to diminish the production and stimulate the degradation of proteins [73].

Considering the numerous roles of cardiolipin in mitochondria, it might be that a lack in the remodeling of this phospholipid generates similar perturbations that make other compartments of the cell more susceptible to protein stress. Consistent with this, as the ANT and protein import defective mutants evoked above, *taz1Δ* yeast shows a significant drop in protein synthesis (of about 15% relative to the WT). Clearly, beyond a certain level of mitochondrial damage, the protein stress responsive pathways are not sufficient. This may serve to explain the rescue of *taz1Δ* by an additional 15% decrease in the rate of protein synthesis, by the partial inhibition of the ribosome with CHX. This rescuing mechanism is in line with a recent study showing that cardiolipin has an important role in promoting the induction of a mitochondrial-to-cytosolic stress response (MCSR) that enables the cell to respectively improve protein homeostasis in both compartments [74].

Our study reveals that a diminished capacity of CL remodeling deficient cells to preserve protein homeostasis is likely an important factor contributing to the pathogenesis of the Barth syndrome. This in turn, identifies cytosolic translation as a potential therapeutic target for the treatment of this disease. In line with this, it was shown that rapamycin, a specific inhibitor of the mTOR signaling pathway that regulates several extra-mitochondrial cellular pathways among which protein synthesis, robustly enhances survival and attenuates the disease's progression in a mouse model and patient cells of the Leigh Syndrome, one of the most devastating mitochondrial disorders [75, 76].

Materials and Methods

Growth media. The following media were used for growing yeast: Fermentable YPAD media containing 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bacto peptone, 40 mg/L adenine and 2% (v/v) glucose; Respiratory rich media YPAEthanol containing 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bacto peptone, 40 mg/L adenine and 2% (v/v) ethanol; Non-fermentable complete synthetic media CSM/gal/ethanol containing 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without aminoacids and ammoniumsulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 0.5% (w/v) galactose, 2% ethanol and 0.08% (w/v) of a mixture of aminoacids and bases from Formedium. Solid media contained 2% (w/v) agar.

Construction of strains *taz1Δ/rpl6bΔ* and *taz1Δ/rei1Δ*. These strains were constructed by deleting entirely the open reading frame of *RPL6B* or *REI1* with the *KanMX* marker using a described procedure [77] in *taz1Δ* mutant (*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1*). For the construction of the strain *taz1Δ/rpl6bΔ*, the *KanMX* cassette was amplified using primers pFA6a-Kan: Rpl6b-del-F (CTT TCT TGA ACT TGG AAG AGA AGC AAA TAT ATT CAA CGA A cgg atc ccc ggg tta att aa) and Rpl6b-del-R (CTA TTT TAA ATC ATT TAT AAT TTT TTC AGT TCA AT gaa ttc gag ctc gtt taa ac) (the sequences in capital letters are homologous to the *RPL6B* flanking regions, those in lower case enable amplification of *KanMX*). For the construction of the strain *taz1Δ/rei1Δ*, the *KanMX* cassette was amplified with pFA6a-Kan: Rei1-del-F (CAT TAG AAG TCA AGA AGA GAG CAT ATC AGT AAC AAT ACG cgg atc ccc ggg tta attaa) and Rei1-del-R (GCG ACA AAA TAC TAA AAA AAG TAG TGC AAA AAG AA gaa ttc gag ctc gtt taa ac). The primers Rpl6b-Fbis (CTG CGC TTC CGT TCA GCA TC), Rpl6b-Rbis (CGA TGA CCT GAT CTT GAA CCC) or, Rei1-Fbis (GTG GTG TAG CTA TTT GTA CAT G), and Rei1-Rbis (CAA CAT CTT CAG TCT TCA GCA GC) were used to verify the deletions of *REI1* and *RPL6B* by PCR.

Yeast-based drug assay. 0.125 OD of exponentially growing cell were homogeneously spread with sterile glass beads on a square Petri dish (12 cm x 12cm) containing solid YPA ethanol medium. Sterile filters were deposited on the plate and spotted with Cycloheximide (purchased from Sigma), anisomycin (purchased from Sigma), and emetine (purchased from Sigma) dissolved in DMSO. Growth improvement was assessed after several days of incubation at 36°C.

Bioenergetics experiments. The mitochondria were prepared by the enzymatic method as described [78]. Protein concentrations were determined by the Lowry method [79] in the presence of 5% SDS. Oxygen consumption rates were measured on 75 µg of fresh mitochondria using a Clarke electrode in the respiration buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic, 5 mM tris-phosphate, 10 mM tris-maleate, pH 6.8) as described [80] (see legend of Fig. 3 for the concentrations of reagents used). Variations in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$) were evaluated in the same respiration buffer, by monitoring the quenching of rhodamine 123 fluorescence (0.5 mg/ml) using a λ_{exc} of 485 nm and a λ_{em} of 525 nm under constant stirring, using a FLX Spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco), as described [81]. ATP synthesis rates were measured using 75 µg of fresh mitochondria in a 2-ml thermostatically controlled chamber at 28°C in respiration buffer, in the presence of 4 mM NADH and 1mM ADP as described [82]. Aliquots were withdrawn from the oxygraph cuvette every 15 seconds and supplemented with 2.5% (w/v) perchloric acid, 8.5 mM EDTA to stop the reaction and then neutralized to pH 6.8 by adding 2N KOH, 0.3 M MOPS. ATP was quantified using a luciferin/luciferase assay (ATPLite kit from Perkin Elmer) on a LKB bioluminometer. The participation of the F₁F₀-ATP synthase in ATP production was assessed using the same protocol, in the presence of oligomycin (3 µg/ml).

BN/CN-PAGE & SDS-PAGE. Blue native BN-PAGE and clear native CN-PAGE experiments were carried out as described [83], using mitochondrial extracts solubilized with digitonin (2 gr per gr protein) run in 3–12% continuous gradient acrylamide gels. The in-gel complex IV activity was revealed using a solution of Tris 5mM pH 7.4, diaminobenzidine 0.5 mg/ml, cytochrome *c* 0.05 mM. The proteins were also analyzed by Western blotting on poly(vinylidene difluoride) membranes as described [84]. Polyclonal antibodies raised against yeast ATP synthase were used at a dilution of 1:50000 for subunit α (gift from J. Velours, IBGC, Bordeaux, France); 1:10000 for cytochrome *c* (gift from S. Manon, IBGC, Bordeaux, France); 1:5000 for succinate dehydrogenase Sdh2 subunit (gift from C. Dallabona, University of Parma, Italy). Monoclonal antibodies against porin and Cox2 (from Molecular Probes) were used at a dilution of 1:5000. Nitrocellulose membranes were incubated with peroxidase-labeled antibodies (from Promega) at a 1:2500 dilution, and analyzed by electrochemiluminescence. Quantification of the protein signals was performed with the ImageJ software.

In vivo labeling of mitochondrial translation products. The indicated strains were grown to early exponential phase (OD/ml of 2) in 10 ml of liquid ethanol/galactose media at 36°C. The cells were harvested by centrifugation and washed twice with a low sulfate medium containing 2% ethanol, supplemented with histidine, tryptophan, leucine, uracil, adenine, and arginine (50 mg/liter each). Cells were resuspended in 1 ml of the same medium with the addition of 0.5 mCi of [35S] methionine plus [35S] cysteine (Amersham Biosciences). The cell suspension was further incubated for 20 min at 36 °C. After the labeling reactions, total protein extracts were prepared from the cells and quantified by using the Lowry method. Protein extracts were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel. The gels were dried and analyzed with a PhosphorImager. Quantification of radioactive proteins was performed using the software ImageJ [85].

Lipid analyses. Mitochondrial lipids were analyzed as described [63]. In summary, the lipids were extracted with 2 ml of chloroform/methanol (2:1, v/v). After centrifugation, the organic phase was isolated and the remaining lipids were further extracted twice by adding 2 ml of chloroform to the aqueous phase. The organic phases were pooled and evaporated to dryness. The lipids were then resuspended in chloroform/methanol (2:1, v/v). Respective volumes equivalent to 50 µg of acyl chains were spotted on silica plates, four times for each strain. Polar lipids were separated by one dimensional TLC using chloroform/methanol/1-propanol/methyl acetate/0.25% KCl (10:4:10:10:3.6, by vol.) as a solvent [86]. The lipids were located by immersing the plates in a solution of 0.001% (w/v) primuline in PBS, followed by visualization under UV light. The zones of the gel corresponding to PE, CL, PI and PC were then scraped and added to 1 ml of methanol/2.5% H₂SO₄ containing 5 µg of heptadecanoic acid methyl ester as a standard. The lipid mixtures were incubated at 80°C for 1 h, and 1.5 ml of water and 400 µl of hexane were then added. After centrifugation, the hexane phase containing FAMES (fatty acid methyl esters) was isolated. Separation of FAMES was performed as described [39].

ROS analysis.

Cells at 0.4 OD units were taken from liquid cultures, pelleted in a microcentrifuge, resuspended in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 50 µM dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) and incubated at room temperature for 5 min. Flow cytometry was carried out on a Becton-Dickinson Accuri C6 model flow cytometer. The DHE fluorescence indicated was the direct output of the FL2A (red fluorescence) channel without compensation. A total of 100,000 cells were analyzed for each curve.

xCELLigence real time cellular proliferation measurements

Experiments were carried out using the xCELLigence RTCA DP instrument (ACEA Biosciences, Ozyme, France) placed in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Cell

proliferation and cytotoxicity experiments were performed using 16-well plates (E-plate, Ozyme, Montigny le Bretonneux, France). The microelectrodes attached at the bottom of the wells allowed for impedance-based detection of the attachment, spreading and proliferation of the cells. Initially, 180 μ L of cell-free growth medium (10% FBS) was added to the wells. After leaving the devices at room temperature for 30 min, the background impedance for each well was measured. Cells were harvested from exponential phase cultures by a standardized detachment procedure using 0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen). Flow cytometry was used to count the cells and test their viability (FSC versus propidium iodide staining). 5000 or 7500 cells in 20 μ l were added in each well. After leaving the plates at room temperature for 30 min to allow early cell attachment, in accordance with the manufacturer's guidelines, they were locked in the RTCA DP device in the incubator and the impedance value of each well was automatically monitored by the xCELLigence system and expressed as a Cell Index value (CI). Water was added to the space surrounding the wells of the E-plate to avoid interference from evaporation. For proliferation assays, the cells were incubated during 120h for toxicity in growth medium (10% FBS) and CI was monitored every 15 min during the whole duration of the experiment. Four replicates of each conditions were used in each test. After an initial assessment of the concentration of cycloheximide which would be non-toxic to the ShWT1 cells, we used a test of proliferation in presence and absence of low doses of cycloheximide (1 pM to 100 pM) either prior to cell seeding or after an initial adhesion phase and at an early proliferative step (at 24-26 hours). All experiments were conducted over 240 hours. All plots were normalized to the Cell Index.

Acknowledgements

We gratefully thank the lipidomic platform of Bordeaux for lipid analysis on the yeast strains and J.J. Bessoule for helpful discussions, and to Emilia Kouroussis for English revisions.

Author contributions

D.T.-T., J.-P.L., M.d.T.d.T. F.G., E.S., R.K, M.B. and P.X. P. performed the experiments; D.T.-T., J.-P.L., J.-P.d.R., M.d.T.d.T. R. K, and E.T. analyzed the data; M.L.G. statistically analyzed the data of Fig. 2; D.T.-T., J.-P.L. designed the research; D.T.-T., J.-P.L. and J.-P.d.R wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Funding

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM) to J.-P.dR and D.-T.T., and P.X.P, the Barth Syndrome Foundation (BSF), Association Barth France to D.T.-T and the Association contre les Maladies Mitochondriales (AMMI) to D.T.-T. M.d.T.d.T. was supported by a PhD fellowship from the French Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

References

1. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ, Sobotka-Plojhar MA (1983) An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci* **62**: 327-55
2. Barth PG, Valianpour F, Bowen VM, Lam J, Duran M, Vaz FM, Wanders RJ (2004) X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): an update. *Am J Med Genet A* **126A**: 349-54
3. Bolhuis PA, Hensels GW, Hulsebos TJ, Baas F, Barth PG (1991) Mapping of the locus for X-linked cardioskeletal myopathy with neutropenia and abnormal mitochondria (Barth syndrome) to Xq28. *American journal of human genetics* **48**: 481-5
4. Hoch FL (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta* **1113**: 71-133
5. Schlame M, Haldar D (1993) Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **268**: 74-9
6. Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* **39**: 257-88

7. Ikon N, Su B, Hsu FF, Forte TM, Ryan RO (2015) Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **464**: 580-5
8. Bligny R, Douce R (1980) A precise localization of cardiolipin in plant cells. *Biochim Biophys Acta* **617**: 254-63
9. Hostetler KY, van den Bosch H, van Deenen LL (1972) The mechanism of cardiolipin biosynthesis in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **260**: 507-13
10. Joshi AS, Zhou J, Gohil VM, Chen S, Greenberg ML (2009) Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 212-8
11. Bazan S, Mileykovskaya E, Mallampalli VK, Heacock P, Sparagna GC, Dowhan W (2013) Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J Biol Chem* **288**: 401-11
12. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **278**: 52873-80
13. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **277**: 43553-6
14. Joshi AS, Thompson MN, Fei N, Huttemann M, Greenberg ML (2012) Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **287**: 17589-97
15. Ban T, Heymann JA, Song Z, Hinshaw JE, Chan DC (2010) OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* **19**: 2113-22
16. DeVay RM, Dominguez-Ramirez L, Lackner LL, Hoppins S, Stahlberg H, Nunnari J (2009) Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* **186**: 793-803
17. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* **275**: 22387-94
18. Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, Mooga VP, Stroud DA, Kulkarni G, Wenk MR, *et al.* (2009) Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Current biology : CB* **19**: 2133-9
19. Patil VA, Fox JL, Gohil VM, Winge DR, Greenberg ML (2013) Loss of cardiolipin leads to perturbation of mitochondrial and cellular iron homeostasis. *The Journal of biological chemistry* **288**: 1696-705
20. Chu CT, Bayir H, Kagan VE (2014) LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy* **10**: 376-8
21. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, Tyurin VA, Yanamala N, Shrivastava IH, Mohammadyani D, *et al.* (2013) Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**: 1197-205
22. Hsu P, Liu X, Zhang J, Wang HG, Ye JM, Shi Y (2015) Cardiolipin remodeling by TAZ/tafazzin is selectively required for the initiation of mitophagy. *Autophagy* **11**: 643-52
23. Li XX, Tsoi B, Li YF, Kurihara H, He RR (2015) Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J Histochem Cytochem* **63**: 301-11
24. Gonzalez F, D'Aurelio M, Boutant M, Moustapha A, Puech JP, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Vial G, Taleux N, Slomianny C, *et al.* (2013) Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in

- cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim Biophys Acta* **1832**: 1194-206
25. Heit B, Yeung T, Grinstein S (2011) Changes in mitochondrial surface charge mediate recruitment of signaling molecules during apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**: C33-41
 26. Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinowich H, Amoscato AA, Yin XM (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell* **15**: 3061-72
 27. Manganelli V, Capozzi A, Recalchi S, Signore M, Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Degli Esposti M, Sorice M (2015) Altered Traffic of Cardiolipin during Apoptosis: Exposure on the Cell Surface as a Trigger for "Antiphospholipid Antibodies". *J Immunol Res* **2015**: 847985
 28. McMillin JB, Dowhan W (2002) Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 97-107
 29. Koshkin V, Greenberg ML (2000) Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J* **347 Pt 3**: 687-91
 30. Koshkin V, Greenberg ML (2002) Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochem J* **364**: 317-22
 31. Kadenbach B, Mende P, Kolbe HV, Stipani I, Palmieri F (1982) The mitochondrial phosphate carrier has an essential requirement for cardiolipin. *FEBS Lett* **139**: 109-12
 32. Robinson NC (1993) Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 153-63
 33. Noel H, Pande SV (1986) An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. Lipid requirement of carnitine acylcarnitine translocase. *Eur J Biochem* **155**: 99-102
 34. Vaz FM, Houtkooper RH, Valianpour F, Barth PG, Wanders RJ (2003) Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism. *J Biol Chem* **278**: 43089-94
 35. Gu Z, Valianpour F, Chen S, Vaz FM, Hakkaart GA, Wanders RJ, Greenberg ML (2004) Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast taz1 mutant: a model for Barth syndrome. *Mol Microbiol* **51**: 149-58
 36. Brandner K, Mick DU, Frazier AE, Taylor RD, Meisinger C, Rehling P (2005) Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* **16**: 5202-14
 37. Neuwald AF (1997) Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency. *Curr Biol* **7**: R465-6
 38. Xu Y, Kelley RI, Blanck TJ, Schlame M (2003) Remodeling of cardiolipin by phospholipid transacylation. *J Biol Chem* **278**: 51380-5
 39. Testet E, Laroche-Traineau J, Noubhani A, Coulon D, Bunoust O, Camougrand N, Manon S, Lessire R, Bessoule JJ (2005) Ypr140wp, 'the yeast tafazzin', displays a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochem J* **387**: 617-26
 40. Ren M, Phoon CK, Schlame M (2014) Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog Lipid Res* **55**: 1-16
 41. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, *et al.* (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13207-12
 42. Gedeon AK, Wilson MJ, Colley AC, Sillence DO, Mulley JC (1995) X linked fatal infantile cardiomyopathy maps to Xq28 and is possibly allelic to Barth syndrome. *J Med Genet* **32**: 383-8

43. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D (1996) A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* **12**: 385-9
44. Ades LC, Gedeon AK, Wilson MJ, Latham M, Partington MW, Mulley JC, Nelson J, Lui K, Sillence DO (1993) Barth syndrome: clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. *Am J Med Genet* **45**: 327-34
45. Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJ, Barth PG (2000) Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 378-82
46. Schlame M, Kelley RI, Feigenbaum A, Towbin JA, Heerdt PM, Schieble T, Wanders RJ, DiMauro S, Blanck TJ (2003) Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome. *J Am Coll Cardiol* **42**: 1994-9
47. Valianpour F, Mitsakos V, Schlemmer D, Towbin JA, Taylor JM, Ekert PG, Thorburn DR, Munnich A, Wanders RJ, Barth PG, *et al.* (2005) Monolysocardiolipins accumulate in Barth syndrome but do not lead to enhanced apoptosis. *J Lipid Res* **46**: 1182-95
48. Ferri L, Donati MA, Funghini S, Malvagia S, Catarzi S, Lugli L, Ragni L, Bertini E, Vaz FM, Cooper DN, *et al.* (2013) New clinical and molecular insights on Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **8**: 27
49. Gonzalez F, Gottlieb E (2007) Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* **12**: 877-85
50. Dudek J, Cheng IF, Balleininger M, Vaz FM, Streckfuss-Bomeke K, Hubscher D, Vukotic M, Wanders RJ, Rehling P, Guan K (2013) Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res* **11**: 806-19
51. Xu Y, Sutachan JJ, Plesken H, Kelley RI, Schlame M (2005) Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab Invest* **85**: 823-30
52. Steinmetz LM, Scharfe C, Deutschbauer AM, Mokranjac D, Herman ZS, Jones T, Chu AM, Giaever G, Prokisch H, Oefner PJ, *et al.* (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* **31**: 400-4
53. Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**: 1543-54
54. Prokisch H, Scharfe C, Camp DG, 2nd, Xiao W, David L, Andreoli C, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Kozany C, *et al.* (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* **2**: e160
55. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, *et al.* (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**: 112-23
56. Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY (2013) Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* **339**: 1328-31
57. Bonnefoy N, Fox TD (2001) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* **65**: 381-96
58. Tzagoloff A, Dieckmann CL (1990) PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **54**: 211-25
59. Baile MG, Claypool SM (2013) The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**: 241-78
60. Lasserre JP, Dautant A, Aiyar RS, Kucharczyk R, Glatigny A, Tribouillard-Tanvier D, Rytka J, Blondel M, Skoczen N, Reynier P, *et al.* (2015) Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease models & mechanisms* **8**: 509-526

