



HAL
open science

Régulation de la fonction mitochondriale par le rapport NADH/NAD⁺ : le rôle clef du complexe I

Géraldine Leman

► **To cite this version:**

Géraldine Leman. Régulation de la fonction mitochondriale par le rapport NADH/NAD⁺ : le rôle clef du complexe I. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0016 . tel-01779942

HAL Id: tel-01779942

<https://theses.hal.science/tel-01779942>

Submitted on 27 Apr 2018

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 de Doctorat

Géraldine LEMAN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biochimie

Unité de recherche : BNMI UMR 6214 – INSERM 1083
Laboratoire de Biologie Neurovasculaire & Mitochondrial Intégrée

Soutenue le 16 Décembre 2014
Thèse N° : 1439

Régulation de la fonction mitochondriale par le rapport NADH/NAD⁺ : le rôle clé du complexe I

JURY

Rapporteurs : **Mme. Chantal WRUTNIAK CABELLO**, Directeur de Recherche 2 (INRA), Université Montpellier
M. Rodrigue ROSSIGNOL, Directeur de Recherche (INSERM), Université Bordeaux

Examineurs : **Mme. Valérie NIVET**, Maître de conférences - Praticien Hospitalier - Université Paris
M. Pascal REYNIER, Professeur, Université Angers
M. Daniel HENRION, Directeur de Recherche 1, Université Angers

Directeur de Thèse : **M. Vincent PROCACCIO**, Professeur, Université Angers

Co-Encadrant de Thèse : **Mme. Valérie DESQUIRET-DUMAS**, Docteur en Sciences, Université Angers
Mme. Naïg GUEGUEN, Docteur en Sciences, Université Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon



les conditions suivantes :

- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Remerciements

La thèse n'est pas un travail solitaire et il me sera très difficile de remercier tout le monde, tant de personnes m'ont aidé au cours de ces trois années.

Tout d'abord, merci au professeur Daniel HENRION de m'avoir accueillie dans son unité de recherche.

J'exprime mes remerciements à l'ensemble des membres de mon Jury : Madame Chantal WRUTNIAK, Madame Valérie NIVET-ANTOINE ainsi que Monsieur Rodrigue ROSSIGNOL, qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

Je tiens aussi à remercier Pascal REYNIER, pour son implication dans mon jury de thèse et pour sa contribution scientifique tout au long du projet.

Je souhaite remercier le professeur Vincent PROCACCIO, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'être mon directeur de thèse. Je vous suis reconnaissante du temps que vous avez pu me consacrer, de votre patience, de vos encouragements... J'ai beaucoup appris à vos côtés et suis honorée de vous avoir eu pour encadrant.

Merci aux docteurs Valérie Desquirit-Dumas et Naïg GUEGUEN, de m'avoir aussi bien encadrée durant cette thèse. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Votre motivation sans faille, vos encouragements, votre disponibilité, votre complémentarité m'ont permis de réaliser ma thèse dans des conditions optimales. L'intérêt et plaisir que vous avez à exercer votre métier et que vous avez su me communiquer ont eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel.

Je souhaite aussi vous remercier pour tous les petits à côtés de la thèse sans lesquels ce travail n'aurait jamais abouti (notamment le squash).

Merci pour votre soutien malgré mes débuts difficiles, la série des jeudis maudits : centrifugeuse, plaque chauffant.

Bref, je suis heureuse que vous fassiez ainsi partie des personnes qui ont marqué ma vie aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier Marcia Haigis pour avoir pour ces conseils avisés lors de mon comité de suivi de thèse.

Je souhaite aussi remercier Céline WETTERWALD, d'avoir participé à cette thèse aussi bien sur le plan technique (dosage de complexes, BN-Page...) que sur le plan personnel (nombreux repas dans et hors du labo, discussions...).

Merci à Stéphanie CHUPIN, pour les discussions, confidences de cultures.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué ses résultats : Jennifer, Arnaud, Marc, Cédric, Lydie, Mélanie, Lucie, Carole, Delphine, Corinne, Marie-Hélène.