61. Couplan E, Aiyar RS, Kucharczyk R, Kabala A, Ezkurdia N, Gagneur J, St Onge RP, Salin B, Soubigou F, Le Cann M, *et al.* (2011) A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 11989-94
62. Ostojic J, Panozzo C, Lasserre JP, Nouet C, Courtin F, Blancard C, di Rago JP, Dujardin G (2013) The energetic state of mitochondria modulates complex III biogenesis through the ATP-dependent activity of Bcs1. *Cell Metab* **18**: 567-77
63. de Taffin de Tilques M, Tribouillard-Tanvier D, Tetaud E, Testet E, di Rago JP, Lasserre JP (2017) Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome. *Disease models & mechanisms* **10**: 439-450
64. Aiyar RS, Bohnert M, Duvezin-Caubet S, Voisset C, Gagneur J, Fritsch ES, Couplan E, von der Malsburg K, Funaya C, Soubigou F, *et al.* (2014) Mitochondrial protein sorting as a therapeutic target for ATP synthase disorders. *Nature communications* **5**: 5585
65. Baile MG, Sathappa M, Lu YW, Pryce E, Whited K, McCaffery JM, Han X, Alder NN, Claypool SM (2014) Unremodeled and remodeled cardiolipin are functionally indistinguishable in yeast. *The Journal of biological chemistry* **289**: 1768-78
66. Wang X, Zuo X, Kucejova B, Chen XJ (2008) Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nat Cell Biol* **10**: 1090-7
67. Lebreton A, Saveanu C, Decourty L, Rain JC, Jacquier A, Fromont-Racine M (2006) A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol* **173**: 349-60
68. Sauerwald J, Jores T, Eisenberg-Bord M, Chuartzman SG, Schuldiner M, Rapaport D (2015) Genome-Wide Screens in *Saccharomyces cerevisiae* Highlight a Role for Cardiolipin in Biogenesis of Mitochondrial Outer Membrane Multispan Proteins. *Molecular and cellular biology* **35**: 3200-11
69. Chen S, He Q, Greenberg ML (2008) Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Molecular microbiology* **68**: 1061-72
70. Acehan D, Xu Y, Stokes DL, Schlame M (2007) Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab Invest* **87**: 40-8
71. Wang X, Chen XJ (2015) A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* **524**: 481-4
72. Wang X, Zuo X, Kucejova B, Chen XJ (2008) Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nature cell biology*
73. Wrobel L, Topf U, Bragoszewski P, Wiese S, Sztolsztener ME, Oeljeklaus S, Varabyova A, Lirski M, Chrosicki P, Mroczek S, *et al.* (2015) Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* **524**: 485-8
74. Kim HE, Grant AR, Simic MS, Kohnz RA, Nomura DK, Durieux J, Riera CE, Sanchez M, Kapernick E, Wolff S, *et al.* (2016) Lipid Biosynthesis Coordinates a Mitochondrial-to-Cytosolic Stress Response. *Cell* **166**: 1539-1552 e16
75. Johnson SC, Yanos ME, Kayser EB, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, Uhde L, Hui J, Wall VZ, Gagnidze A, *et al.* (2013) mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* **342**: 1524-8
76. Zheng X, Boyer L, Jin M, Kim Y, Fan W, Bardy C, Berggren T, Evans RM, Gage FH, Hunter T (2016) Alleviation of neuronal energy deficiency by mTOR inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *eLife* **5**
77. Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-61

78. Guerin B, Labbe P, Somlo M (1979) Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* **55**: 149-59
79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**: 265-75
80. Rigoulet M, Guerin B (1979) Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS letters* **102**: 18-22
81. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et biophysica acta* **850**: 436-48
82. Rak M, Tetaud E, Godard F, Sagot I, Salin B, Duvezin-Caubet S, Slonimski PP, Rytka J, di Rago JP (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *The Journal of biological chemistry* **282**: 10853-64
83. Schagger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223-31
84. Arselin G, Vaillier J, Graves PV, Velours J (1996) ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *The Journal of biological chemistry* **271**: 20284-90
85. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J (2009) Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**: 1845-55
86. Vitiello F, Zanetta JP (1978) Thin-layer chromatography of phospholipids. *J Chromatogr* **166**: 637-40
87. Gonzalvez F, Schug ZT, Houtkooper RH, MacKenzie ED, Brooks DG, Wanders RJ, Petit PX, Vaz FM, Gottlieb E (2008) Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *The Journal of cell biology* **183**: 681-96

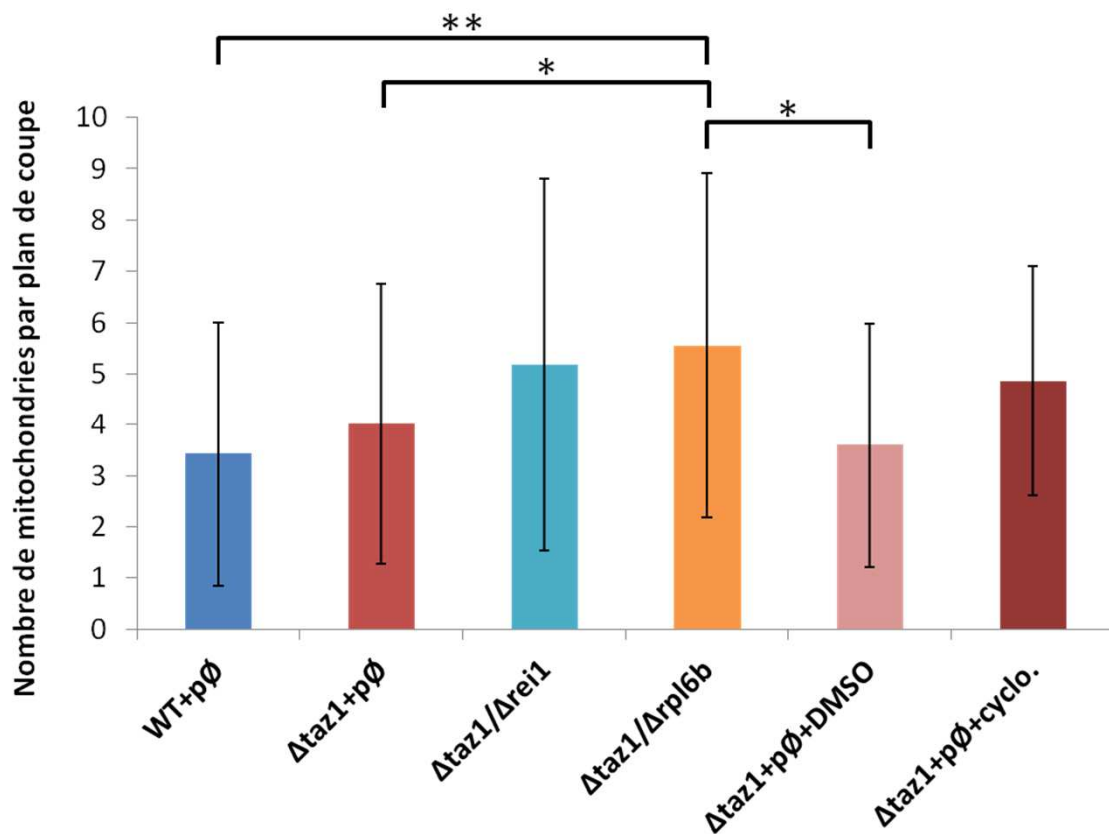


Figure 48 : Comptage de mitochondries en Microscopie Electronique à Transmission. Afin d'avoir un comptage homogène d'une souche à l'autre, seules les coupes présentant à la fois le noyau et la vacuole sont prises en compte. Test de Tukey *p < 0.05, **p < 0.01

III. Résultats complémentaires

III.1. Comptage des mitochondries par microscopie électronique à transmission

Le nombre de mitochondries par section contenant à la fois le noyau et la vacuole a été compté en microscopie électronique à transmission. Comme dit précédemment pour les résultats obtenus dans la partie concernant la surexpression de la protéine Odc1p, du fait du petit nombre de mitochondries par coupe, les écarts types sont élevés. Pour cette raison, et bien qu'une légère augmentation du nombre moyen de mitochondries soit observé dans les souches $\Delta taz1+p\emptyset$ (4 mitochondries), $\Delta taz1+p\emptyset$ avec cycloheximide (4,9 mitochondries) et $\Delta taz1/\Delta rei1$ (5,2 mitochondries) par rapport à la souche sauvage WT+p \emptyset (3,4 mitochondries), cette augmentation n'est pas statistique (Fig. 48). En revanche, l'augmentation observée pour la souche double mutante $\Delta taz1/\Delta rpl6b$ est statistique (5,5 mitochondries). Bien que cette augmentation ne soit statistique que pour la souche double mutante $\Delta taz1/\Delta rpl6b$, elle semble malgré tout représentative d'un phénomène physiologique puisqu'elle est observée pour les trois souches dans lesquelles une diminution de la synthèse protéique cytosolique a été induite. Une diminution de la synthèse protéique cytosolique semblerait donc induire une légère augmentation de la quantité de mitochondries.

Ni la morphologie générale des mitochondries, ni celle des crêtes ne semblent être affectées (non montré) dans aucune des souches, comme nous en avons discuté précédemment dans le premier article.

III.2 Suivi de la biogénèse mitochondriale

Comme présenté dans la partie concernant le premier article, nous avons suivi la biogénèse mitochondriale. Pour rappel, cette technique utilise un plasmide portant un gène de fusion entre le gène *SDH3*, codant une sous-unité du complexe II de la chaîne respiratoire, et le gène *LACZ*, codant pour la β -galactosidase (Daignan-Fornier *et al.*, 1994). L'expression du gène de fusion est sous le contrôle du promoteur du gène *SDH3*, ainsi l'activité β -galactosidase est dépendante de l'induction du gène *SDH3* et est donc proportionnelle à la biogénèse mitochondriale. Ces résultats sont issus de deux expériences

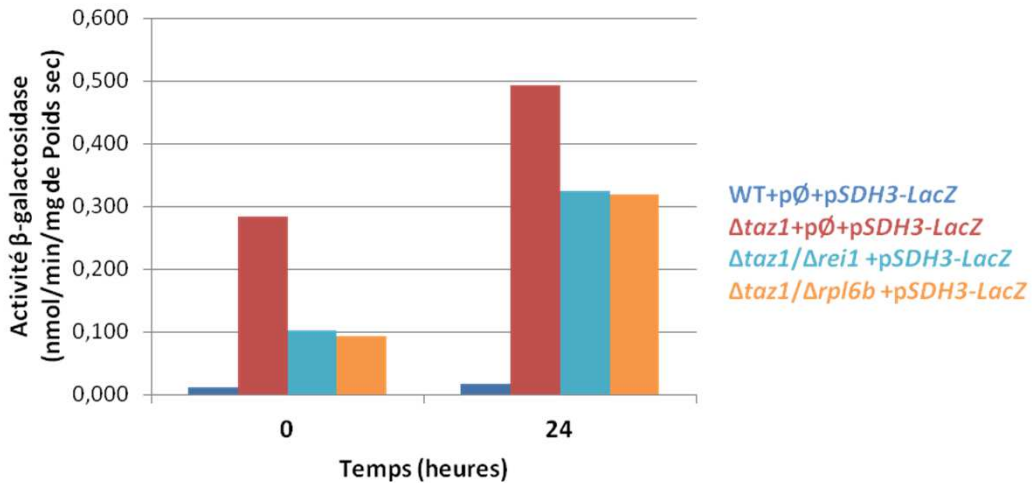


Figure 49 : Suivi de la biogénèse mitochondriale. La biogénèse mitochondriale est suivie par l'activité β -galactosidase portée par un plasmide contenant la protéine de fusion du gène *SDH3-lac z*.

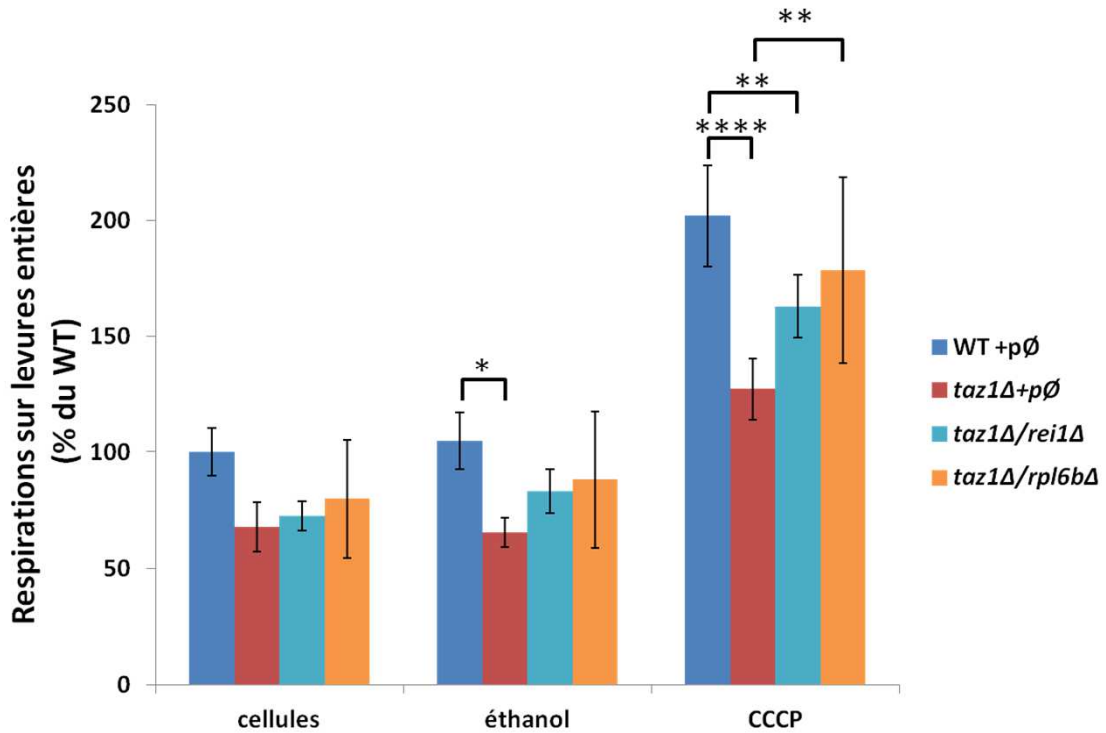


Figure 50 : Respirations sur cellules entières. La consommation d' O_2 d'1 UDO de levures a été suivie à l'aide d'une électrode de Clark en présence de 10 μ L d'éthanol puis 10 μ L de CCCP 1M dans un volume final de 1,2 mL de milieu de culture CSM+0,5% galactose. Test de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

indépendantes (Fig. 49), une troisième sera réalisée pour confirmer statistiquement ces résultats. Comme vu précédemment, les résultats montrent que l'activité β -galactosidase est élevée dans le mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ dès le temps 0 (presque 30 fois supérieures à l'activité de la souche WT+p \emptyset). Concernant l'activité β -galactosidase dans les souches doubles mutantes $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$, bien qu'inférieure à celle de la souche du mutant $\Delta taz1+p\emptyset$, est largement supérieure à celle de la souche du WT+p \emptyset . Bien que non statistiques, ces données semblent donc montrer que pour sauver la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$ par une diminution de la synthèse protéique cytosolique, il est nécessaire d'avoir une biogénèse mitochondriale accrue par rapport à la souche sauvage WT+p \emptyset , mais plus faible que celle présente dans la souche mutante $\Delta taz1+p\emptyset$.

III.3. Respiration sur cellules entières

En parallèle de la respiration sur mitochondries isolées, des mesures de respiration sur cellules entières ont été effectuées (Fig. 50). Comme décrit précédemment, ces mesures sont réalisées avec les cellules seules, ou en présence d'éthanol ou avec un agent découplant tel que le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone). Afin de vérifier que la respiration cellulaire soit bien réalisée par la chaîne respiratoire, de l'antimycine A est ajoutée à la fin de l'expérience.

III.3.1. Restauration de la respiration par les doubles délétions $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$

Comme nous l'avons vu dans l'article II (Fig. 44C), la respiration sur mitochondries isolées est significativement accrue par les délétions des gènes *REI1* et *RPL6B*. Cet effet semble se répercuter à l'échelle de la cellule entière puisque la respiration cellulaire est aussi augmentée. Cependant, curieusement, alors que sur mitochondries isolées cette augmentation est statistiquement confirmée, elle ne l'est pas sur cellules entières. Cette augmentation semble tout de même représentative d'un effet physiologique puisqu'elle est retrouvée dans les deux souches mutantes $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$.

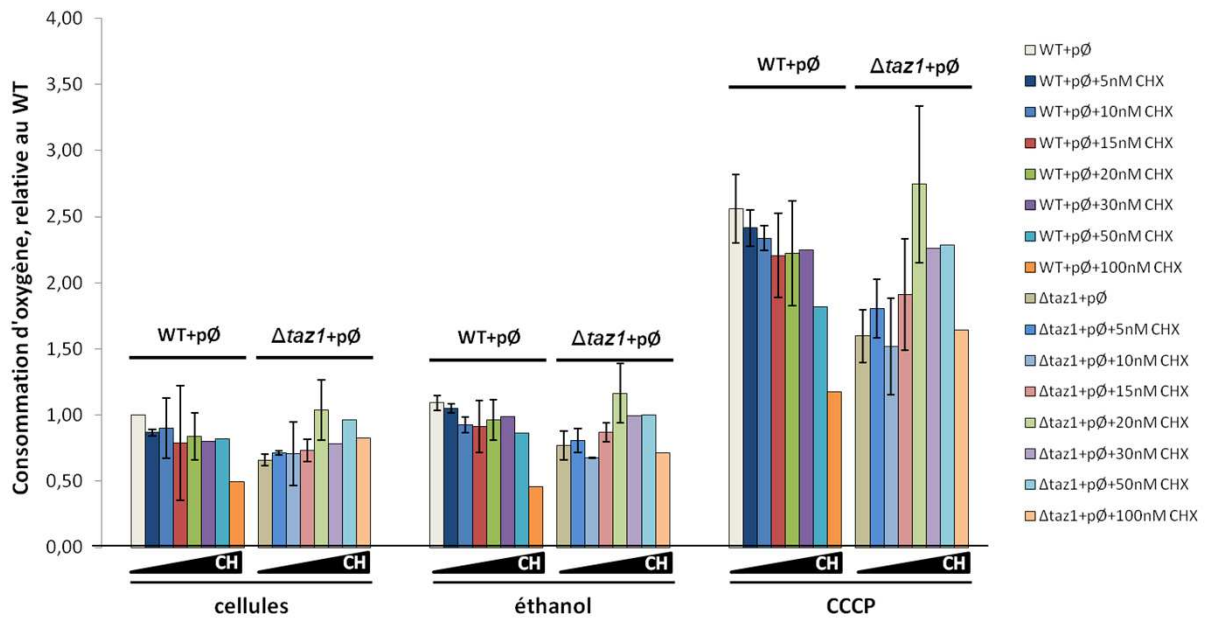


Figure 51 : Respirations sur cellules entières en présence de concentrations croissantes de cycloheximide (CH). La consommation d'O₂ d'1 UDO de levures a été suivie à l'aide d'une électrode de Clark en présence de 10μL d'éthanol puis 10μL de CCCP 1M dans un volume final de 1,2 mL de milieu de culture CSM+0,5% galactose. Les résultats sont issus d'au moins trois expériences indépendantes, sauf pour les hautes concentrations en CH (30, 50 et 100 nM) qui n'ont été réalisées qu'une fois.

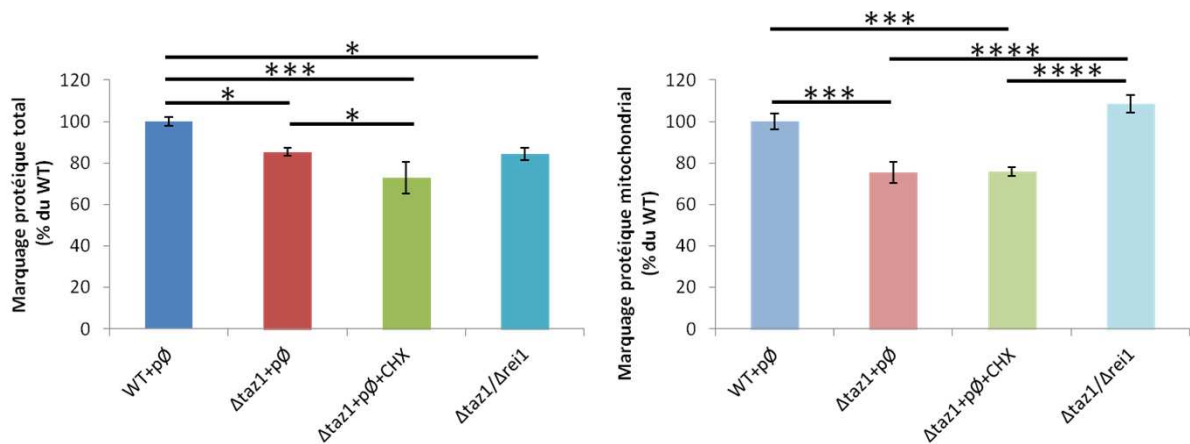


Figure 52 : Suivi de la synthèse protéique totale et mitochondriale par radiomarquage. Une UDO de cellules a été cultivée 20 minutes en présence de méthionine-³⁵S et de cystéine-³⁵S afin de suivre la synthèse protéique totale à travers l'incorporation de radioactivité (panel de gauche). La même expérience a été réalisée en présence de cycloheximide (777 μM) afin de bloquer totalement la synthèse protéique cytosolique et de suivre uniquement la synthèse protéique mitochondriale (panel de droite). Après marquage, des extraits protéiques totaux ont été préparés et séparés sur gel 12% de polyacrylamide (75 μg de protéines par puits). La radioactivité émise par les protéines a été analysée à l'aide d'un PhosphorImager et les images obtenues ont été analysées avec le logiciel ImageJ. Test de Tukey, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

III.3.2. Restauration de la respiration par la cycloheximide

La cycloheximide étant réputée pour être toxique, nous avons testé l'effet de différentes concentrations de cette molécule sur la respiration cellulaire des souches sauvages WT+pØ et mutantes $\Delta taz1+pØ$ (Fig. 51). Concernant la souche mutante $\Delta taz1+pØ$, bien que la corrélation ne soit pas parfaite, on peut voir une relation effet-dose entre la concentration de cycloheximide et le niveau de la respiration cellulaire mesurée. En effet, on voit que la respiration augmente entre les concentrations 0 et 20 nM, puis elle diminue avec les concentrations entre 20 et 100nM. On observe donc un effet optimal pour une concentration de 10-20 nM. Ces concentrations n'induisant qu'une très légère diminution de la respiration sur les cellules WT+pØ, aucune conséquence n'est observée sur la croissance (Fig. 42B). Les concentrations utilisées pour les autres expérimentations seront donc de 10-20 nM. A cette concentration, la respiration cellulaire de la souche mutante est équivalente à la respiration cellulaire mesurée à partir des cellules sauvages WT+pØ.