Je souhaite aussi remercier mes colloqs de bureau et de Baroque Party et particulièrement Selma et Amélie, ainsi que les gars Guillaume, Samuel et Aurélien et l' « IRON TEAM » : Manu et Thomas.

Pour finir, je remercie tous ceux qui m'ont soutenu en dehors du labo, mes p'tites potes (Camcam, Popo et Gwenn) ainsi que la blonde pour ne citer qu'elles. Et ceux qui me soutiennent depuis toujours et qui sont toujours là pour moi : ma FAMILLE et tout particulièrement mes parents, ma sœur, ma cousine jumelle, ma marraine, mes grand-parents... Merci à vous de m'avoir permis de tenir et de sortir régulièrement la tête de la thèse.

Enfin au marin, Briag, qui a découvert grâce à ma thèse, qu'il existe des mitochondries et pour qui les sirtuines sont des protéines qui enlèvent des sacs à dos pour que les autres protéines aillent plus vites. Et qui n'a cessé de me répéter au cours de ces trois années : «Tu vas y arriver et quoi qu'il arrive je serais fière de toi!» J'espère pouvoir, un jour, être aussi présente et disponible que tu ne l'as été pour moi.

Abréviations

α CGDH	alpha-CétoGlutarate Déshydrogénase
Δp	force protomotrice
$\Delta\Psi$	Potentiel de membrane
ACC	Acétyl-CoA-carboxylase
Acyl CoA	Acétyl CoEnzyme A
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ADP	Adénosine-5-Diphosphate
AMP	Adénosine 5'-Monophosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ANT	Translocase de l'Adénine Dinucléotide
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ATP	Adénosine-5-TriPhosphate
BNMI	Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée
CNRS	Centre National de la recherche Scientifique
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CoA	CoEnzyme A
CoA-SH	CoEnzyme A
COX	Cytochrome C oxidoréductase
CPT	Carnitine PalmitylTransférase
CPT1	Carbamoyl phosphate Synthétase 1
CS	Citrate synthase
CtBP	C-terminal Binding Protein
DPI	Diphénylenhéiodonium
e ⁻	électrons
E.Coli	Escherichia Coli
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADH ₂	forme réduite de la Flavine Adénine Dinucléotide
Fe-S	Fer-Souffre
Fe-S	centre Fer-Souffre
FeCN	Ferricyanure
FMN	Flavine Mononucléotide
FMNH ⁻	Flavine Mononucléotide Semiquinone
FOXO	Forkhead box O
FOXRED1	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1
G3PDH	Glycérol-3-phosphate
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfide ou glutathion oxydé
GTP	Guanosine TriPhosphate
H ⁺	Proton
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'Hydrogène
HAR	Héxaammineruthernium III
HEL	Hen egg lysozime
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
HPLC	High performance liquid chromatography
HSP	Promoteur du brin lourd
ICDH	IsoCitrate Déshydrogénase
INSERM	Institut National de la santé et de la Recherche Médicale

JNK	Jun kinase
kDa	Kilo Dalton
Km	Constante de Michaelis
KO	Knowck-Out
LCAD	Long Chain AcylCoA Deshydrogenase
LDH	Lactate DésHydrogénase
LHON	Neuropathie Héréditaire de Leber
LKB1	Liver Kinase 1
LSP	Promoteur du brin léger
M	molaire
MAPK	MAP-Kinase
MCAD	Medium Chain AcylCoA Deshydrogenase
Mda	Méga Dalton
MDH	Malate Déshydrogénase
Mg ²⁺	Magnésium
mi-RNA	micro-ARN
MnSOD	Manganèse Superoxyde Dismutase
mt	Mitochondrial
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mtTFAM	Facteur de Transcription Mitochondrial A
NA	Nicotinique Acide
NA ⁺	ion Sodium
NAAD	Acide Nitotinique Dinucléotide
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	forme réduite du Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NADS NAD	Synthase
NAM	Nicotinamide
NAMPT	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase
NAMN	Acide nicotinique mononucléotide
NAPRT	Nicotinique acide Phosphoribosyltransferase
ND	NADH dehydrogenase
NDUFA	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex
NDUFAF	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex assembly factor
NDUFB	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 bêta subcomplex
NDUFS	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein
NDUFV	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein
NMN	Nicotinamide Mononucléotide
NMNAT	Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase
NO	Azote
NR	Nicotinamide Ribose
NRF-1	Facteur Nucléaire de Respiration-1
NRF-2	Facteur Nucléaire de Respiration-2
NUR	NADH Ubiquinone Reductase
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Anion SuperOxyde
OH.	Radical hydroxyle
OPA-1	Atrophie Optique-1
OSCP	Protéine conférant la sensibilité à l'Oligomycine