III.4. Suivi de la synthèse protéique cytosolique et mitochondriale par pulse

Les concentrations en cycloheximide utilisées dans cette étude (10-20 nM) sont largement inférieures à celles utilisées classiquement pour inhiber totalement la synthèse protéique cytosolique, qui sont d'environ 20 μ M. En effet, Wang *et al.* ont estimé, par pulse, que l'ajout de 20 μ M de cycloheximide sur une souche sauvage de levure entraîne une diminution de 90% de la synthèse protéique, alors qu'une concentration de 350 nM entraîne une diminution de 25% seulement de cette synthèse (Wang *et al.*, 2008).

Nous avons donc voulu estimer l'importance de la diminution de la synthèse protéique induite par la double mutation $\Delta taz1/\Delta rei1$ et par la cycloheximide (à 10-20 nM) dans nos conditions. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de pulse (Fig. 52). Brièvement, une UDO de chaque souche a été cultivée en présence d'un mélange de méthionine et cystéine radiomarquées au 35 S pendant 20 minutes. L'incorporation de radioactivité est donc proportionnelle à l'activité de synthèse protéique.

Les résultats montrent que la souche mutante $\Delta taz1+pØ$ présente naturellement une diminution de la synthèse protéique de 15% par rapport à celle du WT+pØ. Curieusement, alors que l'ajout de 20 nM de cycloheximide induit une diminution supplémentaire de la

synthèse protéique totale (diminution de 27% par rapport au sauvage), cet effet cumulatif n'est pas observé pour le double mutant $\Delta taz1/\Delta rei1$ (diminution de 16 % pour le double mutant vs WT et de 15 % pour le simple mutant $\Delta taz1+p\emptyset$ vs WT+p \emptyset). Wang *et al.* ont mesuré une diminution de synthèse protéique induite par la mutation $\Delta rei1$ de 40% par rapport au WT, mais le fond génétique et les conditions de pré-cultures des cellules étaient différents des nôtres (Wang *et al.*, 2008). Nous n'avons pas, pour le moment, d'explication à ce manque d'effet de la mutation $\Delta rei1$ et des expériences de pulse sur des cellules cultivées dans d'autres conditions sont envisagées pour voir si cela est dû aux conditions expérimentales.

Parallèlement, la synthèse protéique mitochondriale est, elle aussi, affectée dans les cellules mutantes $\Delta taz1+p\emptyset$ (-25% par rapport au sauvage WT+p \emptyset). Cette synthèse protéique mitochondriale est estimée en suivant l'incorporation de la méthionine radiomarquée dans des protéines de cellules cultivées en présence de fortes concentrations de cycloheximide, qui inhibent totalement la synthèse protéique cytosolique sans bloquer la synthèse protéique mitochondriale sur le temps court de l'expérience. Alors que la cycloheximide n'impacte pas la synthèse protéique mitochondriale, le double mutant $\Delta taz1/\Delta rei1$ montre une augmentation de cette synthèse qui dépasse même celle du sauvage WT+p \emptyset (+9 %). Cette augmentation de la traduction mitochondriale traduit un effet bénéfique de la mutation $\Delta rei1$.

IV. Discussion

Nous avons montré, dans ce deuxième papier, un effet bénéfique de la diminution de la synthèse protéique cytosolique par une approche pharmacologique avec des inhibiteurs de la traduction (cycloheximide, anisomycine et émétine), mais aussi par une approche génétique en délétant des gènes non essentiels impliqués dans la biogénèse des ribosomes (*REI1* et *RPL6B*). Cet effet ne passe pas par la correction du défaut primaire induit par la perte de la tafazzine, puisque le défaut en cardiolipines est toujours présent (Fig. 43). Cependant, une diminution légère de la synthèse protéique cytosolique permet de restaurer la chaîne respiratoire (Fig. 44 A et B), améliorant la respiration (Fig. 44C et D, Fig. 50 et 51) et

la synthèse d'ATP (Fig. 44E) à l'échelle mitochondriale. Grâce à cela, la croissance respiratoire des mutants $\Delta taz1+p\emptyset$ est améliorée (Fig. 42B et E).

De plus, dans cet article, l'effet positif de la CHX est aussi retrouvé sur des cellules HeLa. En effet, l'ajout d'une dose très faible de CHX (50 pM) améliore la croissance des cellules HeLa pour lesquelles la production de la tafazzine est diminuée par shARN (Fig. 47).

Mais à ce jour, nous n'avons pas encore identifié précisément le mécanisme moléculaire permettant ce sauvetage. Le nombre de mitochondries augmenté par l'ajout de cycloheximide ou par les mutations $\Delta rei1$ et $\Delta rpl6b$ chez la levure, ainsi que le long temps de latence observé en présence de cycloheximide sur les cellules HeLa $\Delta taz1$ avant leur prolifération, suggèrent que cet effet passe par une adaptation métabolique. En outre, la cycloheximide et les doubles mutants ayant en commun de réduire la synthèse protéique cytosolique, une explication plausible de leur effet bénéfique serait que la mutation $\Delta taz1$ aboutisse à une accumulation toxique de protéines mitochondriales dans le cytosol. C'est ce que l'on appelle le stress protéostatique. De plus en plus d'études montrent que des dysfonctions mitochondriales induisent ce type de stress (d'Amico *et al.*, 2017).

IV.1. Qu'est-ce que le stress protéostatique ?

Ce concept de protéostasie est assez récent et recouvre les différents processus par lesquels la cellule maintient l'homéostasie protéique, c'est-à-dire l'équilibre entre synthèse, repliement et dégradation. Des stress induits au niveau de la mitochondrie, tels qu'une perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale, une diminution du potentiel membranaire, des dysfonctions métaboliques... peuvent engendrer une dérégulation de la protéostasie, créant un « stress protéostatique ». L'absence de tafazzine induisant un défaut en CL, pourrait engendrer des changements au niveau de la membrane mitochondriale du mutant $\Delta taz1$ qui pourrait en conséquence induire ce stress.

Pour faire face à de tels stress, différentes études ont mis en évidence des mécanismes de réponse, qui nécessitent une communication fine entre la mitochondrie et le noyau. Ces réponses passent principalement par une diminution de la synthèse protéique, dont l'effet bénéfique passe probablement par une diminution de l'accumulation de protéines mal importées ou mal conformées et par une économie énergétique, puisque la

synthèse protéique consommerait 75% des réserves énergétiques de la cellule (Lane & Martin, 2010).

IV.1.1. La réponse UPR^{mt}

Parmi les réponses à un stress protéostatique, on retrouve par exemple la réponse UPR^{mt} (*mitochondrial Unfolded Protein Response*), qui a été particulièrement caractérisée chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, mais est retrouvée chez tous les eucaryotes supérieurs, depuis *Arabidopsis thaliana* jusqu'à l'Homme en passant par *Drosophila melanogaster*. Différents facteurs peuvent induire ce stress, notamment un déséquilibre stœchiométrique entre les sous-unités de la chaîne respiratoire codées par le génome nucléaire et par le génome mitochondrial. En réponse, le facteur de transcription ATFS-1 va être relocalisé de la matrice mitochondriale au noyau, où il va activer la transcription de chaperonnes et de protéases, et la synthèse protéique cytosolique va être diminuée (Jovaisaite *et al.*, 2014).

IV.1.2. Les réponses à un stress protéostatique chez la levure

Des réponses semblables à la réponse UPR^{mt} ont été décrites chez la levure. En 2015, Wang et Chen ont décrit une adaptation du métabolisme cytosolique pour faire face à un stress qu'ils ont nommé « mPOS » (*mitochondrial Precursor Over-Accumulation Stress*), induit par une mutation dans le gène *AAC2* (transporteur ADP/ATP). La même année, Wrobel *et al.* ont caractérisé une réponse, présentant des similitudes avec la réponse au mPOS, pour un mutant du complexe MIA (*Mitochondrial Intermembrane-space Assembly machinery*), complexe impliqué dans l'import de protéines dans l'espace intermembranaire. Ils ont baptisé cette réponse « UPR^{am} » pour «*Unfolded Protein Response activated by protein mistargeting* ». Ces réponses agissent toutes deux en diminuant la synthèse protéique cytosolique et en activant le protéasome.

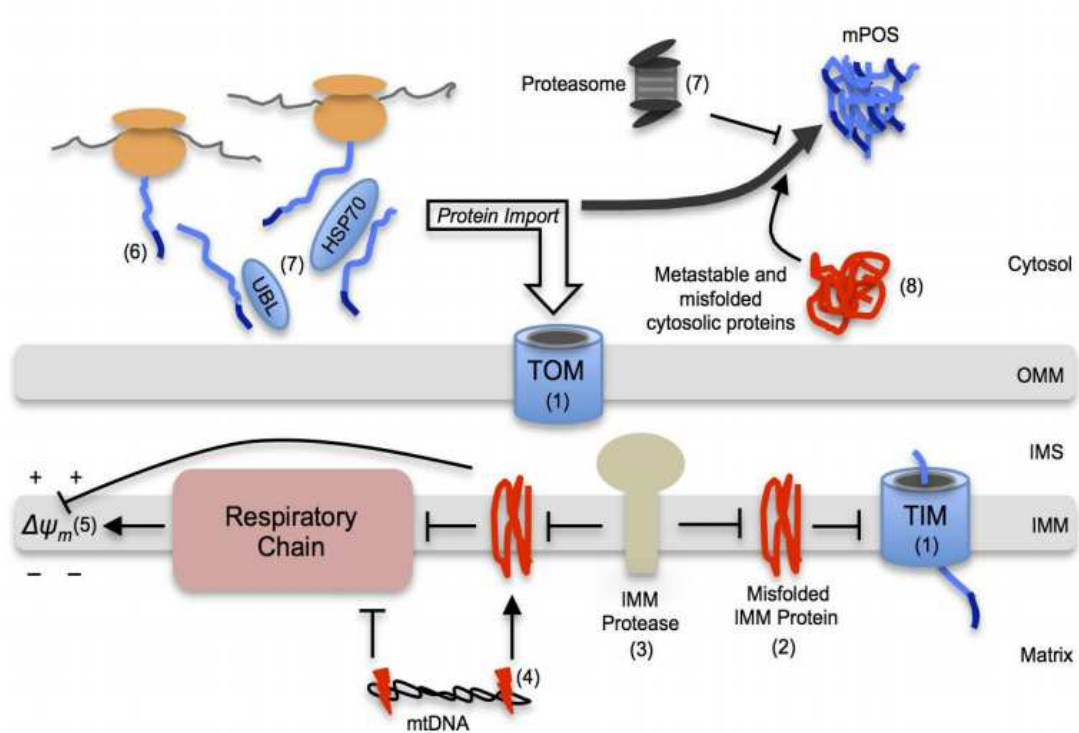


Figure 53 : Différents défauts peuvent induire un stress mPOS : (1) des mutations affectant des protéines impliquées dans la machinerie d'import des protéines (TIM,TOM,...) ,(2) un mauvais repliement des protéines de la membrane mitochondriale interne (IMM), (3) des défaillances du système de contrôle qualité de la IMM, qui peuvent être dues à des mutations de protéases (Yme1p...), (4) des mutations de l'ADNmt qui altèrent la chaîne respiratoire (CR), induisant alors une diminution du potentiel membranaire ($\Delta\psi_m$). Tout ceci conduit à un mauvais repliement des protéines du fait d'un déséquilibre entre les sous-unités de la CR codées par le noyau et celles codées par la mitochondrie. (5) une diminution du $\Delta\psi_m$ causée par diminution de la respiration ou une fuite de protons , (6) des défauts dans l'adressage de protéines à la mitochondrie, notamment du fait de mutations dans les pré-séquences d'adressage, (7) des défauts de stabilité des protéines , notamment du fait de mutations de chaperonnes (HSP70) ou bien des défauts de dégradation des protéines mal conformées, notamment par le protéasome, (8) une accumulation de protéines dans le cytosol ou au niveau de la membrane mitochondriale externe (OMM) (d'après Coyne & Chen, 2017)

IV.1.2.1. Réponse au Stress mPOS

Le stress mPOS est induit par une accumulation dans le cytosol de protéines précurseurs mal importées à la mitochondrie (Fig. 53). Cette accumulation n'est pas observée seulement suite à des défauts de la machinerie d'import (délétion des gènes codant pour les sous-unités Tom70 et Mgr2 des complexes TOM et TIM), mais aussi suite à d'autres altérations de la mitochondrie : mutation du gène *AAC2*, délétion du gène codant pour la protéase Yme1p, ou de celui codant pour la sous-unité 1 de l'ATP synthase par exemple (Wang & Chen, 2015). La mutation *aac2^{A128P}* induit une forte diminution de la synthèse protéique et la comparaison du protéome du mutant *aac2^{A128P}* avec celui du sauvage a mis en évidence une accumulation cytosolique de protéines mitochondriales codées au niveau du noyau et mal importées, comme le montre l'absence de clivage de la pré-séquence d'adressage à la mitochondrie. Malgré une diminution globale de la traduction, cette mutation induit la surexpression spécifique de gènes codants pour des chaperonnes, mais aussi des gènes impliqués dans la modulation de la biogénèse des ribosomes, dans la stabilité des ARNm et dans la traduction de gènes spécifiques. Le protéasome semble jouer aussi un rôle important dans la réponse à un stress protéostatique dans la mesure où la surexpression des gènes *POC4* et *UMP1*, impliqués dans l'assemblage et la maturation du protéasome, restaurent la croissance du mutant *aac2^{A128P}*. De plus, la délétion du gène *YME1*, qui induit elle aussi un stress protéostatique mais reste viable, montre un défaut de croissance synthétique lorsque la cellule est aussi mutée pour le gène *POC4*. Il est donc fort probable que la réponse au stress mPOS induise le protéasome et diminue la synthèse protéique cytosolique afin de rééquilibrer l'homéostasie cellulaire.

IV.1.2.2. Réponse UPR^{am}

La réponse UPR^{am}, décrite par Wrobel *et al.*, a été mise en évidence suite à l'étude d'un mutant du complexe MIA, *mia40-4int*. La protéine Mia40 est une protéine de la membrane mitochondriale interne qui interagit, grâce à des ponts disulfures, avec des précurseurs venant de traverser la membrane mitochondriale externe (Neupert & Herrmann, 2007). Mia40 favorise donc l'import et le repliement de protéines dans l'espace inter-membranaire. La mutation de Mia40 induit un défaut d'import des protéines de

l'espace inter-membranaire, ce qui induit un stress. En réponse, les transcrits des gènes impliqués dans la biogénèse des ribosomes cytosoliques (mais pas des mitoribosomes), ainsi que d'autres gènes impliqués dans la traduction sont diminués. Cela entraîne une diminution de la synthèse protéique cytosolique. En parallèle, les protéines Irc25 et Poc4, dont les produits s'hétérodimérisent pour former une chaperonne impliquée dans l'assemblage du protéasome, sont augmentées. Cela se traduit par une activité du protéasome accrue dans la souche *mia40-4int* par rapport à la souche contrôle. De plus, le découplage des membranes par le CCCP, qui induit une diminution du potentiel de membrane nécessaire à l'import de protéines à travers la membrane mitochondriale interne, induit les mêmes effets (C'est-à-dire la diminution de la synthèse protéique cytosolique). Plusieurs mutations du complexe TIM (*Translocator of the Inner Membrane*) ont aussi les mêmes effets. La réponse UPR^{am} semble donc être une réponse générale à des défauts d'import. Elle met en jeu deux processus complémentaires afin de rétablir la protéostasie cellulaire, premièrement la diminution de la synthèse protéique, qui permet sûrement de ne pas continuer à saturer le cytosol de protéines mal localisées, et deuxièmement, l'augmentation de l'activité du protéasome, qui va permettre de réduire l'accumulation de protéines en dégradant ces dernières.

En résumé, les défauts mitochondriaux sont souvent corrélés directement ou indirectement à un défaut d'import des protéines mitochondriales qui se traduit par un stress protéostatique. Face à ce problème d'accumulation de protéines mitochondriales dans le cytosol, la cellule met en place des réponses permettant de diminuer la synthèse protéique cytosolique et augmenter la dégradation de ces protéines par le protéasome.

IV.2. Un défaut en tafazzine induit-il un stress protéostatique ?

A ce jour, aucun stress protéostatique n'a été décrit en tant que tel dans les différents modèles du syndrome de Barth mais de nombreuses études suggèrent la présence de ce stress. Du fait de l'importance de la cardiolipine dans l'import des protéines (III.4.2.5.- Cardiolipines et import des protéines mitochondriales), tout nous porte à croire que le

mutant $\Delta taz1$ présente un défaut d'import protéique, induisant une accumulation de protéines mitochondriales dans le cytosol et induisant un stress protéostatique.

Des défauts d'import ont déjà été observés dans des cellules déficientes en tafazzine. En effet, les travaux de Gebert *et al.* ont mis en évidence un défaut d'assemblage de la sous-unité Tom20 du complexe TOM et un défaut d'import de certaines protéines à travers ce translocateur dans des mitochondries de levures $\Delta taz1$ et de lymphoblastes de patients BTHS (Gebert *et al.*, 2009).

La membrane mitochondriale interne pourrait aussi être impliquée dans ces problèmes d'import. Van der Laan *et al.* ont mis en évidence, chez la levure, une interaction entre le complexe TIM23^{SORT}, impliqué dans l'import de protéines qui seront insérées dans la MMI, et les complexes III et IV de la chaîne respiratoire. Cette association semble favoriser l'import des protéines dépendant du potentiel de membrane, généré justement par ces deux complexes (Van der Laan *et al.*, 2006). Dans notre modèle levure $\Delta taz1$, nous avons mis en évidence une diminution quantitative de sous-unités du complexe IV ainsi qu'un défaut d'assemblage en supercomplexes avec le complexe III (Fig. 44A et B). Ces défauts pourraient donc affecter l'assemblage avec TIM23^{SORT}, provoquant ainsi une diminution de l'import. De plus, cette même équipe a mis en évidence que l'enrichissement en CL des membranes de protéoliposomes favorise l'assemblage du complexe TIM23^{SORT}. Encore une fois, est-ce que la perte de la tafazzine n'est pas directement délétère pour ce complexe, et donc pour l'import des protéines (Van der Laan *et al.*, 2007)? Enfin, il est connu que l'import des protéines dans la matrice est ATP dépendant. En effet, la protéine Hsp70, qui fait partie du complexe PAM (*Presequence translocase-Associated Motor*), va tirer sur les protéines qui passent à travers le canal du complexe TIM23 afin de les amener dans la matrice, cette activité consomme de l'ATP (Neupert & Herrmann, 2007 # Chacinska *et al.*, 2009). Or, le mutant $\Delta taz1$ montre une synthèse d'ATP diminuée de 30%. Cette diminution de la quantité d'ATP disponible pourrait affecter l'import.

Plusieurs processus d'import de protéines sont donc potentiellement dysfonctionnels dans le mutant levure $\Delta taz1$ et des études d'import en collaboration avec Robert Saint-Onge (Department of Biochemistry, Stanford Genome Technology Center, Stanford University, USA) sont envisagées pour confirmer cette hypothèse.

Dans le cas où notre hypothèse de défaut d'import de protéines serait exacte, nous devrions avoir tout d'abord une accumulation de protéines précurseurs dans le cytosol, puis

la génération d'un stress protéostatique et enfin l'induction d'une réponse de type mPOS ou UPR^{am}. Quelle que soit la réponse (mPOS ou UPR^{am}), une diminution de la synthèse protéique cytosolique et une induction de l'activité protéasomale devraient être observées. Nous avons justement observé une diminution de 15% de la synthèse protéique cytosolique dans la souche $\Delta taz1$ (Fig. 52), qui pourrait correspondre à une réponse au stress protéostatique. Wrobel *et al.* ont montré que cette diminution de la synthèse protéique cytosolique pouvait s'expliquer par une diminution des transcrits des protéines ribosomales et de protéines impliquées dans la traduction. Cependant, ils n'ont pas observé de diminution de transcrits du mitoribosome. Alors pourquoi la synthèse protéique mitochondriale est-elle aussi diminuée dans le mutant $\Delta taz1$ (Fig. 52) ? Une possibilité est que les ressources en ATP ne sont pas suffisantes pour assurer pleinement ce processus énergétiquement gourmand. Une autre possibilité est qu'il y ait un défaut de traduction et/ou d'import des protéines codées au niveau du noyau et nécessaires pour la traduction mitochondriale.

Comme nous l'avons dit, en plus de la diminution de la traduction cytosolique, la réponse au stress protéostatique s'accompagne aussi d'une activation du protéasome. Nous n'avons pas encore mesuré cette activité mais ceci est envisagé.

IV.3. Bénéfices d'une diminution de la synthèse protéique cytosolique en cas de dysfonctions mitochondriales

Des effets bénéfiques de la cycloheximide grâce à sa capacité à inhiber l'apoptose, notamment dans des cœurs de rats perfusés soumis à une ischémie/re-perfusion ont été décrits depuis longtemps (Musat-Marcu *et al.*, 1999). Aujourd'hui, la cycloheximide est de plus en plus associée aussi à un effet bénéfique pour des cellules soumises à un stress mitochondrial.

Dans le cas où, comme nous le pensons, la mutation $\Delta taz1$ induit une accumulation de protéines dans le cytosol, l'intérêt de diminuer un peu plus la synthèse protéique cytosolique que ne le fait naturellement la réponse au stress protéostatique (mPOS ou UPR^{am}), prend tout son sens. En effet, en diminuant cette synthèse artificiellement avec la cycloheximide ou des mutations de gènes du ribosome ($\Delta rei1$ ou $\Delta rpl6b$), on accentue cette réponse, ce qui réduit encore plus la quantité de pré-protéines arrivant à la mitochondrie et

« désature » les systèmes d'import. De plus, la diminution de la synthèse protéique cytosolique permet une économie d'ATP, qui peut, par exemple, être utilisée par le protéasome, diminuant encore l'accumulation de protéines dans le cytosol.

L'effet bénéfique de la diminution de la synthèse protéique cytosolique suite à un stress mitochondrial a déjà été mis en évidence dans différents modèles.

Chez la levure par exemple, Wang *et al.* avaient déjà montré, dès 2008, que la diminution de la synthèse protéique, par la délétion des gènes *SCH9*, *REI1* et *RPL6B* ou par la cycloheximide, était bénéfique pour le mutant *aac2^{A128P}*. Ce mutant du transporteur ADP/ATP se caractérise notamment par une diminution du $\Delta\Psi$, une accumulation cytosolique de pré-protéines mitochondriales, un défaut de la chaîne respiratoire montré par une diminution de *Cox2p* et enfin par une propension accélérée à accumuler des mutations, conduisant à la génération de cellules filles formant des colonies *petites*. Tous ces paramètres sont efficacement rétablis par la délétion des gènes mentionnés ci-dessus. *SCH9* est l'orthologue du gène mammifère de la kinase S6, impliquée dans la voie mTOR pour réguler la biogénèse des ribosomes et l'initiation de la traduction. La protéine *Rei1p* est impliquée, quant à elle, dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome, et la protéine *Rpl6b* fait partie de la grande sous-unité du ribosome. Ces trois gènes sont donc impliqués dans la synthèse protéique cytosolique, qu'ils diminuent respectivement de 50, 40 et 25%, et leur effet bénéfique peut être mimé par la cycloheximide (350 nM) qui réduit, à cette dose, la synthèse protéique de 25% (Wang *et al.*, 2008).

La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), permet de remonter le niveau d'ATP dans des neurones différenciés à partir d'iPSC d'un patient du syndrome de Leigh (mutation du gène *ATP6*), cette mutation entraînant une diminution drastique de la synthèse d'ATP (Zheng *et al.*, 2016). Les auteurs ont montré que cet effet bénéfique passe par une diminution de la synthèse protéique cytosolique. En effet, la voie mTOR induit la phosphorylation de la kinase S6K, qui à son tour va phosphoryler la protéine ribosomale S6, de la sous-unité S40, induisant la traduction d'ARNm spécifiques de protéines ribosomales et de facteurs de la traduction. La voie mTOR favorise aussi la traduction en levant, par phosphorylation, l'inhibition exercée par la protéine 4E-BP1 sur le facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (Pallet *et al.*, 2006). Inhiber la voie mTOR par la rapamycine permet notamment de diminuer la synthèse protéique. Cet effet bénéfique de la rapamycine a été observé aussi dans un modèle murin du syndrome de Leigh, mais causé

cette fois par un knockout du gène *NDUFS4* (sous-unité du complexe I). La rapamycine, dans ce modèle, réduit la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, et donc la traduction, et permet de retarder l'apparition des symptômes, de diminuer les lésions au cerveau et d'augmenter la survie des souris mutantes (Johnson *et al.*, 2013).

Peng *et al.* ont essayé de décortiquer les mécanismes aboutissant à l'effet bénéfique de cette diminution de la synthèse protéique (Peng *et al.*, 2015). Pour cela, ils ont utilisé différents modèles en parallèle :

- des cellules humaines (fibroblastes, cellules HeLa et podocytes) dans lesquelles des défauts mitochondriaux ont été générés pharmacologiquement (inhibition du complexe I par la roténone, du complexe III par l'antimycine A et du complexe V par l'oligomycine), ou une lignée de fibroblastes mutants présentant des défauts des complexes I et III.
- un modèle murin *knockout* pour le gène *PDSS2*, impliqué dans la synthèse du coenzyme Q (ou ubiquinone).
- un modèle homozygote *Caenorhabditis elegans* *gas-1* (*fc21*), muté pour le gène homologue à celui codant, chez les mammifères, la protéine *Ndufs2*, une sous-unité du complexe I.

L'intérêt de cette étude est d'avoir été menée sur différents modèles, ce qui permet de mettre en évidence des réponses générales. Ils ont ainsi montré que l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine restaure la viabilité aussi bien pour les souris, que pour les cellules humaines et le nématode. Ils ont ensuite confirmé que cet effet bénéfique passe bien par l'inhibition de la synthèse protéique puisque la cycloheximide (CHX) restaure efficacement la viabilité, excepté pour le ver, ce qui reste encore inexpliqué. De façon très intéressante, les auteurs ont mis en évidence que l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide dans des podocytes traités avec une faible concentration de CHX (3,6 μ M) semble protéine spécifique. En effet, certaines protéines sont diminuées par l'action de la CHX, alors que d'autres protéines bien spécifiques sont augmentées. La modulation ciblée de ces protéines joue probablement un rôle capital dans l'effet bénéfique de la CHX. Cet effet se joue peut-être au niveau transcriptionnel puisqu'il est connu depuis longtemps que la cycloheximide à faible dose est capable d'induire spécifiquement la transcription de certains gènes (Furukawa *et al.*, 1997). Cet effet assez spécifique a d'ailleurs été montré par Peng *et al.* à travers l'analyse du transcriptome du ver *gas-1* (*fc21*) en présence de cycloheximide ou de

rapamycine. Certaines catégories d'ARNm sont spécifiquement sur-représentées (ARNm impliqués dans la réplication de l'ADN, dans la dégradation des ARNs...), alors que d'autres sont sous-représentées (ARNm impliqués dans le métabolisme des acides gras, l'autophagie...). Plusieurs ARNm de protéines impliquées dans l'autophagie (ATG8, 13 et 16 notamment) sont diminués, ce qui va dans le sens d'une autre de leurs observations : la CHX empêche l'activation de l'autophagie dans des podocytes traités à la roténone. De plus, la 3-méthyladénine, qui bloque la voie d'induction de l'autophagie PI3 kinase/AKT/mTOR restaure la survie de cellules traitées à la roténone. Ce blocage de l'autophagie explique probablement en partie l'augmentation de la masse mitochondriale observée dans les podocytes traités à la roténone et à la cycloheximide ainsi que dans les vers traités eux aussi à la CHX. Ceci va dans le sens de nos résultats qui montrent que la diminution de la synthèse protéique par la cycloheximide et les mutations de *REI1* et *RPL6B* induit une légère augmentation du nombre de mitochondries.

Dans des fibroblastes de patients présentant des dysfonctions des complexes I et III, ainsi que dans des podocytes traités à la roténone, la CHX entraîne une réduction de la production d'anions superoxydes. Les résultats obtenus avec le modèle $\Delta taz1$ vont dans ce sens puisque nous avons montré une réduction de la production de ROS pour la souche $\Delta taz1$ traitée à la CHX et les doubles mutants $\Delta taz1/\Delta rei1$ et $\Delta taz1/\Delta rpl6b$ (Fig. 46).

Enfin, ces mêmes auteurs (Peng *et al.*, 2015) ont montré que l'ajout de chloramphénicol, qui bloque la synthèse protéique mitochondriale, inhibe partiellement l'effet positif de la cycloheximide sur la viabilité de cellules traitées à la roténone. Ceci suggère l'importance de la traduction mitochondriale dans ce sauvetage. Conformément à cela, nous avons observé dans la souche $\Delta taz1/\Delta rei1$, une augmentation de 30% de la synthèse protéique mitochondriale par rapport au mutant, remontant la synthèse mitochondriale à un niveau supérieur à celle du WT (Fig. 52). Cette augmentation de la traduction mitochondriale n'a pas été observée dans le mutant traité à la cycloheximide. L'absence de l'effet de la CHX pourrait s'expliquer par le fait que les pulses ont été réalisés au moment où l'effet de la cycloheximide commençait à peine à se traduire par une augmentation de la prolifération. Nous pensons donc que tous les changements métaboliques induits par cette drogue n'étaient pas encore en place. Nous pensons que la restauration de la synthèse protéique mitochondriale nécessite un certain nombre d'étapes préliminaires, notamment une diminution de l'accumulation des protéines cytosoliques qui

saturation des systèmes d'import et empêchent l'entrée de protéines codées par l'ADNn qui sont essentielles pour la traduction mitochondriale. Cette augmentation de la traduction mitochondriale explique probablement en partie la restauration de la chaîne respiratoire que nous observons. En Western blot, cette augmentation de la traduction mitochondriale se traduit par une augmentation de protéines codées par l'ADNmt, telle que celle observée pour Cox2p. D'après Herrmann et al., la traduction de la plupart des protéines codées par le génome mitochondrial est inhibée si ces protéines ne peuvent pas s'assembler correctement après leur synthèse (Herrmann *et al.*, 2013). L'augmentation de l'abondance de la protéine Cox2p observée n'est donc possible que si cette dernière a pu s'assembler correctement avec ces partenaires codés par l'ADNn. Ceci semble être le cas, puisque l'assemblage des super-complexes est lui aussi amélioré. Ceci implique donc un meilleur import des protéines mitochondriales codées par l'ADNn. Cette amélioration de l'import pourrait s'expliquer par une diminution de la saturation des transporteurs, mais aussi par une utilisation de l'ATP économisée sur la synthèse protéique cytosolique diminuée.

La diminution de la synthèse protéique cytosolique semble donc restaurer la stoechiométrie entre protéines mitochondriales codées par l'ADNmt et l'ADNn. Grâce à cela, la chaîne respiratoire est de nouveau fonctionnelle, ce qui restaure la respiration, la production d'ATP par les OXPHOS et réduit aussi la production de ROS.

La bibliographie et nos résultats permettent de tracer les grandes lignes du sauvetage par la CHX ou par les mutations $\Delta rei1$ et $\Delta rpl6b$, mais les mécanismes moléculaires précis mis en jeu restent à définir. Par ailleurs, la CHX et les doubles mutants induisent les mêmes réponses, montrant l'effet bénéfique d'une diminution de la synthèse protéique cytosolique, mais est-ce par les mêmes voies ?

IV.4. Toxicité de la cycloheximide

Du fait de la réputation de forte toxicité de la cycloheximide, il est important d'insister sur le fait que, dans nos conditions d'utilisation, les doses utilisées sont extrêmement faibles et ne présentent pas ou peu de toxicité. Dans les protocoles de marquage protéique mitochondrial ou de suivi de la dégradation protéique, l'inhibition de la synthèse protéique cytosolique se fait avec des concentrations en CHX autour de 800 μ M

(Buchanan *et al.*, 2016). L'effet bénéfique de la CHX sur notre modèle levure $\Delta taz1$ est optimal pour des concentrations comprises entre 10 et 20 nM, soit 40 000 fois moins concentré. Nous pensons que la diminution de la synthèse protéique cytosolique par la cycloheximide ou les doubles mutations s'ajoute à celle induite naturellement par la réponse au stress protéostatique. Cet effet cumulatif permet de passer sous un « seuil de synthèse protéique cytosolique » qui pourrait permettre une réponse métabolique plus efficace que la seule réponse au stress. Dans notre modèle levure $\Delta taz1$, la synthèse protéique n'est réduite que de 15% par rapport à la souche sauvage, ce qui ne semble pas suffisant pour restaurer un fonctionnement normal de la cellule mutante. L'ajout de CHX permet de diminuer cette synthèse protéique cytosolique de 12% supplémentaires permettant une amélioration significative de la croissance. A cette même concentration en CHX, la souche WT n'est pas ou très peu affectée, ce qui traduit l'absence d'une réelle toxicité.

Plusieurs travaux relativement anciens ont montré que la cycloheximide possède un effet neuroprotecteur, et Furukawa *et al.* ont précisé que cet effet n'a lieu que dans une fenêtre de concentrations bien précises, dans laquelle la CHX induit la transcription de gènes bien précis (par exemple le gène Bcl2 qui, en plus de son rôle anti-apoptotique semble avoir un rôle anti-oxydant Kane *et al.*, 1993) alors que son effet sur la traduction est mineur (diminution d'environ 30%). La concentration de CHX utilisée doit donc être faible, non seulement pour ne pas induire de toxicité, mais aussi pour permettre cette activation de la transcription qui permet sans doute d'induire des gènes essentiels à l'effet bénéfique (Furukawa *et al.*, 1997).

Le but de notre travail est de rechercher des molécules qui potentiellement pourront servir à traiter des patients du BTHS. Pour cette raison, il est important de tester l'effet de la CHX sur ces modèles eucaryotes supérieurs qui sont plus proches des patients. Des premiers résultats sur des cellules HeLa semblent montrer un effet bénéfique de la CHX à des concentrations très faibles (50 pM). Ces faibles concentrations semblent très éloignées des concentrations toxiques pour les cellules.

V. Conclusion

Dans ce papier, nous décrivons une autre cible thérapeutique potentielle pour traiter le syndrome de Barth : la synthèse protéique cytosolique. En effet, nous avons montré

qu'une légère diminution de cette synthèse permet de restaurer la croissance respiratoire d'un modèle levure $\Delta taz1$. La diminution de la synthèse protéique cytosolique, induite de façon pharmacologique (cycloheximide) ou génétique ($\Delta rei11$ et $\Delta rpl6b$), est déjà connue pour sauver un certain nombre de modèles de pathologies mitochondriales, en induisant différentes réponses métaboliques dont les modalités restent à préciser.

Comme le montre nos résultats, l'effet bénéfique de la CHX passe par une inhibition de la synthèse protéique cytosolique. Ce processus étant fortement conservé au cours de l'évolution l'effet bénéfique de la CHX est aussi retrouvé sur un modèle du BTHS dans les cellules HeLa. Quel que soit le modèle que nous utilisons, les doses efficaces en CHX sont très faibles (10-20 nM pour la levure et 50 pM pour les cellules HeLa). Ces faibles doses évitent les problèmes de toxicité de la CHX. Enfin, la localisation extra-mitochondriale de la cible de la CHX (les ribosomes cytosoliques) permet certainement une meilleure efficacité de la molécule. En effet, le passage des membranes mitochondriales aurait pu représenter une barrière supplémentaire à l'efficacité de cette drogue. L'ensemble de ces résultats est très encourageant. La CHX semble être une piste thérapeutique prometteuse.

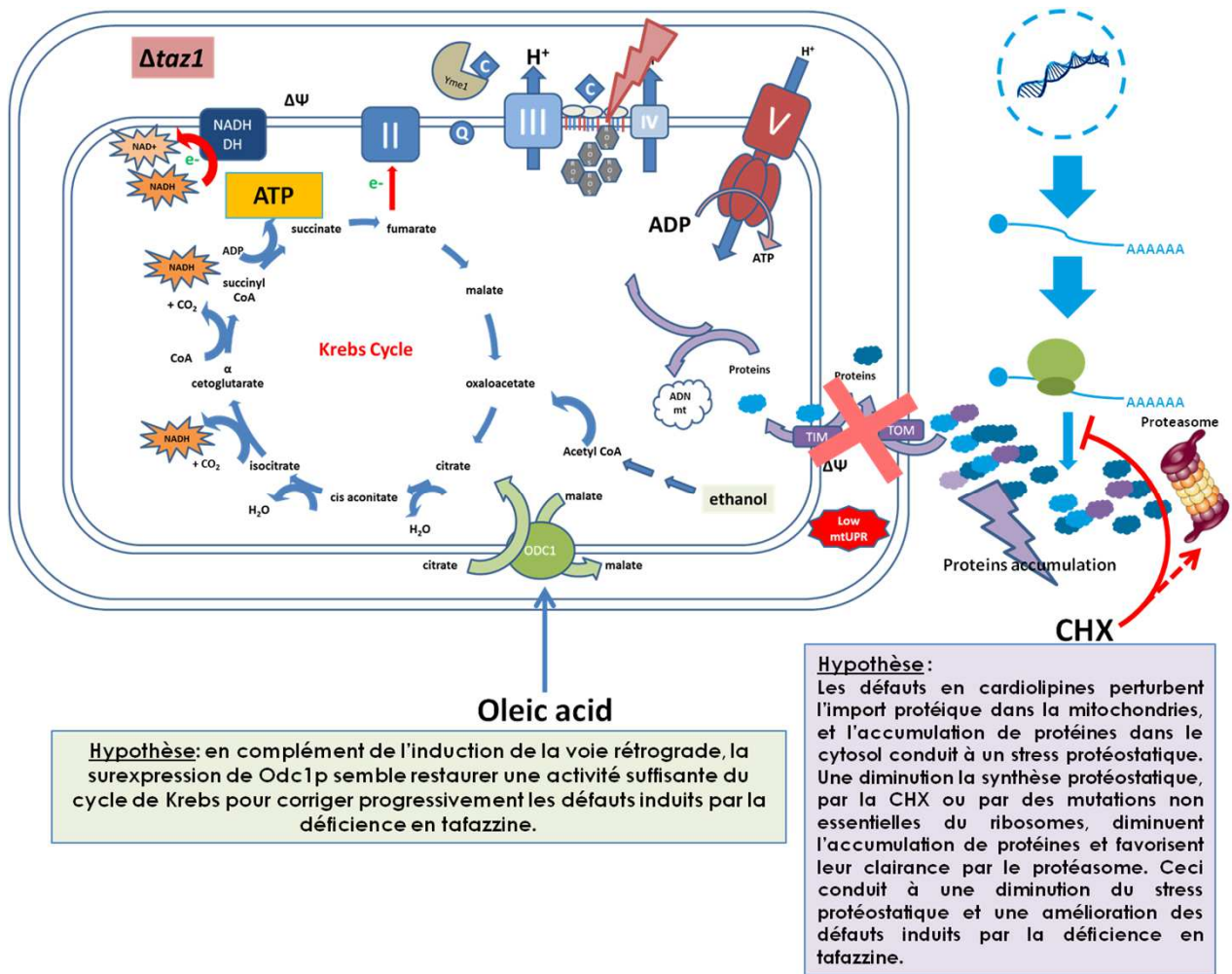


Figure 54 : Schéma récapitulatif des effets supposés de la surexpression d'Odc1p, ou de la diminution de la synthèse protéique (notamment par la cycloheximide), dans notre modèle levure du syndrome de Barth.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la mise en place d'un modèle du syndrome de Barth chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle « *Δtaz1* » récapitule un certain nombre de phénotypes retrouvés, à l'échelle cellulaire, chez les patients du syndrome de Barth : profil en cardiolipines altéré, déstabilisation des super-complexes de la chaîne respiratoire, génération de ROS. Ces dysfonctions conduisent à un défaut de croissance respiratoire du mutant à 36°C. Ce modèle, malgré sa simplicité, est donc pertinent et nous a permis d'identifier deux nouvelles pistes thérapeutiques potentielles (Fig. 54).

La première piste concerne le transporteur Odc1p. La souche *Δtaz1*, pour essayer de compenser les défauts cités précédemment, active la voie rétrograde qui permet notamment la stimulation du cycle de Krebs. Cette voie semble essentielle à la viabilité du mutant *Δtaz1* puisque le blocage de cette voie entraîne une létalité synthétique. La surexpression génétique ou pharmacologique par l'oléate d'Odc1p, semble exacerber et optimiser cette réponse naturelle. Afin de confirmer cela, il nous faut doser les activités de différentes enzymes du cycle de Krebs, notamment les enzymes connues pour être augmentées lors de cette réponse rétrograde (*CIT1*, *ACO1* et *IDH1* et 2). Par ailleurs, bien que le gène *ODC1* soit conservé dans l'évolution et que sa surexpression soit déjà connue pour restaurer la croissance de cybrides modélisant le syndrome NARP, il nous reste à montrer cet effet bénéfique d'Odc1p dans des modèles supérieurs du syndrome de Barth.

La deuxième piste mise en évidence est la synthèse protéique cytosolique. La tafazzine, *via* son rôle dans le remodelage des cardiolipines, est impliquée dans de nombreux processus. Ainsi, le mutant *Δtaz1* présente de nombreux dysfonctionnements. Parmi ces dysfonctions, il est probable que notre modèle présente des défauts d'import protéique à la mitochondrie. Afin de confirmer cette hypothèse, une collaboration est mise en place avec Robert Saint-Onge (Department of Biochemistry, Stanford Genome Technology Center, Stanford University, USA) pour analyser les modalités de cet import. Si cette hypothèse est exacte, alors il est probable que la souche *Δtaz1* présente une accumulation dans le cytosol de protéines mal importées à la mitochondrie. De telles accumulations ont déjà été mises en évidence dans différentes pathologies mitochondriales et induisent un stress protéostatique. En réponse à ce stress, la cellule met naturellement en

CONCLUSIONS

place des réponses qui aboutissent à une diminution de la synthèse protéique et à une stimulation du protéasome. Nous avons effectivement observé cette diminution de la synthèse protéique dans notre mutant *Δtaz1*. En revanche, il nous reste à montrer l'activation du protéasome par la mesure des activités « chymotrypsin-like » et « caspase-like » pour confirmer l'induction d'une réponse à un stress protéostatique. Nous avons montré qu'une légère diminution supplémentaire de la synthèse protéique cytosolique par une approche génétique (délétion de gènes non essentiels du ribosome) ou par une approche pharmacologique (utilisation de très faibles concentrations de cycloheximide), restaure efficacement la croissance respiratoire du mutant *Δtaz1*. Cet effet bénéfique pourrait s'expliquer par une synergie entre la réponse naturelle au stress protéostatique et la légère inhibition artificielle de la synthèse protéique cytosolique. Mais les mécanismes moléculaires qui aboutissent à la restauration de la croissance respiratoire sont encore mal compris et une étude de protéomique est envisagée, afin d'essayer de mettre en évidence l'activation ou l'inhibition de certaines voies métaboliques. Comme pour la surexpression d'*Odc1p*, l'effet bénéfique de la cycloheximide doit être confirmé dans des modèles supérieurs du syndrome de Barth. Des premiers résultats, obtenus en collaboration avec Patrice Petit (INSERM S-1124, Université Paris-Descartes), montrent un effet bénéfique de la cycloheximide à des concentrations non toxiques sur des cellules HeLa modélisant le BTHS. Ces molécules très prometteuses ont fait l'objet d'un brevet et un projet de maturation soutenu par l'université de Bordeaux est en cours pour tester ces molécules (cycloheximide, anisomycine, émétine) dans un modèle murin du BTHS, en collaboration avec Douglas Strathdee (Beatson Institute, Galsgow, Royaume-Uni). Enfin, une autre collaboration avec William Pu (Department of Cardiology, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts, USA), nous permettra de tester l'effet de la cycloheximide sur des cellules iPSC de patients reprogrammées en cardiomyocytes qui présentent les principaux défauts retrouvés chez les patients.