PARP	poly(ADP ribose) Polymerase
PDC	Complexe Pyruvate Déshydrogénase
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK	Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PDP	Pyruvate Déshydrogénase Phosphatase
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 alpha
pH	potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
PKA	Protéine Kinase A
pKa	constante d'acidité
Q \cdot	semiquinone
Q10	CoEnzyme Q10
QRPT	Quinolate Phosphoribosyl transferase
RGC	cellules ganglionnaires de la rétine
ROS	Espèce Réactives de l'Oxygène
RSV	Resveratrol
SCAD	Short Chain AcylCoA Deshydrogenase
SDH	Succinate déshydrogenase
SDHA	Succinate Déshydrogénase A
SDHB	Succinate Déshydrogénase B
SDHC	Succinate Déshydrogénase C
SDHD	Succinate Déshydrogénase D
SOD	Dismutase
SOD1	Cuivre Zinc SuperOxyde Dismutase
SOD2	Manganèse Superoxyde Dismutase
TIM	Translocase de la Membrane Interne
TOM	Translocase de la Membrane Externe
UCP	Protéine découplante
UQCR	Ubiquinol cytochrome C réductase
UV	Ultra-Violet
V	Volt
VDAC	Canal à anions dépendant du voltage
VLCAD	Very long chain acyl déshydrogénase

Avant propos

Mon travail de thèse a été mené au sein de l'unité mixte de recherche CNRS 6214-INSERM 1083 dirigée par le Professeur Daniel HENRION. Ma thèse a été réalisée, sous la direction du Professeur Vincent PROCACCIO et co-encadrée par les docteurs Valérie DESQUIRET-DUMAS et Naïg GUEGUEN, dans la partie Mitolab, spécialisée dans la recherche sur les pathologies mitochondriales héréditaires.

L'un des axes de recherche du laboratoire est la compréhension des mécanismes biochimiques et cellulaires impliqués dans la physiopathologie des maladies mitochondriales, dans le but de développer de nouvelles molécules thérapeutiques. Le déficit du complexe I est le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire le plus fréquemment observé au sein des pathologies mitochondriales. Au niveau catalytique, le complexe I est notamment impliqué dans l'oxydation du NADH générant ainsi du NAD⁺. Le NAD⁺ apparaît comme un cofacteur indispensable à l'activité de nombreuses enzymes mitochondriales. Ces enzymes sont à la fois impliquées dans le métabolisme énergétique (β -oxydation des acides gras, cycle de Krebs), mais aussi dans la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (α -cétoglutarate déshydrogénase, complexe I). De plus, le NAD⁺ est le cofacteur des sirtuines, des déacétylases NAD⁺ dépendantes, parmi lesquelles SIRT3 est la principale isoforme mitochondriale. L'acétylation/déacétylation de protéines cibles représenterait un mécanisme prépondérant de régulation de la fonction mitochondriale puisque 20% des protéines de ce compartiment possèdent un site d'acétylation.

Par ses actions sur la production de ROS ou sur le métabolisme énergétique, ainsi qu'en tant que cofacteur, (notamment des sirtuines), le NAD⁺ semble donc un modulateur clé de la fonction mitochondriale. Le complexe I représente la principale NADH déshydrogénase mitochondriale, cependant, la relation entre l'activité du complexe I et le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial reste très peu étudiée. Mon projet de thèse a donc consisté à

étudier le rôle du complexe I dans la régulation du rapport NADH/NAD⁺ et l'impact d'une variation de ce rapport sur le fonctionnement mitochondrial.