La surexpression du gène *ODC1* et la légère diminution de la synthèse protéique cytosolique semblent impliquer des mécanismes de sauvetages différents. Pour cette raison, on pourrait imaginer un effet synergique entre ces deux voies. On pourrait donc envisager une stratégie thérapeutique basée sur un régime alimentaire enrichi en oléate couplé à un traitement par de faibles doses de cycloheximide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sommaire

A. Souches, milieux de culture et plasmides	181
A.1. Culture des levures	181
A.1.1. Souches de levures.....	181
A.1.2. Milieux de culture	181
A.1.3. Culture et conservation des souches	182
A.1.4. Tests de drogues	183
A.2. Culture cellulaire HeLa	183
A.2.1. Conditions de culture.....	183
A.2.2. Mesure de la prolifération en temps réel par xCELLigence	184
B. Techniques de biologie moléculaire	185
B.1. Construction des souches de levures	185
B.1.1. Construction de la souche <i>Δtaz1</i>	185
B.1.2. Construction des souches <i>taz1Δ/rpl6bΔ</i> et <i>taz1Δ/rei1Δ</i>	185
B.1.3. Construction des souches <i>Δrtg1</i> et <i>Δtaz1/Δrtg1</i>	186
B.2. Plasmides utilisés	187
C. Techniques de biochimie	187
C.1. Préparation de mitochondries par digestion enzymatique	187
C.2. Analyses biochimiques des souches de levure	189
C.2.1. Mesure de la respiration sur cellules entières	189
C.2.2. Mesure de la respiration mitochondriale.....	189
C.2.3. Mesure du potentiel mitochondrial $\Delta\psi$	189
C.2.4. Mesure de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase	190
C.2.5. Hydrolyse sur gel d'ATP.....	191
C.2.6. Activité complexe II	192
C.2.7. Activité complexe IV.....	192
C.2.8. Mesure de la production de ROS	192
C.2.9. Estimation de la biogenèse mitochondriale.....	192
C.3. Préparation d'échantillons protéiques	193
C.3.1. Préparation des protéines à partir de mitochondries isolées.....	193
C.3.2. Extraits cellulaires totaux	193
C.4. Dosage colorimétrique des protéines	194
C.5. Extraction à la digitonine des complexes membranaires mitochondriaux	194
C.6. Radiomarquage des protéines <i>in vivo</i>	195
C.7. Electrophorèse	195
C.7.1. En conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	195
C.7.2. En conditions non dénaturantes (BN-PAGE ou CN-PAGE)	196
C.8. Western blot	196
C.8.1. Migration des protéines	196
C.8.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose avec l'iBlot™	197
C.8.3. Immuno-détection	197
C.8.4. Liste des anticorps utilisés.....	198
C.9. Analyse des lipides	198
D. Techniques de biologie cellulaire	198
D.1. Analyse ultrastructurale	198
Bibliographie	200

Nom de la souche	Fond génétique	Génotype
WT	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>
$\Delta taz1$	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1</i>
$\Delta taz1/\Delta rei1$	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1, rei1::KanMX</i>
$\Delta taz1/\Delta rpl6b$	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1, rpl6b1::KanMX</i>
$\Delta rtg1$	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, rtg1::KanMX</i>
$\Delta taz1/\Delta rtg1$	W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1, rtg1::KanMX</i>
D27310b		<i>MATα met6 ρ^0</i>

Tableau 7 : Liste des souches de levure utilisées.

A. Souches, milieux de culture et plasmides

A.1. Culture des levures

A.1.1. Souches de levures

Les différentes souches de levures utilisées sont listées et documentées dans le tableau 7.

A.1.2. Milieux de culture

A.1.2.1. Milieu riche fermentaire YPDA

Ces milieux liquides YPDA sont essentiellement utilisés pour sortir les souches sans plasmides du congélateur -80°C ou réaliser les pré-cultures. Ces milieux contiennent 20 g/L de glucose, 10 g/L de bacto-yeast extract, 10 g/L de bacto-peptone et 60 mg/L d'adénine. Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 120°C pendant 20 min.

A.1.2.2. Milieu riche respiratoire YPE

Ces milieux liquides YPE contiennent 2% v/v d'éthanol, 10 g/L de bacto-yeast extract, 10 g/L de bacto-peptone et 60 mg/L d'adénine. Ce milieu peut aussi être complétement avec 20g/L de glycérol (YPEG).

Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 120°C pendant 20 min. L'éthanol se rajoute après avoir autoclave les milieux et attendu suffisamment pour que la température ne soit pas trop haute et éviter ainsi l'évaporation de l'éthanol.

A.1.2.3. Milieu riche à la fois fermentaire et respiratoire YPEGal

Ces milieux liquides YPEGal contiennent 20 g/L de galactose, 2% v/v d'éthanol, 10 g/L de bacto-yeast extract, 10 g/L de bacto-peptone et 60 mg/L d'adénine.

Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 120°C pendant 20 min. L'éthanol se rajoute après

MATÉRIEL ET MÉTHODES

avoir autoclave les milieux et attendu suffisamment pour que la température ne soit pas trop haute et éviter ainsi l'évaporation de l'éthanol.

A.1.2.4. Milieu pauvre fermentaire CSM-U+Glucose

Ces milieux liquides CSM+Glucose contiennent 20 g/L de glucose, 1,67 g/L de yeast nitrogen base, 5 g/L de sulfate d'ammonium, et 8 g/L de CSM-U (Complete Synthetic Medium). Le CSM-U est un mélange d'acides aminés et de nucléotides dépourvu d'uracile.

Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 110°C pendant 35 min.

A.1.2.5. Milieu pauvre respiratoire CSM-U+Ethanol+Galactose

Ces milieux liquides CSM-U+Ethanol+Galactose contiennent 5 g/L de galactose, 0,17 g/L de yeast nitrogen base sans acide aminés ni sulfate d'ammonium, 5 g/L de sulfate d'ammonium, et 8 g/L de CSM-U (Complete Synthetic Medium). Le CSM-U est un mélange d'acides aminés et de nucléotides dépourvu d'uracile.

Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 110°C pendant 35 min.

A.1.2.6. Milieu pauvre WO

Ces milieux liquides WO contiennent 20 g/L de glucose, 0,67 g/L de yeast nitrogen base sans acide aminés ni sulfate d'ammonium, 5 g/L de sulfate d'ammonium.

Les milieux solides sont obtenus à partir du même milieu liquide avec l'ajout de 20 g/L d'agar. Ces milieux sont autoclaves à 110°C pendant 35 min.

A.1.3. Culture et conservation des souches

Les cultures sont réalisées dans cette étude soit à 28°C, température optimale de croissance de la levure, soit à 37°C, température qui permet bien souvent d'exacerber le phénotype des souches mutantes. Les cultures en milieu liquide sont réalisées en

MATÉRIEL ET MÉTHODES

erlenmeyer d'une contenance cinq fois supérieure au volume de culture et agitées à une vitesse de 180 rotations par minute (rpm) afin de maintenir une oxygénation correcte du milieu. La quantité de levures présente dans la culture peut être estimée par mesure de la densité optique (DO) à 600nm avec la considération suivante : $1,2 \times 10^7$ cellules par unité de DO_{600nm}).

La conservation des souches de levure se fait dans une solution contenant 50% v/v de glycérol stérile à -80 °C.

A.1.4. Tests de drogues

A partir d'une culture liquide de la souche mutante *Δtaz1* en phase exponentielle de croissance, l'équivalent de 0,125 DO_{600nm} sont prélevés et étalés de manière homogène à l'aide de billes de verre sur une boîte de pétri (12 cm x 12 cm) contenant du milieu solide respiratoire YPE. Des filtres stériles sont alors disposés à la surface de l'agar et les drogues suivantes sont déposées sur ces filtres : Acide oléique, cycloheximide (Sigma), anisomycine (Sigma), or émetine (Sigma). Ces drogues ont préalablement été dissoutes dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à la concentration de 100 mM. La restauration de la croissance de la souche mutante est alors estimée après plusieurs jours d'incubation à 36°C.

A.2. Culture cellulaire HeLa

A.2.1. Conditions de culture

Les cellules HeLa, issues d'une lignée générée à partir d'un carcinome du col de l'utérus, sont cultivées dans un milieu DMEM Glutamax supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, des vitamines MEM, 0,5 mM de sodium pyruvate, 10 mM d'HEPES, des antibiotiques (Penicilline à 50 IU/mL et streptomycine 50 ug/mL) (tous les produits proviennent de GIBCO). La transfection des cellules HeLa a été réalisée avec de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Les lignées cellulaires HeLa stables shTaz et shWT ont été générées par transfection avec les plasmides pcDNA3/Bcl-xL, pSUPER/shTaz, ou pSUPER/shWT, respectivement et sélectionnés en présence de G418. La lignée cellulaire

MATÉRIEL ET MÉTHODES

shTaz1R révertante ont été générée par co-transfection des cellules HeLa shTaz1 avec le vecteur pLpC (pour la résistance à la puromycine) et pcDNA3/Taz et les clones stables ont été sélectionnés en présence de puromycine. Ce protocole est décrit dans Gonzalez *et al*, 2008.

A.2.2. Mesure de la prolifération en temps réel par xCELLigence

Ces expériences ont été menées avec l'instrument xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, Ozyme, France), placé dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO₂. La prolifération et l'effet de la cycloheximide ont été réalisés en plaques 16-puits (E-plate, Ozyme, Montigny le Bretonneux, France). Le fond des puits est constitué de microélectrodes qui permettent la détection de variations d'impédances, dues à l'attachement et à la prolifération cellulaire. 180 µL de milieu de culture sont déposés par puits, et après 30 min à température ambiante, l'impédance « bruit de fond » est mesurée. Les cellules sont alors récoltées en phase exponentielle avec 0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen). 20 µL de milieu de culture contenant 5000 ou 7500 cellules (selon l'expérimentation) sont ajoutés dans chaque puits. Un réservoir autour de la plaque est rempli d'eau afin de limiter l'évaporation. Les plaques sont laissées au repos à température ambiante afin de permettre l'attachement des cellules, comme conseillé par le fournisseur, puis insérées dans l'appareil, lui-même placé dans l'incubateur. L'impédance de chaque puits est alors mesurée par l'appareil à intervalles de temps réguliers. Dans notre cas, les mesures ont été prises toutes les 15 minutes. Les valeurs sont exprimées en « Cell Index » (CI). Quatre réplicats ont été réalisés pour chaque condition de chaque test.

Suite à des expériences préliminaires (non montré), la concentration efficace en cycloheximide a été estimée entre 1 et 100 pM. A ces concentrations, la cycloheximide n'est pas ou peu toxique pour les cellules shWT1. Un test de prolifération a donc été mené en présence ou en absence de 50 pM de cycloheximide injectée après adhésion des cellules, soit 24/26 heures après dépôt des cellules dans les puits. Cette expérience a été menée sur 240 heures.

B. Techniques de biologie moléculaire

B.1 Construction des souches de levures

B.1.1. Construction de la souche $\Delta taz1$

La souche levure $\Delta taz1$ (*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100, taz1::TRP1*) a été construite en remplaçant l'ORF du gène *TAZ1* par celui du gène *TRP1* dans une souche W303-1A (*MATa ade2-1 ura3-1 his311, 15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*), selon la procédure décrite par (Longtine et al., 1998). Une cassette de délétion *taz1::TRP1* a été amplifiée par PCR en utilisant un plasmide portant le gène *TRP1*, *TRP1* (pFA6a-*TRP*), et les amorces suivantes : Taz1-del-F (CAT TTT CAA AAAAAAAAAAAGTAAAGT TTTCCCTATCAAcgg atc ccc ggg tta att aa) et Taz1-del-R (CCT CAT ACA TGC TAG TAT TTA CAC GAA TTT AAT TGC TTA AAT T gaa ttc gag ctc gtt taa ac). Les nucléotides notés en lettres majuscules correspondent aux séquences flanquantes du gène *TAZ1*, ceux notés en minuscules permettent l'amplification du gène *TRP1*. Le produit de PCR a été purifié avant transformation de la souche W303. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu sans tryptophane. L'intégration de la cassette *taz1::TRP1* a été vérifiée par PCR en utilisant des amorces internes au gène *TRP1* (TRP1-466-R:CAGTCAGAAATCGAGTTCCA) et deux amorces des régions flanquantes de *TAZ1* flanking regions (Taz1-Fbis: CGC CAG GAT CTG ACA GTA T; et Taz1-Rbis: TGA ATT CTA CCA GAT TGG TTA G).

B.1.2. Construction des souches $taz1\Delta/rpl6b\Delta$ and $taz1\Delta/rei1\Delta$

Ces souches ont été construites par délétion des ORF des gènes *RPL6B* et *REI1* à l'aide d'une cassette portant le marqueur *KanMX*, selon la procédure décrite par (Longtine et al., 1998), dans la souche mutante $\Delta taz1$. Pour la construction de la $\Delta taz1/\Delta rpl6b$, la cassette *KanMX* a été amplifiée à partir des amorces pFA6a-Kan: Rpl6b-del-F (CTT TCT TGA ACT TGG AAG AGA AGC AAA TAT ATT CAA CGA A cgg atc ccc ggg tta att aa) et Rpl6b-del-R (CTA TTT TAA ATC ATT TAT AAT TTT TTC AGT TCA AT gaa ttc gag ctc gtt taa ac). Les nucléotides notés en majuscules sont homologues à des régions flanquantes du gène *RPL6B*, ceux notés en

MATÉRIEL ET MÉTHODES

minuscules permettent l'amplification de la séquence *KanMX*. La même stratégie a été appliquée pour la construction de la souche $\Delta taz1/\Delta rei1$, mais avec les amorces suivantes : pFA6a-Kan: Rei1-del-F (CAT TAG AAG TCA AGA AGA GAG CAT ATC AGT AAC AAT ACG cgg atc ccc ggg tta attaa) et Rei1-del-R (GCG ACA AAA TAC TAA AAA AAG TAG TGC AAA AAG AA gaa ttc gag ctc gtt taa ac). Les amorces Rpl6b-Fbis (CTG CGC TTC CGT TCA GCA TC), Rpl6b-Rbis (CGA TGA CCT GAT CTT GAA CCC) ou Rei1-Fbis (GTG GTG TAG CTA TTT GTA CAT G), et Rei1-Rbis (CAA CAT CTT CAG TCT TCA GCA GC) ont été utilisées pour vérifier l'efficacité de la délétion par PCR.

B.1.3. Construction des souches $\Delta rtg1$ et $\Delta taz1/\Delta rtg1$

B.1.3.1. Construction des souches

Les souches levures $\Delta rtg1$ et $\Delta taz1/\Delta rtg1$ ont été construites en remplaçant l'ORF du gène *RTG1* par le marqueur *KanMX* dans une souche WT W303-1A pour le simple délétant ou une souche $\Delta taz1$ pour le double mutant, selon la procédure décrite par (Longtine et al., 1998). Une cassette de délétion *rtg1::KanMX* a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de levures BY4741; MATa; *ura3* Δ 0; *leu2* Δ 0; *his3* Δ 1; *met15* Δ 0; *YOL067c::kanMX4* (banque Euroscarf) et des amorces suivantes : RTG1-339Fbis (5'- GTC TTC GTG GGG GTT ATG GAG CCC G -3') et RTG1+851Rbis (5'- GCA GGA AAG ATG AAT TTG CCC GTC ACC -3'). Les souches WT et $\Delta taz1$ ont été transformées avec le produit de PCR. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu G418. L'intégration de la cassette *taz1::TRP1* a été vérifiée par PCR en utilisant des amorces internes du marqueur *KanMX* et les deux amorces citées précédemment.

B.1.3.2. Confirmation du phénotype [ρ^- / ρ^0] des souches $\Delta taz1/\Delta rtg1$

Afin de vérifier le phénotype [ρ^- / ρ^0] des doubles mutants $\Delta taz1/\Delta rtg1$, ces souches, ainsi que des souches simples mutantes, ont été croisées avec la souche ρ^0 D273-10b par la

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Origine de réplication	Marqueur de sélection	Référence
pØ	pRS426	2µm	<i>URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pTAZ1	pRS426	2µm	<i>URA3</i>	cette étude
pODC1 (pLL16)	pFL44L	2µm	<i>URA3</i>	Schwimmer <i>et al.</i> , 2005
pSDH3-LacZ	pGM32	2µm	<i>LEU2</i>	Daignan-Fornier <i>et al.</i> , 1994

Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

technique « goutte sur goutte ». Cette technique consiste à déposer une goutte de 5µL d'une culture liquide de la souche à tester sur un milieu solide riche fermentaire (YPDA), puis de déposer par-dessus une goutte de 5µL d'une culture de la souche ρ^0 . Après un ou deux jours d'incubation à 28°C, les gouttes sont répliquées par velours sur un milieu solide minimum, sans aucun acide aminé (WO) et sur un milieu riche respiratoire (YPEG). Par complémentations d'auxotrophies, seules les souches diploïdes « souche à tester*souche ρ^0 » ont la capacité de croître, ce qui nous sert de contrôle de croisement. Sur milieu respiratoire, les souches ρ^- ou ρ^0 seules sont incapables de se développer, en effet, un défaut au niveau de l'ADN nucléaire, sera compensé par le génome nucléaire « sauvage » de la souche ρ^0 , alors qu'un défaut de l'ADN mitochondrial lui, ne pourra pas être complété par cette souche.

B.2. Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés lors de ce travail sont répertoriés dans le tableau 8.

C. Techniques de biochimie

C.1. Préparation de mitochondries par digestion enzymatique

Afin de réaliser les analyses biochimiques, il est nécessaire au préalable d'isoler les mitochondries. La technique est basée sur le protocole décrit par Guérin *et al* (1979). À partir d'une pré-culture à 28°C de la souche d'intérêt, deux erlenmeyers de 5 L contenant 1 L de milieu de culture adéquat sont ensemencés à une DO_{600nm} de 0,5 DO/mL et incubés durant une nuit à 36°C jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 3 DO.

Sauf contre indication, les étapes qui suivent sont réalisées à 4 °C. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4 000 g pendant 5 min. Un lavage à l'eau distillée froide est effectué. Les levures sont traitées avec une solution de [tris 0,1M; β -mercaptoéthanol 0,5M; pH 9,3] à raison de 20 mL de solution/g de poids sec. Le poids sec est estimé selon la formule:

$$\text{Poids sec (g)} = DO_{600nm/mL} \times \text{volume total de culture (L)} \times 0,28$$

Les cellules sont alors incubées 10 min à 32 °C. Le contenant est complété avec un tampon [tris 10mM; KCl 0,5M; pH 7] puis centrifugé à 4 000 g durant 5 min. Le culot est lavé deux fois avec le même tampon, puis repris à raison de 10 mL de tampon [sorbitol 1,35M; EGTA

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1mM; acide citrique 10mM; phosphate disodique 30mM; pH 5,8] par gramme de poids sec et complété avec 15 mg de zymolyase par gramme de poids sec. L'ensemble est incubé à 32°C durant 20 min. La zymolyase est une enzyme qui permet la digestion de la paroi cellulaire de la levure. Cette digestion est suivie et vérifiée au microscope optique par choc osmotique sur les protoplastes : 4 μ L de la solution de digestion sont mélangés à 15 μ L d'eau distillée, puis 4 μ L de ce mélange sont déposés entre lame et lamelle. Dans le cas où la digestion n'est pas complète, la durée d'incubation peut être rallongée.

Les protoplastes sont ensuite lavés deux fois avec un tampon [sorbitol 0,75M; mannitol 0,4M; tris/maléate 10mM; BSA 0,1% m/v ; pH 6,8]. Le culot est homogénéisé au Potter entre chaque lavage et centrifugé à 12 000g pendant 5 min. Les protoplastes sont ensuite repris dans un tampon [mannitol 0,6M; EGTA 2mM; tris/maléate 10mM; BSA 0,2% m/v ; pH 6,8], homogénéisés au Potter puis lysés au mixer (WARING BLENDER) 3 fois 5 sec avec 5 sec de repos entre chaque mixage. Le mélange est ensuite centrifugé à basse vitesse à 750g durant 8 min. Le surnageant est récupéré.