La première partie de ma thèse est consacrée à l'étude bibliographique du métabolisme mitochondrial, de sa régulation, ainsi que l'analyse des voies d'action du NAD⁺, et de la relation possible entre rapport NADH/NAD⁺ et l'activité du complexe I .

La seconde partie de ce manuscrit expose les travaux que nous avons menés sur la modulation du rapport NADH/NAD⁺ et son impact sur le métabolisme mitochondrial dans des modèles cellulaires et murins, en situations physiologiques ou pathologiques. Ce travail est divisé en deux volets, d'une part une situation d'augmentation de l'activité du complexe I et du ratio NADH/NAD⁺ induite de façon pharmacologique, de l'autre une situation de diminution de l'activité du complexe I, induite par la présence de mutation dans des sous-unités de ce complexe.

Dans un premier temps, nous avons montré sur un modèle cellulaire et murin qu'une augmentation de l'activité du complexe I grâce au resveratrol diminue le rapport NADH/NAD⁺, entraînant ainsi une stimulation du métabolisme énergétique mitochondrial par l'intermédiaire de la protéine SIRT3 (Article 1). En fonction du tissu considéré, le resveratrol peut également induire la production de ROS par le complexe I. Ce travail est décrit dans l'article 2.

Dans un deuxième temps, nous avons montré, sur des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans des sous-unités du complexe I, que la diminution de l'oxydation du NADH augmentait le rapport NADH/NAD⁺ (articles 3 et 4), conduisant à une hyperacétylation des cibles de SIRT3 (article 4). Ce travail a, de plus, permis d'identifier la modulation du rapport NADH/NAD⁺ comme une cible thérapeutique potentielle chez les patients présentant un déficit en complexe I et un déséquilibre du rapport NADH/NAD⁺ (Article 4).

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	II
ABREVIATIONS	IV
AVANT PROPOS	VIII
SOMMAIRE	X
INTRODUCTION	0
I. LA MITOCHONDRIE : STRUCTURE - FONCTION	1
I.1. HISTORIQUE - ORIGINE	1
I.2. STRUCTURE	1
I.3. METABOLISME ET PHOSPHORYLATION OXYDATIVE	3
II. REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE	13
II.1. REGULATION DE L'EFFICACITE DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE	13
II.2. REGULATION ALLOSTERIQUE	14
II.3. LA REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE	17
II.4. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE : LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE	19
III. ALTERATIONS DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	20
III.1. LE VIEILLISSEMENT	20
III.2. LES MALADIES MITOCHONDRIALES	22
IV. LE COMPLEXE I, CIBLE ET MOTEUR DE REGULATION	26
IV.1. ASSEMBLAGE DU COMPLEXE I	26
IV.2. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DU COMPLEXE I	28
IV.3. LA PRODUCTION DE ROS	31
IV.4. COMPLEXE I REGULATEUR DU METABOLISME MITOCHONDRIAL	34
V. LES SIRTUINES	36

V.1. GENERALITES (STRUCTURE, FONCTION)	36
V.2. LES DIFFERENTES ISOFORMES	38
V.3. LES CIBLES DES SIRTUINES	40
V.4. REGULATIONS DES SIRTUINES	41
V.5. LES SIRTUINES SENSEURS DU METABOLISME	43
VI. MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE L'ACTIVITE DES SIRTUINES : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ?	43
VI.1. LE RESVERATROL	43
VI.2. MODULATION DU RAPPORT NADH/NAD ⁺	46
<u>PROBLEMATIQUE DE LA THESE</u>	<u>51</u>
<u>RESULTATS</u>	<u>55</u>
<u>CONCLUSION</u>	<u>151</u>
I. LE RAPPORT NADH/NAD⁺ REGULE LE METABOLISME MITOCHONDRIAL	152
I.1. LA REGULATION DU METABOLISME GRACE A L'ACTIVATION DE SIRT3	152
I.2. AUTRES VOIES IMPACTEES PAR UNE VARIATION DU RAPPORT NADH/NAD ⁺	153
II. LE COMPLEXE I EST UN REGULATEUR DU RAPPORT NADH/NAD⁺	155
III. L'ETAT D'OXYDO-REDUCTION DE LA FMN DU COMPLEXE I JOUE UN ROLE CLE DANS LA PRODUCTION DE ROS	157
IV. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LES DEFICITS DU COMPLEXE I	159
IV.1. RSV, UNE MOLECULE CANDIDATE UTILISEE COMME THERAPEUTIQUE ?	159
IV.2. UTILISATION DU NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE (NMN)	162
IV.3. VOIES DE SYNTHESE ET DEGRADATION DU NAD ⁺	163
IV.4. ROLE DES TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS	164
IV.5. RESTAURER L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE I	164
<u>FICHES TECHNIQUES</u>	<u>166</u>
<u>LISTE DES TRAVAUX</u>	<u>218</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>221</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>230</u>