Le culot est re-homogénéisé puis re-centrifugé dans les mêmes conditions, aboutissant à un deuxième surnageant. Les surnageants des deux centrifugations à basse vitesse sont centrifugés pendant 10 min à 12 000 g. Le culot de mitochondries obtenu est ensuite resuspendu avec un tampon [mannitol 0,6M; EGTA 2mM; tris/maléate 10mM; pH 6,8], homogénéisé au Potter puis re-centrifugé à 750 g pendant 8 min. Le surnageant est récupéré et centrifugé pendant 10 min à 12 000 g. Un maximum de surnageant est ensuite éliminé. Le culot de mitochondries obtenu est resuspendu à la pipette Pasteur dans le surnageant résiduel, homogénéisé dans un Potter de 2 mL puis transvasé dans un tube à hémolyse. Cette solution finale contient les mitochondries. A ce niveau, les mitochondries obtenues sont utilisées fraîches dans la journée pour les expériences de respiration, mesure du potentiel de membrane et synthèse d'ATP.

Cependant, avant de réaliser ces expériences, la concentration protéique doit être déterminée. Pour cela, 5 μ L de cette préparation sont prélevés et solubilisés dans 95 μ L d'une solution contenant du SDS 5% m/v et sont incubés à 37°C durant 30 min. Cette solution diluée est utilisée pour déterminer la concentration de protéines mitochondriales par la technique de dosage colorimétrique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Les mitochondries fraîches restantes après analyses sont congelées par projection sur azote liquide, et les billes formées sont conservées au congélateur à -80 °C. Elles pourront ensuite être utilisées pour

MATÉRIEL ET MÉTHODES

réaliser d'autres expériences telles que SDS-PAGE, BN et CN-PAGE ou encore des expériences d'hydrolyse d'ATP.

C.2. Analyses biochimiques des souches de levure

C.2.1. Mesure de la respiration sur cellules entières

La vitesse de consommation de l'oxygène mesurée dans une cuve d'oxygraphie de 1,2 mL varie selon l'addition de différents substrats et inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire (Chance & Williams, 1955).

Des expériences de respiration cellulaire peuvent aussi être réalisées sur cellules entières. Ces mesures permettent de mieux juger de la capacité respiratoire cellulaire et non pas uniquement mitochondriale, et ainsi tenir compte non plus que du contenu mitochondrial, mais aussi du contenu en mitochondries fonctionnelles dans les cellules. On utilise alors de 0,008% Ethanol ; 8,3 mM CCCP, à raison de 2 OD_{600nm}/mL de cellules reprises dans du milieu frais.

C.2.2. Mesure de la respiration mitochondriale

La vitesse de consommation de l'oxygène mesurée dans une cuve d'oxygraphie de 1,2 mL varie selon l'addition de différents substrats et inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire (Chance & Williams, 1955). Cette teneur en oxygène au cours du temps est mesurée grâce à une électrode de Clark plongée dans la cuve d'oxygraphie. Pour réaliser ces mesures, les mitochondries sont mises en suspension (75 µg/mL) sous agitation constante à 28°C dans du tampon de respiration (0,65 M mannitol ; 0,36 mM ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA) ; 5 mM Tris-phosphate ; 10 mM Tris-maléate pH 6,8) (Rigoulet & Guerin, 1979). Les différents substrats et inhibiteurs ajoutés séquentiellement sont : 4 mM NADH ; 150 µM ADP ; 4 µM carbonyl cyanide mchlorophenylhydrazone (CCCP) ; 3 µg/mL Oligomycine ; 12,5 mM Ascorbate ; 1,4 mM N,N,N',N'-tetramethyl-pphenylenediamine (TMPD) ; 10 mM éthanol ; 2 mM KCN. Les vitesses de respiration ainsi mesurées sont exprimées en nano-atomes d'oxygène consommés par minute par mg de protéines mitochondriales.

C.2.3. Mesure du potentiel mitochondrial $\Delta\psi$

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le potentiel de membrane mitochondriale interne est mesuré par fluorimétrie en utilisant comme sonde la rhodamine 123 (Emaus *et al.*, 1986). L'intensité de fluorescence est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 525 nm. Les variations de fluorescence sont fonctions et proportionnelles du potentiel membranaire mitochondrial (Emaus *et al.*, 1986). Une augmentation du potentiel de membrane entraîne l'entrée de la rhodamine 123, chargée positivement, et par conséquent son accumulation dans les mitochondries. Lorsqu'elle est piégée dans les mitochondries, la rhodamine fluoresce moins. Une entrée de rhodamine 123 sera donc visualisée par une diminution de la mesure de la fluorescence.

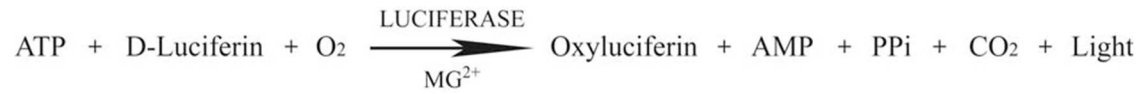
Les mitochondries (75 µg de protéines/mL) sont placées sous agitation dans la cuve de 1 mL d'un spectrofluorimètre FLX (SAFAS, Monaco), en présence de 0,5 µg/mL de rhodamine 123. L'ajout d'un substrat respiratoire tel que l'éthanol provoque la polarisation de la membrane mitochondriale interne entraînant l'entrée de la sonde dans les mitochondries visualisée par une diminution de la fluorescence. Différentes molécules sont alors ajoutées dans la cuve afin de tester l'aptitude des mitochondries à maintenir un potentiel de membrane mitochondrial, via l'hydrolyse ou la synthèse d'ATP : 0,2 mM ATP ; 0,08 mM ADP. Les inhibiteurs suivants sont également utilisés : Le KCN (2 mM, inhibiteur du complexe IV de la chaîne respiratoire), l'oligomycine (4 mg/mL, inhibiteur spécifique du canal à protons de l'ATP synthase), ou le CCCP (4 µM, agent découplant) afin de constater l'état fonctionnel de la chaîne respiratoire.

C.2.4. Mesure de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase

La capacité de l'ATP synthase à synthétiser de l'ATP est mesurée dans les mêmes conditions que pour les mesures de la respiration (C.2.2. Mesure de la respiration mitochondriale) avec pour substrat respiratoire 4 mM de NADH. La synthèse d'ATP est alors mesurée en présence d'un excès d'ADP (1 mM) (Rak *et al.*, 2007). Toutes les 15 secondes pendant 90 secondes, un aliquote de 50 µL est prélevé et rapidement précipité avec une solution contenant 7% v/v d'acide perchlorique (PCA) et 12,5 mM EDTA. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 15 000 g à 4°C et les surnageants ainsi obtenus sont ajustés à une solution pH 6,5 contenant 2 N KOH et 0,3 M MOPS. Cet extrait final est congelé à -80°C. L'ATP synthétisé est ensuite dosé grâce au kit Luciferin/luciférase assay (ATPLite kit de Perkin

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Elmer), selon les recommandations du fournisseur, dont le principe repose sur la réaction suivante :

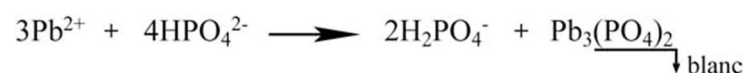


Lors de cette réaction, l'émission de lumière mesurée au luminomètre est proportionnelle à la quantité d'ATP exprimée en nanomoles d'ATP synthétisées par minute par mg de protéine. La participation de l'ATP synthase à la production d'ATP est contrôlée par la présence ou non d'oligomycine (2 µg/ml).

C.2.5. Hydrolyse sur gel d'ATP

Après séparation des complexes protéiques en condition non dénaturante à l'aide d'électrophorèse BN-PAGE, la capacité de l'ATP synthase à hydrolyser l'ATP (activité ATPasique) peut être révélée directement dans le gel, selon la méthode décrite par Grandier-Vazeille et Guérin (Grandier-Vazeille & Guerin, 1996). En effet, l'ATP synthase, de par son activité ATPasique, peut être mise en évidence grâce à la formation de phosphate de plomb qui apparaît sous forme d'un précipité blanc. On peut ainsi visualiser le F₁ libre (450 kDa), les formes monomériques (600 kDa), les formes dimériques (1200 kDa) et les formes oligomériques (>1200 kDa).

Pour visualiser ces différentes formes de l'ATP synthase, le gel est incubé pendant 3 heures dans du tampon de révélation pH 8,4 contenant 270 mM de Glycine et 35 mM de tris. Il est ensuite incubé dans un deuxième tampon de révélation pH 8,4 contenant 270 mM de Glycine et 35 mM de tris additionné de 14 mM de MgSO₄, de 0,2% de Pb(NO₃)₂ et 8 mM d'ATP. L'incubation est maintenue jusqu'à apparition des bandes blanches correspondantes aux sites d'hydrolyse de l'ATP. En effet, l'hydrolyse de l'ATP libère du phosphate qui réagit avec le plomb pour donner du phosphate de plomb. Ce dernier précipite et donne cette coloration blanche.



Pour améliorer la visibilité de ces précipités blancs, le tampon est éliminé, et le gel est décoloré rapidement avec de l'éthanol 30% et 0,5 mM HCl.

C.2.6. Activité complexe II

Après séparation des complexes protéiques par électrophorèse native BN-PAGE (C.7.2. En conditions non dénaturantes), l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire peut être révélée. A cette fin, le gel natif est immergé dans une solution contenant 20 mM de sodium succinate, 1 mg/ml de nitrobleu tetrazolium, 5 mM de tris pH 7,4 et 0,2 mM de phenazine methosulfate.

C.2.7. Activité complexe IV

Après séparation des complexes protéiques par électrophorèse native CN-PAGE (C.7.2. En conditions non dénaturantes), l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire peut être révélée. A cette fin, le gel natif est immergé dans une solution contenant 0,5 mg/ml de diaminobenzidine, 5 mM de tris pH 7,4 et 0,05 mM de cytochrome c.

C.2.8. Mesure de la production de ROS

À partir d'une culture liquide en phase exponentielle de croissance, une quantité équivalente à 0,4 DO_{600nm} est prélevée. Ces cellules sont resuspendues dans 1 mL de tampon phosphate (PBS) contenant 10 µM de la sonde Dihydroéthidium (DHE, Molecular Probes) et incubées à température ambiante pendant 5 min. La fluorescence de 100 000 cellules est analysée pour chaque échantillon à l'aide du cytomètre en flux Becton-Dickinson Accuri C6 model flow cytometer. L'ajout de 5µL d'H₂O₂ dans un échantillon fait office de contrôle positif.

C.2.9. Estimation de la biogenèse mitochondriale

Les cellules sont transformées avec le plasmide *pSDH3-lacZ* (Daignan-Fornier, *et al.*, 1994), celui-ci présente une activité reportrice β-galactosidase induite par les HAP et la biogenèse mitochondriale. Cette activité est dosée selon le protocole de Kippert (Kippert, 1995). L'équivalent de 1 de DO_{600 nm} de cellules cultivées en phase exponentielle de

MATÉRIEL ET MÉTHODES

croissance (entre 1 à 4 DO_{600 nm}/mL) est prélevé et centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 min. Les cellules sont lavées une fois dans 1 mL d'eau par centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 min. Le culot est resuspendu dans 500 µL d'eau. Un cinquième de cette suspension de levure est utilisée pour le reste de la manipulation, auquel sont ajoutés 5 V de tampon β-Galactosidase pH 7 (1 mM DTT ; 60 mM Na₂HPO₄ ; 40 mM NaH₂PO₄ ; 10 mM KCl ; 1 mM MgSO₄, 7H₂O ; 0,2% w/v Sarcosyl). Le mélange est incubé 30 min à 30°C. Encore 10 V de solution d'orthonitrophényl-β-D-galactopyrannoside (4 mg ONPG repris dans 1 mL de tampon β-Galactosidase pH 7) sont ajoutés, avant une incubation de 1 à 2 heures. La réaction est arrêtée par l'ajout de 750 mM Na₂CO₃. La solution est alors centrifugée 1 min à 13 000 rpm et l'absorbance est mesurée à 420 nm, contre un blanc sans cellule traité de la même manière. Les mesures d'activité β-galactosidase sont exprimées en nmol de 4-nitro-phénol formé.min⁻¹.mg⁻¹ de poids sec en cellules.

C.3. Préparation d'échantillons protéiques

C.3.1. Préparation des protéines à partir de mitochondries isolées

À partir des mitochondries fraîches ou conservées au congélateur -80°C, et basé sur la concentration protéique mitochondriale mesurée précédemment, un volume de la solution mitochondriale correspondant à la quantité souhaitée est prélevé et centrifugé à 5 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est directement repris dans du tampon Laemmli 1X (Laemmli, 1970). L'extrait est alors chauffé 5 min à 95°C puis déposé sur un gel SDS-PAGE.

C.3.2. Extraits cellulaires totaux

Les protéines totales sont extraites à partir d'une quantité équivalente de 20 DO_{600nm}, de cellules en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 2 000 g durant 3 min puis incubées 10 minutes à 4°C dans 1 mL d'une solution contenant 1,85 M NaOH et 7,4% v/v β-mercaptoéthanol. Un même volume de 50% d'acide trichloroacétique (TCA) est rajouté. Les cellules sont de nouveau incubées à 4°C pendant 10 min. Après centrifugation 5 min à 16 000 g à 4°C, le surnageant est totalement

MATÉRIEL ET MÉTHODES

éliminé et le culot remis en suspension dans 50 μL d'une solution 5% m/v de SDS. Le pH est très vite neutralisé avec une solution basique à 3 M Tris pH 8,9. Après incubation 15 min à 42°C, les protéines sont récupérées dans le surnageant d'une centrifugation de 5 min à 16 000 g à 4°C. Elles peuvent alors être dosées (C.4. Dosage colorimétrique des protéines) ou stockées au congélateur -20°C.

C.4. Dosage colorimétrique des protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Le principe de ce dosage repose sur la propriété des ions cuivriques à se fixer sur les liaisons peptidiques en milieu alcalin. La formation de ce complexe cuprique favorise, au voisinage d'acides aminés aromatiques, la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu. Les composés réduits ainsi formés possèdent un coefficient d'extinction molaire très élevé présentant un maximum d'absorption à 750 nm. Cette technique permet de doser des quantités très faibles de protéines (1 à 50 μg) et présente l'avantage (contrairement au dosage de Bradford) d'être compatible avec la présence de différents détergents comme le SDS dans l'échantillon protéique.

L'échantillon protéique est dilué au 1/20^{ième} dans une solution 5% SDS et incubé 30 min à 37°C. Cinq microlitres de cette première dilution sont placés dans 750 μL de réactif A (4% CO_3Na_2 ; 2% Tartrate ; 1% SO_4Cu) et laissés à incuber 3 min à 37°C. Après ajout de 75 μL de réactif de Folin dilué au 1/3, le mélange est encore incubé pendant 6 min à 37°C. L'absorbance est lue à 750 nm.

Une gamme de sérum albumine bovine est traitée exactement avec le même protocole afin de servir de référence pour la proportionnalité entre l'absorbance et la quantité de protéines dans l'échantillon.

C.5. Extraction à la digitonine des complexes membranaires mitochondriaux

La digitonine est un détergent doux qui permet de solubiliser les complexes membranaires mitochondriaux tout en conservant leur organisation en super-complexes (Kun *et al.*, 1979). À partir d'une suspension de mitochondries isolées, comme décrit au paragraphe CHAP C.1., 100 μg sont centrifugés pendant 5 min à 16 000 g à 4°C. Le culot est

MATÉRIEL ET MÉTHODES

repris dans 50 μL de tampon d'extraction pH 7,4 contenant 30 mM d'Hepes, 150 mM d'acétate de potassium, 12% m/v de glycérol, 1 mM d'EDTA, et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete, Mini, EDTA-free Roche®). Ce tampon d'extraction contient aussi la digitonine (Sigma-Aldrich) à la concentration désirée entre 0,5 à 3 g de digitonine par gramme de protéines mitochondriales. Les protéines sont incubées dans la glace pendant 30 min. La centrifugation, de 30 min à 16 000 g qui suit, permet de récupérer les protéines et complexes protéiques des membranes mitochondriales dans le surnageant.

À ce surnageant est ajouté du tampon de charge (5% m/v bleu Serva G250) à raison de 1 μL de tampon de charge pour 20 μL d'extrait protéique. Les complexes protéiques sont ensuite séparés sur gel non dénaturant (C.7.2. En conditions non dénaturantes).

C.6. Radiomarquage des protéines *in vivo*

Les levures ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle (environ 2 UDO/mL) en milieu minimum galactose/éthanol à 36°C. Les cellules ont ensuite été récoltées, centrifugées et lavées deux fois avec un milieu minimum complétement avec 2% d'éthanol et 2% de glycérol ainsi que 50 mg/L des acides aminés suivants : adénine, histidine, tryptophane, leucine et uracile. Les cellules ont été resuspendues dans 1 mL ce même milieu dans lequel ont été ajoutés 0,5 mCi de méthionine [35S] plus cystéine [35S] (Amersham Biosciences). Les cellules ont été incubées pendant 20 min à 36°C. Après ce marquage, les protéines totales ont été extraites et quantifiées par la méthode de Lowry. 75 μg de protéines ont alors été chargées sur gel de polyacrilamide 12% et séparées par SDS-PAGE. Les gels ont été séchés et analysés par PhosphorImager. Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

C.7. Electrophorèse

C.7.1. En conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont déposées sur un gel contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS), un détergent anionique dénaturant qui, non seulement maintient les protéines sous une

MATÉRIEL ET MÉTHODES

forme « déroulée » mais aussi charge négativement les protéines de manière uniforme. La mobilité électrophorétique des protéines dépendra donc en majeure partie de leur taille. Les gels dénaturants Bis-tris 4-12% pré-coulés et les tampons de migration, contenant également du SDS, utilisés sont issus du kit commercial NuPAGE Novex 4-12% Bis-tris Gel de la société INVITROGEN. Les protéines sont soumises à un champ électrique de 200V constant pendant 35 à 55 min.

C.7.2. En conditions non dénaturantes (BN-PAGE ou CN-PAGE)

Les expériences de Blue Native- et Clear Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (BN- et CN-PAGE) sont réalisés selon la méthodologie décrite par Schägger et von Jagow (Schägger & von Jagow, 1991). Les complexes protéiques solubilisés avec la digitonine (C.5. Extraction à la digitonine des complexes membranaires mitochondriaux) sont déposés sur un gel gradient 3-12% non dénaturant. La mobilité électrophorétique des complexes protéiques dépendra donc de leur taille, de leur charge et de leur forme. Ces gels natifs 3-12% pré-coulés et les tampons de migration utilisés sont issus du kit commercial NativePAGE Novex 3-12% Bis-tris Gel de la société INVITROGEN. Les protéines sont soumises à un champ électrique de 150V constant pendant 90 à 115 min.

Concernant les électrophorèses en BN-PAGE, le bleu de coomassie G250 utilisé forme un complexe stable avec les protéines. En effet, cette molécule anionique va se fixer préférentiellement sur les acides aminés basiques et aromatiques. Ainsi, la fixation de cette molécule anionique permet une meilleure migration électrophorétique des complexes protéiques.

Ces gels sont ensuite traités pour être utilisés dans des expériences de Western blot (Arselin *et al.*, 1996) ou traités pour la détection d'activités soit ATPasiques (Grandier-Vazeille & Guerin, 1996) soit du complexe II ou du complexe IV de la chaîne respiratoire.

C.8. Western Blot

C.8.1. Migration des protéines

Les gels SDS-PAGE, BN et CN-PAGE cités ci-dessus permettent de réaliser des transferts de protéines sur membrane afin de réaliser une immunodétection.

C.8.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose avec l'iBlot™

Cette méthode utilisant le kit iBlot™ Gel transfer Stacks d'Invitrogen permet, en seulement 7 min (SDS-PAGE) ou 10 min (BN- et CN-PAGE), le transfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose. Avant le transfert des protéines à partir d'un gel natif (BN- ou CN-PAGE), il est nécessaire au préalable de laisser baigner le gel pendant 1h dans une solution 1% SDS avec agitation constante.

C.8.3. Immuno-détection

Après le transfert, la membrane est immergée 1h30 min dans le tampon TBST-lait 5% (5% lait écrémé déshydraté ; Tris/HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, 0,01% de Tween20) afin de bloquer les sites de liaisons non spécifiques. Le Tween20 est un détergent qui permet d'éliminer toutes les interactions Ac-Ag non spécifiques. La membrane est incubée sous agitation toute une nuit à 4°C avec le premier anticorps dilué dans le tampon TBST-lait 5% suivant les concentrations indiquées par les fournisseurs des anticorps. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois 20 min avec le tampon TBST-lait 5%. L'hybridation avec l'anticorps secondaire se fait par une incubation d'1h30 min dans la solution TBST-lait 5%. La dilution de l'anticorps secondaire est fonction du fabriquant. La membrane est lavée 6 fois 1 min avec la solution TBST. Après les lavages, la révélation conduisant à une immuno-empreinte est réalisée à l'aide du kit « SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate » (Pierce) suivant les recommandations du fournisseur. L'anticorps secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire est couplé à la peroxydase de raifort. La réaction catalysée par cette enzyme permet de localiser l'antigène. Elle consiste en l'oxydation du luminol à pH basique en présence de peroxyde d'hydrogène et de la peroxydase de raifort. Cette réaction permet la révélation des bandes protéiques portant l'antigène correspondant à l'anticorps primaire. Au niveau des bandes correspondantes, la lumière émise impressionne un film photographique. Si les conditions d'exposition du film ne conduisent pas à la saturation de la plaque photographique, l'intensité de l'empreinte est proportionnelle à la quantité d'antigène présent.

Organisme	Anticorps	Immunologie	Dilution	Provenance
Anticorps secondaires	anti-lapin HRP	polyclonal/chèvre	1/2 500ème	Promega (ref W4011)
	anti-souris HRP	polyclonal/chèvre	1/2 500ème	Promega (ref W4021)
Homme	Actine			P. Petit
	Taz	polyclonal/lapin		Abcam (ref 105104)
Levure	Ade13	lapin	1/100 000ème	B. Pinson
	Atp α	polyclonal/lapin	1/10 000ème	J. Velours
	Cox2	monoclonal/souris	1/500ème	Abcam (ref 110271)
	Cox4	monoclonal/souris	1/1 000ème	Abcam (ref 110272)
	Cytb	polyclonal/lapin	1/5 000ème	T.Langer
	Cytc	lapin	1/10 000ème	S. Manon
	Odc1	polyclonal/lapin	1/10 000ème	L. Palmieri
	Por1	monoclonal/souris	1/10 000ème	Molecular Probes (ref 459500)
	Sdh2			C. Dallabona
	Taz1	polyclonal/lapin	1/1 000ème	S. Claypool

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés.

C.8.4. Liste des anticorps utilisés

Les caractéristiques des anticorps utilisés dans ce travail sont détaillées au tableau 9

C.9. Analyse des lipides

Les lipides ont été extraits à partir de mitochondries isolées avec 2 mL d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Après centrifugation, la phase organique a été récupérée, et 2 mL de chloroforme ont été ajoutés à la phase organique pour récupérer les lipides restants. Après séparation des phases, les deux phases organiques récupérées sont regroupées et évaporées. Les lipides sont alors resuspendus dans une solution de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Des volumes équivalents à 50 µg de chaînes acyles sont déposés sur une plaque de silice. Les lipides polaires sont alors séparés par chromatographie sur couche mince à l'aide du solvant mis au point par Vitiello *et al.* (chloroforme/méthanol/1-propanol/méthyle acétate/0,25% KCl (10:4:10:10:3,6 en v/v (Vitiello *et al.*, 1978). Les lipides ont été localisés en plongeant la plaque de silice dans un bain de primuline (0,001% dans du PBS) et en observant cette plaque sous UV. Les zones correspondant aux lipides d'intérêt (PE, CL, PI et PC) ont été grattées afin d'en récupérer la silice. La silice récupérée est ensuite suspendue dans 1 mL de méthanol/H₂SO₄ 2,5% contenant 5 µg d'acide heptadécanoïque comme étalon interne. Les lipides contenus dans la silice ont été soumis à un chauffage pendant 1 h à 90°C, puis 1,5 mL d'eau et 400 µL d'hexane ont été ajoutés. Après centrifugation la phase hexane, contenant les acides gras estérifiés (FAMES *fatty acid methyl esters*), est récupérée. Les FAMES sont alors séparés par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une spectrométrie de masse (GC-MS) comme décrit dans (Testet *et al.* 2005).

D. Techniques de biologie cellulaire

D.1. Analyse ultrastructurale

Les protocoles d'inclusion et d'observation ont été mis au point par Bénédicte Salin

MATÉRIEL ET MÉTHODES

et Corinne Blancard, responsables du service d'imagerie cellulaire et moléculaire à l'institut (Blancard & Salin, 2017).

Les différentes souches de levures sont cultivées jusqu'à environ 2 UDO/mL (phase exponentielle de croissance) et culottées par centrifugation. Les culots sont placés sur des grilles de microscopie électronique en cuivre (400 mesh, *i.e.* 400 mailles/2.54 cm²), recouvertes de Formvar (film synthétique de polyvinyle). Chaque grille est rapidement plongée dans un bain de propane liquide, maintenu à -180°C avec de l'azote liquide. Les grilles sont alors transférées dans une solution à 4% de tétr oxyde d'osmium en solution dans de l'acétone anhydre pendant 72h. Les grilles sont ensuite remontées progressivement à température ambiante par paliers et lavées par trois bains successifs d'acétone anhydre. Puis les échantillons sont inclus progressivement dans une résine (Araldite, résine époxy Fluka). Des sections ultrafines de ces échantillons sont contrastées avec du citrate de plomb 1% en solution dans l'eau. Enfin, les coupes sont observées au microscope électronique à 80kV (modèle 7650, Hitachi), au Centre d'Imagerie de Bordeaux (BIC).

BIBLIOGRAPHIE

- Acehan, D. *et al.* Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys. J.* **100**, 2184–2192 (2011).
- Acehan, D. *et al.* Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *J. Biol. Chem.* **286**, 899–908 (2011).
- Ackerman, S. H. & Tzagoloff, A. Function, Structure, and Biogenesis of Mitochondrial ATP Synthase. in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **80**, 95–133 (Academic Press, 2005).
- Addo, M. G. *et al.* *Caenorhabditis elegans*, a pluricellular model organism to screen new genes involved in mitochondrial genome maintenance. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 765–773 (2010).
- Akbari, M., Visnes, T., Krokan, H. E. & Otterlei, M. Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA Repair* **7**, 605–616 (2008).
- Al Rawi, S. A. *et al.* Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission. *Science* **334**, 1144–1147 (2011).
- Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
- Andersson, S. G. E. *et al.* The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**, 133–140 (1998).
- Archibald, J. M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology* **25**, R911–R921 (2015).
- Ardail, D. *et al.* Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* **265**, 18797–18802 (1990).
- Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.-V. & Velours, J. ATP Synthase of Yeast Mitochondria Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 20284–20290 (1996).
- Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M., Peralta, S. & Moraes, C. T. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med.* **19**, 1111–1113 (2013).
- Baile, M. G., Whited, K. & Claypool, S. M. Deacylation on the matrix side of the mitochondrial inner membrane regulates cardiolipin remodeling. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2008–2020 (2013).
- Baile, M. G., Lu, Y.-W. & Claypool, S. M. The topology and regulation of cardiolipin biosynthesis and remodeling in yeast. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 25–31 (2014).
- Baile, M. G. *et al.* Unremodeled and remodeled cardiolipin are functionally indistinguishable in yeast. *J. Biol. Chem.* **289**, 1768–1778 (2014).

- Ban, T., Heymann, J. A. W., Song, Z., Hinshaw, J. E. & Chan, D. C. OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2113–2122 (2010).
- Bargmann, C. I. Genetic and Cellular Analysis of Behavior in *C. Elegans*. *Annual Review of Neuroscience* **16**, 47–71 (1993).
- Barouki, R. Stress oxydant et vieillissement. *Med Sci (Paris)* **22**, 266–272
- Barrientos, A. Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life* **55**, 83–95 (2003).
- Barth, P. G. *et al.* An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J. Neurol. Sci.* **62**, 327–355 (1983).
- Bayona-Bafaluy, M. P., Blits, B., Battersby, B. J., Shoubbridge, E. A. & Moraes, C. T. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14392–14397 (2005).
- Biederbick, A. *et al.* Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5675–5687 (2006).
- Bietenhader, M. *et al.* Experimental Relocation of the Mitochondrial ATP9 Gene to the Nucleus Reveals Forces Underlying Mitochondrial Genome Evolution. *PLoS Genet* **8**, (2012).
- Bione, S. *et al.* A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* **12**, 385–389 (1996).
- Bittner-Eddy, P., Monroy, A. F. & Brambl, R. Expression of Mitochondrial Genes in the Germinating Conidia of *Neurospora crassa*. *Journal of Molecular Biology* **235**, 881–897 (1994).
- Blancard, C. & Salin, B. Plunge Freezing: A Tool for the Ultrastructural and Immunolocalization Studies of Suspension Cells in Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp* (2017). doi:10.3791/54874
- Bogenhagen, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 914–920 (2012).
- Bolden, A., Noy, G. P. & Weissbach, A. DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *J. Biol. Chem.* **252**, 3351–3356 (1977).
- Bonnefoy, N. & Fox, T. D. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol. Biol.* **372**, 153–166 (2007).
- Bonnet, C. *et al.* The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1707–1717 (2008).
- Bourgeron, T. *et al.* Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat. Genet.* **11**, 144–149 (1995).
- Boyd, K. J., Alder, N. N. & May, E. R. Buckling Under Pressure: Curvature-Based Lipid Segregation and Stability Modulation in Cardiolipin-Containing Bilayers. *Langmuir* **33**, 6937–6946 (2017).

- Brandner, K. *et al.* Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5202–5214 (2005).
- Brown, M. D. *et al.* The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Hum Genet* **110**, 130–138 (2002).
- Buchanan, B. W., Lloyd, M. E., Engle, S. M. & Rubenstein, E. M. Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp* (2016). doi:10.3791/53975
- Bustillo-Zabalbeitia, I. *et al.* Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS ONE* **9**, e102738 (2014).
- Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* **14**, 1–15 (2004).
- Cadalbert, L. C. *et al.* Mouse Tafazzin Is Required for Male Germ Cell Meiosis and Spermatogenesis. *PLoS ONE* **10**, e0131066 (2015).
- Calvo, S. E. & Mootha, V. K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**, 25–44 (2010).
- Cao, J., Liu, Y., Lockwood, J., Burn, P. & Shi, Y. A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J. Biol. Chem.* **279**, 31727–31734 (2004).
- Case, J. T. & Wallace, D. C. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somat Cell Mol Genet* **7**, 103–108 (1981).
- Cavalier-Smith, T. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **503**, 55–71 (1987).
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644 (2009).
- Chance, B. & Williams, G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* **175**, 1120–1121 (1955).
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**, 527–605 (1979).
- Chan, K., Truong, D., Shangari, N. & O'Brien, P. J. Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**, 655–669 (2005).
- Chaussonot, A., Rötig, A. & Paquis-Flucklinger V. Progrès dans les pathologies mitochondriales. [https://extranet.chu-nice.fr/Mito.../45_Maladie_metab_PDF_IMP_ok_ch05\[1\].pdf](https://extranet.chu-nice.fr/Mito.../45_Maladie_metab_PDF_IMP_ok_ch05[1].pdf) (2011)
- Chaussonot, A., Paquis-Flucklinger V. Stratégie diagnostique des maladies mitochondriales. *Lettre du neurologue (La)*, XVI, 2, p. 45-50, (2012).
- Chen, J. X. & Yan, S. S. Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **20 Suppl 2**, S569-578 (2010).

- Chen, S., He, Q. & Greenberg, M. L. Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Mol. Microbiol.* **68**, 1061–1072 (2008).
- Chi, Z., Kohlwein S.D. & Paltauf, F. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **22**, 58–63 (1999)
- Chinnery, P. F., Howell, N., Lightowers, R. N. & Turnbull, D. M. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* **120 (Pt 10)**, 1713–1721 (1997).
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119–122 (1992).
- Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1197–1205 (2013).
- Claypool, S. M., McCaffery, J. M. & Koehler, C. M. Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *J. Cell Biol.* **174**, 379–390 (2006).
- Claypool, S. M., Boontheung, P., McCaffery, J. M., Loo, J. A. & Koehler, C. M. The cardiolipin transacylase, tafazzin, associates with two distinct respiratory components providing insight into Barth syndrome. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5143–5155 (2008).
- Claypool, S. M. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2059–2068 (2009).
- Claypool, S. M. & Koehler, C. M. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 32–41 (2012).
- Clayton, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693–705 (1982).
- Clayton, D. A. Replication and Transcription of Vertebrate Mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology* **7**, 453–478 (1991).
- Clayton, D. A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 217–232 (1992).
- Cosson, L. *et al.* Barth syndrome in a female patient. *Mol. Genet. Metab.* **106**, 115–120 (2012).
- Couplan, E. *et al.* A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *PNAS* **108**, 11989–11994 (2011).
- Coyne, L. P. & Chen, X. J. mPOS is a novel mitochondrial trigger of cell death - implications for neurodegeneration. *FEBS Lett.* (2017). doi:10.1002/1873-3468.12894
- Craven, L. *et al.* Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* **465**, 82–85 (2010).
- D'Adamo, P. *et al.* The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet* **61**, 862–867 (1997).

Daignan-Fornier, B., Valens, M., Lemire, B. D. & Bolotin-Fukuhara, M. Structure and regulation of SDH3, the yeast gene encoding the cytochrome b560 subunit of respiratory complex II. *J. Biol. Chem.* **269**, 15469–15472 (1994).

Dallabona, C. *et al.* Sym1, the yeast ortholog of the MPV17 human disease protein, is a stress-induced bioenergetic and morphogenetic mitochondrial modulator. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1098–1107 (2010).

D'Amico, D., Sorrentino, V. & Auwerx, J. Cytosolic Proteostasis Networks of the Mitochondrial Stress Response. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 712–725 (2017).

Dancy, B. M., Sedensky, M. M. & Morgan, P. G. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* **56**, 245–255 (2014).

Deffieu, M. *et al.* Increased levels of reduced cytochrome b and mitophagy components are required to trigger nonspecific autophagy following induced mitochondrial dysfunction. *J Cell Sci* **126**, 415–426 (2013).

Déquard-Chablat, M. *et al.* Two Nuclear Life Cycle–Regulated Genes Encode Interchangeable Subunits c of Mitochondrial ATP Synthase in *Podospira anserina*. *Mol Biol Evol* **28**, 2063–2075 (2011).

de Taffin de Tilques, M. *et al.* Overexpression of mitochondrial oxodicarboxylate carrier (ODC1) preserves oxidative phosphorylation in a yeast model of Barth syndrome. *Dis Model Mech* **10**, 439–450 (2017).

DeVay, R. M. *et al.* Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* **186**, 793–803 (2009).

Devenish, R. J., Prescott, M. & Rodgers, A. J. W. The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases. in *International Review of Cell and Molecular Biology* **267**, 1–58 (Academic Press, 2008).

DiMauro, S. & Davidzon, G. Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine* **37**, 222–232 (2005).

Donadieu, J. *et al.* Syndrome de Barth : le reconnaître, le traiter. Recommandations pour la prise en charge. *Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique* **2**, 154–160 (2014).

Dudek, J. *et al.* Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res* **11**, 806–819 (2013).

Dudek, J. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol* **5**, 90 (2017).

El-Hattab, A. W., Zarante, A. M., Almannai, M. & Scaglia, F. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol. Genet. Metab.* (2017). doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.009

Elson, J. L. *et al.* The presence of highly disruptive 16S rRNA mutations in clinical samples indicates a wider role for mutations of the mitochondrial ribosome in human disease. *Mitochondrion* **25**, 17–27 (2015).

- Emaus, R. K., Grunwald, R. & Lemasters, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **850**, 436–448 (1986).
- Embley, T. M. & Martin, W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**, 623–630 (2006).
- Ephrussi, B. & Slonimski, P. P. Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature* **176**, 1207–1208 (1955).
- Epstein, C. B. *et al.* Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol. Biol. Cell* **12**, 297–308 (2001).
- Ernster, L., Ikkos, D. & Luft, R. Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* **184**, 1851–1854 (1959).
- Esposti, M. D., Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Nakao, Y. & Dive, C. Proapoptotic Bid binds to monolysocardiolipin, a new molecular connection between mitochondrial membranes and cell death. *Cell Death Differ.* **10**, 1300–1309 (2003).
- Fiermonte, G. *et al.* Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* **276**, 8225–8230 (2001).
- Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
- Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P. E., Samulski, R. J. & Wallace, D. C. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther.* **12**, 570–578 (2005).
- Foriel, S., Willems, P., Smeitink, J., Schenck, A. & Beyrath, J. Mitochondrial diseases: *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate potential therapeutics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 60–65 (2015).
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. & Purnelle, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**, 325–331 (1998).
- Fromenty, B. *et al.* [Ageing, alcohol and mitochondria]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **24**, 349–358 (2000).
- Fry, M. & Green, D. E. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **256**, 1874–1880 (1981).
- Furukawa, K., Estus, S., Fu, W., Mark, R. J. & Mattson, M. P. Neuroprotective action of cycloheximide involves induction of bcl-2 and antioxidant pathways. *J. Cell Biol.* **136**, 1137–1149 (1997).
- Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, nrm3479 (2012).
- Gaspard, G. J. & McMaster, C. R. Cardiolipin metabolism and its causal role in the etiology of the inherited cardiomyopathy Barth syndrome. *Chem. Phys. Lipids* **193**, 1–10 (2015).

- Gebert, N. *et al.* Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr. Biol.* **19**, 2133–2139 (2009).
- Gilleron, M. Complexité des maladies mitochondriales : à partir de deux exemples. Médecine humaine et pathologie. Thèse-Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, (2014).
- Gomez, B. & Robinson, N. C. Quantitative determination of cardiolipin in mitochondrial electron transferring complexes by silicic acid high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **267**, 212–216 (1999).
- Gonzalvez, F. *et al.* Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1194–1206 (2013).
- Grandier-Vazeille, X. & Guérin, M. Separation by Blue Native and Colorless Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Oxidative Phosphorylation Complexes of Yeast Mitochondria Solubilized by Different Detergents: Specific Staining of the Different Complexes. *Analytical Biochemistry* **242**, 248–254 (1996).
- Gray, M. W. Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**, 678–687 (1999).
- Gray, M. W. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
- Gray, M. W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Mol. Biol. Cell* **28**, 1285–1287 (2017).
- Guérin, B., Labbe, P. & Somlo, M. Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Meth. Enzymol.* **55**, 149–159 (1979).
- Guimier, A. *et al.* Biallelic PPA2 Mutations Cause Sudden Unexpected Cardiac Arrest in Infancy. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 666–673 (2016).
- Gu, Z. *et al.* Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast *taz1* mutant: a model for Barth syndrome. *Molecular Microbiology* **51**, 149–158 (2004).
- Haines, T. H. & Dencher, N. A. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **528**, 35–39 (2002).
- Hauff, K. D. & Hatch, G. M. Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. *Prog. Lipid Res.* **45**, 91–101 (2006).
- Henderson, C. M., Zeno, W. F., Lerno, L. A., Longo, M. L. & Block, D. E. Fermentation temperature modulates phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol levels in the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5345–5356 (2013).
- Herrmann, J. M., Woellhaf, M. W. & Bonnefoy, N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 286–294 (2013).
- Hoek, J. B., Cahill, A. & Pastorino, J. G. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* **122**, 2049–2063 (2002).

- Hoffmann, B., Stöckl, A., Schlame, M., Beyer, K. & Klingenberg, M. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J. Biol. Chem.* **269**, 1940–1944 (1994).
- Holt, I. J., Cooper, J. M., Morgan-Hughes, J. A. & Harding, A. E. Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet* **1**, 1462 (1988).
- Hsu, Y.-H., Dumlao, D. S., Cao, J. & Dennis, E. A. Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. *PLoS ONE* **8**, e59267 (2013).
- Huang, Y. *et al.* The PPAR pan-agonist bezafibrate ameliorates cardiomyopathy in a mouse model of Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **12**, 49 (2017).
- Hübscher, U., Kuenzle, C. C. & Spadari, S. Functional roles of DNA polymerases beta and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 2316–2320 (1979).
- Hüttemann, M. *et al.* The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* **11**, 369–381 (2011).
- Insdorf, N. F. & Bogenhagen, D. F. DNA polymerase gamma from *Xenopus laevis*. II. A 3'----5' exonuclease is tightly associated with the DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21498–21503 (1989).
- Jiang, F. *et al.* Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **275**, 22387–22394 (2000).
- Jo, A. *et al.* Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9. *Biomed Res Int* **2015**, 305716 (2015).
- Johnson, S. C. *et al.* mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* **342**, 1524–1528 (2013).
- Joshi, A. S., Thompson, M. N., Fei, N., Hüttemann, M. & Greenberg, M. L. Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **287**, 17589–17597 (2012).
- Jovaisaite, V., Mouchiroud, L. & Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* **217**, 137–143 (2014).
- Kadenbach, B., Mende, P., Kolbe, H. v. j., Stipani, I. & Palmieri, F. The mitochondrial phosphate carrier has an essential requirement for cardiolipin. *FEBS Letters* **139**, 109–112 (1982).
- Kaguni, L. S. & Olson, M. W. Mismatch-specific 3'----5' exonuclease associated with the mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6469–6473 (1989).
- Kane, D. J. *et al.* Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274–1277 (1993).
- Kaufmann, P. *et al.* Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann. Neurol.* **40**, 172–180 (1996).

- Kawasaki, K. & Nishijima, M. [Biosynthesis and function of phosphatidylglycerol and cardiolipin in animal cells]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **44**, 1167–1172 (1999).
- Khuchua, Z., Yue, Z., Batts, L. & Strauss, A. W. A zebrafish model of human Barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function. *Circ. Res.* **99**, 201–208 (2006).
- Kiebish, M. A. *et al.* Dysfunctional cardiac mitochondrial bioenergetic, lipidomic, and signaling in a murine model of Barth syndrome. *J. Lipid Res.* **54**, 1312–1325 (2013).
- Kippert, F. A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of beta-galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 201–206 (1995).
- Kirkman, M. A. *et al.* Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* **132**, 2317–2326 (2009).
- Knopf, K. W., Yamada, M. & Weissbach, A. HeLa cell DNA polymerase gamma: further purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* **15**, 4540–4548 (1976).
- Koenig, M. & Mandel, J. L. Deciphering the cause of Friedreich ataxia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 689–694 (1997).
- Kolesnikova, O. A. *et al.* Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2519–2534 (2004).
- Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M. & Smeitink, J. A. M. Monogenic Mitochondrial Disorders. *New England Journal of Medicine* **366**, 1132–1141 (2012).
- Kuijpers, T. W. *et al.* Neutrophils in Barth syndrome (BTHS) avidly bind annexin-V in the absence of apoptosis. *Blood* **103**, 3915–3923 (2004).
- Kun, E., Kirsten, E. & Piper, W. N. Stabilization of mitochondrial functions with digitonin. *Meth. Enzymol.* **55**, 115–118 (1979).
- Kunkel, T. A. & Mosbaugh, D. W. Exonucleolytic proofreading by a mammalian DNA polymerase. *Biochemistry* **28**, 988–995 (1989).
- Kunkel, T. A. & Soni, A. Exonucleolytic proofreading enhances the fidelity of DNA synthesis by chick embryo DNA polymerase-gamma. *J. Biol. Chem.* **263**, 4450–4459 (1988).
- Kvell, K. *et al.* Molecular and Clinical Basics of Gerontology. University of Pécs. Digitális Tankönyvtár, (2011).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S. & Lin, W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* **10**, 703–713 (2000).

- Laloi-Michelin, M. *et al.* The clinical variability of maternally inherited diabetes and deafness is associated with the degree of heteroplasmy in blood leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 3025–3030 (2009).
- Lane, N. Serial endosymbiosis or singular event at the origin of eukaryotes? *Journal of Theoretical Biology* **434**, 58–67 (2017).
- Lane, N. & Martin, W. The energetics of genome complexity. *Nature* **467**, 929–934 (2010).
- Larsson, N. G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* **18**, 231–236 (1998).
- Lasserre, J.-P. *et al.* Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech* **8**, 509–526 (2015).
- Lecocq, J. & Ballou, C. E. ON THE STRUCTURE OF CARDIOLIPIN. *Biochemistry* **3**, 976–980 (1964).
- Lefebvre-Legendre, L. *et al.* F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol. Microbiol.* **47**, 1329–1339 (2003).
- Lesnefsky, E. J. *et al.* Ischemic Injury to Mitochondrial Electron Transport in the Aging Heart: Damage to the Iron–Sulfur Protein Subunit of Electron Transport Complex III. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**, 117–128 (2001).
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. Iron–sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 133–141 (2005).
- Lim, S. E., Longley, M. J. & Copeland, W. C. The Mitochondrial p53 Accessory Subunit of Human DNA Polymerase γ Enhances DNA Binding, Promotes Processive DNA Synthesis, and Confers N-Ethylmaleimide Resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 38197–38203 (1999).
- Liu, Z. & Butow, R. A. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6720–6728 (1999).
- Longtine, M. S. *et al.* Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961 (1998).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
- Lu, B. *et al.* Complex expression pattern of the Barth syndrome gene product tafazzin in human cell lines and murine tissues. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 569–576 (2004).
- Lutter, M. *et al.* Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **2**, 754–761 (2000).
- Lu, Y.-W. *et al.* Defining functional classes of Barth syndrome mutation in humans. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 1754–1770 (2016).
- Ma, B. J. & Hatch, G. M. Monolysocardiolipin acyltransferase activity: effect of insulin and localization of activity. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **43**, 39–41 (2000).

Maglioni, S. & Ventura, N. C. *elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders. *Mitochondrion* **30**, 117–125 (2016).

Malhotra, A. *et al.* Role of calcium-independent phospholipase A2 in the pathogenesis of Barth syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 2337–2341 (2009).

Malhotra, A., Kahlon, P., Donoho, T. & Doyle, I. C. Pharmacogenomic considerations in the treatment of the pediatric cardiomyopathy called Barth syndrome. *Recent Pat Biotechnol* **8**, 136–143 (2014).

Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M. & Schlame, M. Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin. 1. A novel transacylation mechanism to shuttle fatty acids between sn-1 and sn-2 positions of multiple phospholipid species. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 314–320 (2009).

Ma, L., Vaz, F. M., Gu, Z., Wanders, R. J. A. & Greenberg, M. L. The Human TAZ Gene Complements Mitochondrial Dysfunction in the Yeast *taz1Δ* Mutant IMPLICATIONS FOR BARTH SYNDROME. *J. Biol. Chem.* **279**, 44394–44399 (2004).

Mandavilli, B. S., Santos, J. H. & Van Houten, B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **509**, 127–151 (2002).

Martin, W. & Müller, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37–41 (1998).

Martin, W. F., Garg, S. & Zimorski, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, (2015).

Matsukage, A., Bohn, E. W. & Wilson, S. H. On the DNA polymerase III of mouse myeloma: partial purification and characterization. *Biochemistry* **14**, 1006–1020 (1975).

Matsukage, A. & Nishimoto, Y. Coprecipitation of 3'→5' Exonuclease and DNA Polymerase γ with Anti-DNA Polymerase γ Antibody. *The Journal of Biochemistry* **107**, 213–216 (1990).

McKee, E. E., Ferguson, M., Bentley, A. T. & Marks, T. A. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2042–2049 (2006).

McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* **361**, 462–469 (2006).

Mejia, E. M., Nguyen, H. & Hatch, G. M. Mammalian cardiolipin biosynthesis. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 11–16 (2014).

Mejia, E. M., Ibdah, J. A., Sparagna, G. C. & Hatch, G. M. Differential reduction in cardiac and liver monolysocardiolipin acyltransferase-1 and reduction in cardiac and liver tetralinoleoyl-cardiolipin in the α -subunit of trifunctional protein heterozygous knockout mice. *Biochem. J.* **471**, 123–129 (2015).

Mereschkowsky (1905), voir : Martin, W. & Kowallik, K. Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *European Journal of Phycology* **34**, 287–295 (1999).

Mileykovskaya, E., Zhang, M. & Dowhan, W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry Mosc.* **70**, 154–158 (2005).

- Minskoff, S. A. & Greenberg, M. L. Phosphatidylglycerophosphate synthase from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 187–191 (1997).
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
- Mochel, F. *et al.* Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 652–660 (2008).
- Murdock, D. G., Boone, B. E., Esposito, L. A. & Wallace, D. C. Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *J. Biol. Chem.* **274**, 14429–14433 (1999).
- Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1–13 (2009).
- Musat-Marcu, S., Gunter, H. E., Jugdutt, B. I. & Docherty, J. C. Inhibition of apoptosis after ischemia-reperfusion in rat myocardium by cycloheximide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 1073–1082 (1999).
- Nakada, K. & Hayashi, J.-I. Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp. Anim.* **60**, 421–431 (2011).
- Nass, M. M. K. & Nass, S. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *J Cell Biol* **19**, 593–611 (1963).
- Ndebele, K. *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipid scramblase-3. *Apoptosis* **13**, 845–856 (2008).
- Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749 (2007).
- Neustein, H. B., Lurie, P. R., Dahms, B. & Takahashi, M. An X-Linked Recessive Cardiomyopathy with Abnormal Mitochondria. *Pediatrics* **64**, 24–29 (1979).
- Neuwald, A. F. Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency. *Curr. Biol.* **7**, R465-466 (1997).
- Nunnari, J. *et al.* Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1233–1242 (1997).
- Oca-Cossio, J., Kenyon, L., Hao, H. & Moraes, C. T. Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics* **165**, 707–720 (2003).
- Okamoto, K., Perlman, P. S. & Butow, R. A. The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J. Cell Biol.* **142**, 613–623 (1998).
- Ong, W.-Y., Farooqui, T., Kokotos, G. & Farooqui, A. A. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. *ACS Chem Neurosci* **6**, 814–831 (2015).

- Ou, W. J., Ito, A., Umeda, M., Inoue, K. & Omura, T. Specific binding of mitochondrial protein precursors to liposomes containing cardiolipin. *J. Biochem.* **103**, 589–595 (1988).
- Pagliarini, D. J. & Dixon, J. E. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 26–34 (2006).
- Pagliarini, D. J., Worby, C. A. & Dixon, J. E. A PTEN-like Phosphatase with a Novel Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **279**, 38590–38596 (2004).
- Pallet, N., Beaune, P., Legendre, C. & Anglicheau, D. Rapamycine et inhibition de mTOR : des voies de signalisation aux applications cliniques. *Ann Biol Clin ; 64 (2) : 107-15*, (2006).
- Palmer, J. D. Genome evolution. The mitochondrion that time forgot. *Nature* **387**, 454–455 (1997).
- Palmer, J. D. Organelle Genomes--Going, Going, Gone. *Science* **275**, 790–790 (1997).
- Pangborn, M. C. Isolation and Purification of a Serologically Active Phospholipid from Beef Heart. *J. Biol. Chem.* **143**, 247–256 (1942).
- Patil, V. A., Fox, J. L., Gohil, V. M., Winge, D. R. & Greenberg, M. L. Loss of cardiolipin leads to perturbation of mitochondrial and cellular iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **288**, 1696–1705 (2013).
- Paumard, P. *et al.* The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221–230 (2002).
- Peng, M. *et al.* Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4829–4847 (2015).
- Pfeffer, G., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D. & Chinnery, P. F. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* CD004426 (2012). doi:10.1002/14651858.CD004426.pub3
- Pitayu, L. *et al.* Combined use of *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* and patient fibroblasts leads to the identification of clofilium tosylate as a potential therapeutic chemical against POLG-related diseases. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 715–727 (2016).
- Priault, M., Bessoule, J.-J., Grelaud-Coq, A., Camougrand, N. & Manon, S. Bax-induced cell death in yeast depends on mitochondrial lipid oxidation. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5440–5450 (2002).
- Qiang, B., Hamamah, S. & De Vos, J. [Induced pluripotent stem cells: youthful indiscretions]. *Med Sci (Paris)* **27**, 805–807 (2011).
- Rak, M. *et al.* A Yeast Model of the Neurogenic Ataxia Retinitis Pigmentosa (NARP) T8993G Mutation in the Mitochondrial ATP Synthase-6 Gene. *J. Biol. Chem.* **282**, 34039–34047 (2007).
- Rea, S. L., Graham, B. H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A. & Falk, M. J. Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* **16**, 200–218 (2010).
- Reichert, A. S. & Neupert, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.* **20**, 555–562 (2004).

- Rigoulet, M. & Guerin, B. Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria. *FEBS Letters* **102**, 18–22 (1979).
- Robinson, N. C., Dale, M. P. & Talbert, L. H. Subunit analysis of bovine cytochrome c oxidase by reverse phase high performance liquid chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 239–244 (1990).
- Rocheleau, C. E. *et al.* Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707–716 (1997).
- Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* **370**, 751–762 (2003).
- Rubio, M. A. T. *et al.* Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9186–9191 (2008).
- Ruiz-Pesini, E. *et al.* [Diseases of the human mitochondrial oxidative phosphorylation system]. *Rev Neurol* **43**, 416–424 (2006).
- Rutherford, J. C., Jaron, S. & Winge, D. R. Aft1p and Aft2p Mediate Iron-responsive Gene Expression in Yeast through Related Promoter Elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 27636–27643 (2003).
- Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**, 225-IN6 (1967).
- Saric, A., Andreau, K., Armand, A.-S., Møller, I. M. & Petit, P. X. Barth Syndrome: From Mitochondrial Dysfunctions Associated with Aberrant Production of Reactive Oxygen Species to Pluripotent Stem Cell Studies. *Front Genet* **6**, 359 (2015).
- Sauerwald, J. *et al.* Genome-Wide Screens in *Saccharomyces cerevisiae* Highlight a Role for Cardiolipin in Biogenesis of Mitochondrial Outer Membrane Multispan Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3200–3211 (2015).
- Schägger, H. & von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223–231 (1991).
- Scharfe, C. *et al.* Mapping Gene Associations in Human Mitochondria using Clinical Disease Phenotypes. *PLoS Comput Biol* **5**, (2009).
- Schatz, G. The isolation of possible mitochondrial precursor from aerobically grown baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 448–451 (1963).
- Schlame, M. & Haldar, D. Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 74–79 (1993).
- Schlame, M., Brody, S. & Hostetler, K. Y. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. *European Journal of Biochemistry* **212**, 727–733 (1993).
- Schlame, M., Rua, D. & Greenberg, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **39**, 257–288 (2000).
- Schlame, M. *et al.* Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann. Neurol.* **51**, 634–637 (2002).

- Schlame, M. *et al.* Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* **42**, 1994–1999 (2003).
- Schlame, M. *et al.* Comparison of cardiolipins from *Drosophila* strains with mutations in putative remodeling enzymes. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 512–519 (2012).
- Schlame, M. *et al.* The mechanism of acyl specific phospholipid remodeling by tafazzin. *Nat Chem Biol* **8**, 862–869 (2012).
- Schlame, M. Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 582–588 (2013).
- Schlattner, U. *et al.* Mitochondrial cardiolipin/phospholipid trafficking: the role of membrane contact site complexes and lipid transfer proteins. *Chem. Phys. Lipids* **179**, 32–41 (2014).
- Schwall, C. T., Greenwood, V. L. & Alder, N. N. The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**, 1588–1596 (2012).
- Schwimmer, C. *et al.* Increasing mitochondrial substrate-level phosphorylation can rescue respiratory growth of an ATP synthase-deficient yeast. *J. Biol. Chem.* **280**, 30751–30759 (2005).
- Sedlák, E. & Robinson, N. C. Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* **38**, 14966–14972 (1999).
- Sen, A. & Cox, R. T. Fly Models of Human Diseases: *Drosophila* as a Model for Understanding Human Mitochondrial Mutations and Disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **121**, 1–27 (2017).
- Shabalina, I. G. *et al.* UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Reports* **5**, 1196–1203 (2013).
- Shindou, H. & Shimizu, T. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **284**, 1–5 (2009).
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J. Biol. Chem.* **266**, 10047–10049 (1991).
- Sinclair, J. H. & Stevens, B. J. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 508–514 (1966).
- Skladal, D. *et al.* The Clinical Spectrum of Mitochondrial Disease in 75 Pediatric Patients. *Clin Pediatr (Phila)* **42**, 703–710 (2003).
- Soriano, A., Miró, O. & Mensa, J. Mitochondrial toxicity associated with linezolid. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2305–2306 (2005).
- Soustek, M. S. *et al.* Characterization of a transgenic short hairpin RNA-induced murine model of Tafazzin deficiency. *Hum. Gene Ther.* **22**, 865–871 (2011).
- Subathra, M. *et al.* Complete mitochondrial genome analysis and clinical documentation of a five-generational Indian family with mitochondrial 1555A>G mutation and postlingual hearing loss. *Ann. Hum. Genet.* **78**, 217–234 (2014).

- Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
- Tamura, Y. *et al.* Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* **17**, 709–718 (2013).
- Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S. & Huang, T. Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion* **10**, 350–357 (2010).
- Taylor, W. A. & Hatch, G. M. Purification and characterization of monolysocardiolipin acyltransferase from pig liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 12716–12721 (2003).
- Taylor, W. A. & Hatch, G. M. Identification of the human mitochondrial linoleoyl-coenzyme A monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1). *J. Biol. Chem.* **284**, 30360–30371 (2009).
- Taylor, W. A. *et al.* Human trifunctional protein alpha links cardiolipin remodeling to beta-oxidation. *PLoS ONE* **7**, e48628 (2012).
- Tell, G., Damante, G., Caldwell, D. & Kelley, M. R. The Intracellular Localization of APE1/Ref-1: More than a Passive Phenomenon? *Antioxidants & Redox Signaling* **7**, 367–384 (2005).
- Testet, E. *et al.* Ypr140wp, ‘the yeast tafazzin’, displays a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochemical Journal* **387**, 617–626 (2005).
- Tibbetts, A. S., Sun, Y., Lyon, N. A., Ghrist, A. C. & Trotter, P. J. Yeast mitochondrial oxodicarboxylate transporters are important for growth on oleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 96–104 (2002).
- Tonin, Y. & Entelis, N. [Mitochondrial DNA diseases and therapeutic strategies]. *Med Sci (Paris)* **30**, 1101–1109 (2014).
- Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).
- Trott, A. & Morano, K. A. SYM1 is the stress-induced *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the mammalian kidney disease gene Mpv17 and is required for ethanol metabolism and tolerance during heat shock. *Eukaryotic Cell* **3**, 620–631 (2004).
- Trotter, P. J. *et al.* Mitochondrial transporters involved in oleic acid utilization and glutamate metabolism in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **442**, 21–32 (2005).
- Tsang, W. Y. & Lemire, B. D. The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1638**, 91–105 (2003).
- Tynismaa, H. *et al.* 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 (2005).
- Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R. B. & Zulch, G. Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **250**, 8236–8242 (1975).

- Ugarte-Urbe, B., Müller, H.-M., Otsuki, M., Nickel, W. & García-Sáez, A. J. Dynamin-related Protein 1 (Drp1) Promotes Structural Intermediates of Membrane Division. *J Biol Chem* **289**, 30645–30656 (2014).
- Vafai, S. B. & Mootha, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374–383 (2012).
- Valianpour, F. *et al.* Monolysocardiolipins accumulate in Barth syndrome but do not lead to enhanced apoptosis. *J. Lipid Res.* **46**, 1182–1195 (2005).
- Valianpour, F. *et al.* Linoleic acid supplementation of Barth syndrome fibroblasts restores cardiolipin levels implications for treatment. *J. Lipid Res.* **44**, 560–566 (2003).
- van der Laan, M. *et al.* Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1152–1159 (2007).
- Vaz, F. M., Houtkooper, R. H., Valianpour, F., Barth, P. G. & Wanders, R. J. A. Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 43089–43094 (2003).
- van der Laan, M. *et al.* A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Curr. Biol.* **16**, 2271–2276 (2006).
- Ventura, N. & Rea, S. L. Caenorhabditis elegans mitochondrial mutants as an investigative tool to study human neurodegenerative diseases associated with mitochondrial dysfunction. *Biotechnol J* **2**, 584–595 (2007).
- Vigié, P. & Camougrand, N. [Role of mitophagy in the mitochondrial quality control]. *Med Sci (Paris)* **33**, 231–237 (2017).
- Vinet, L. *et al.* Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H352–360 (2008).
- Vitiello, F. & Zanetta, J. P. Thin-layer chromatography of phospholipids. *J. Chromatogr.* **166**, 637–640 (1978).
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* **175**, 237–247 (2006).
- von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T. & McManus, W. R. Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature* **412**, 433–436 (2001).
- Vreken, P. *et al.* Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 378–382 (2000).
- Walker, J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions* **41**, 1–16 (2013).
- Wallace, D. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427–1430 (1988).

- Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482–1488 (1999).
- Wallace, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics* **39**, 359–407 (2005).
- Wallace, D. C., Fan, W. & Procaccio, V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* **5**, 297–348 (2010).
- Wang, G. *et al.* Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat. Med.* **20**, 616–623 (2014).
- Wang, H.-Y. J., Jackson, S. N. & Woods, A. S. Direct MALDI-MS analysis of cardiolipin from rat organs sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 567–577 (2007).
- Wang, L. *et al.* ALCAT1 controls mitochondrial etiology of fatty liver diseases, linking defective mitophagy to steatosis. *Hepatology* **61**, 486–496 (2015).
- Wang, X., Zuo, X., Kucejova, B. & Chen, X. J. Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1090–1097 (2008).
- Wang, X. & Chen, X. J. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* **524**, 481–484 (2015).
- Ward, B. L., Anderson, R. S. & Bendich, A. J. The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell* **25**, 793–803 (1981).
- Wenz, T. *et al.* Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 609–616 (2009).
- Wernette, C. M. & Kaguni, L. S. A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure, and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **261**, 14764–14770 (1986).
- Whited, K., Baile, M. G., Currier, P. & Claypool, S. M. Seven functional classes of Barth syndrome mutation. *Hum Mol Genet* **22**, 483–492 (2013).
- Williamson, D. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature Reviews Genetics* **3**, nrg814 (2002).
- Xu, Y., Sutachan, J. J., Plesken, H., Kelley, R. I. & Schlame, M. Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab Invest* **85**, 823–830 (2005).
- Xu, Y., Malhotra, A., Ren, M. & Schlame, M. The enzymatic function of tafazzin. *J. Biol. Chem.* **281**, 39217–39224 (2006).
- Xu, Y. *et al.* Loss of protein association causes cardiolipin degradation in Barth syndrome. *Nat Chem Biol* **12**, 641–647 (2016).
- Yankovskaya, V. *et al.* Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science* **299**, 700–704 (2003).

Yarham, J. W., Elson, J. L., Blakely, E. L., McFarland, R. & Taylor, R. W. Mitochondrial tRNA mutations and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 304–324 (2010).

Yotsuyanagi, Y. & Guerrier, C. Demonstration by biochemical technics and electron microscopy of desoxyribonucleic acid in mitochondria and protoplasts of *Allium cepa*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **260**, 2344–2347 (1965).

Zaremba-Niedzwiedzka, K. *et al.* Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* **541**, 353–358 (2017).

Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 43553–43556 (2002).

Zhao, Y., Chen, Y.-Q., Li, S., Konrad, R. J. & Cao, G. The microsomal cardiolipin remodeling enzyme acyl-CoA lysocardiolipin acyltransferase is an acyltransferase of multiple anionic lysophospholipids. *J. Lipid Res.* **50**, 945–956 (2009).

Zheng, X. *et al.* Alleviation of neuronal energy deficiency by mTOR inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *Elife* **5**, (2016).