Introduction

I. La mitochondrie : Structure - Fonction

Contrairement aux cellules procaryotes, les cellules eucaryotes possèdent des organites qui divisent la cellule en compartiments spécialisés dont la mitochondrie. De l'ordre de quelques micromètres, la mitochondrie est notamment responsable de la synthèse d'Adénosine-5'-TriPhosphate (ATP), un composé à haut potentiel énergétique nécessaire à de nombreuses voies métaboliques. Au sein de la cellule, le nombre de mitochondrie varie de quelques centaines à plusieurs milliers par cellule.

I.1. Historique - Origine

La première observation de mitochondries date de 1857 par Rudolf Albert Von Kölliker qui décrit, lors d'une analyse microscopique, la présence de « granules » au sein des fibres musculaires striées. Dans les années 1890, des études menées sur la structure de ce compartiment déterminèrent son nom : mitochondrie qui vient en effet du grec « mitos » (filament) et chondros (grain). Selon la théorie endosymbiotique, les mitochondries proviendraient d'un évènement de fusion entre une eubactérie et une cellule eucaryote primitive (Margulis 1970). Cette hypothèse a été émise grâce à la découverte de similarités biochimiques et génétiques entre les bactéries et les mitochondries suggérant que l'ADN mitochondrial (ADNmt) dériverait du génome procaryote primitif. Au cours de l'évolution, la majorité des gènes α -protéobactériens de la mitochondrie primitive a été transférée vers le noyau.

I.2. Structure

La mitochondrie est formée de deux membranes lipidiques au sein desquelles sont enchâssées de nombreuses protéines. Ces deux membranes délimitent l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 1).

Introduction

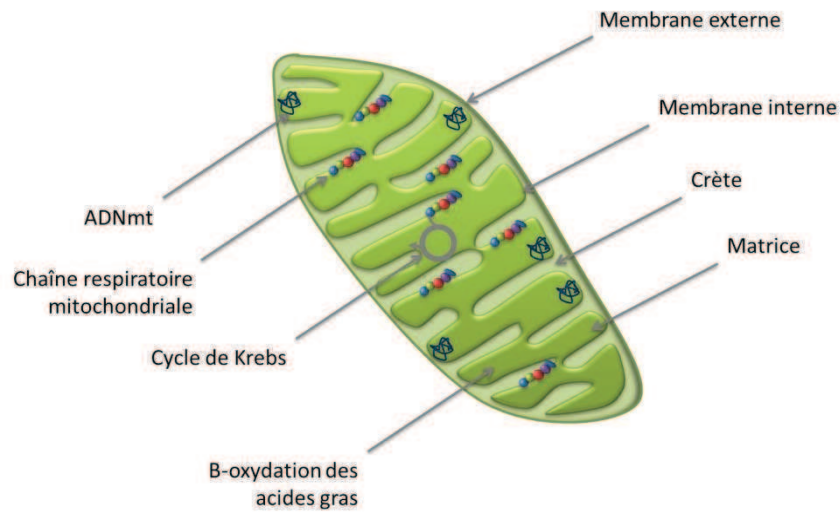


Figure 1 : Structure de la mitochondrie.

Les membranes de la mitochondrie, membrane interne et externe, délimitent deux compartiments l'espace intermembranaire et la matrice. La membrane interne forme des replis appelés crêtes. Sur ce schéma, certaines voies métaboliques ainsi que l'ADN mitochondrial (mtDNA) sont aussi représentées.

La Membrane Externe est constituée d'une bicouche lipidique dont le ratio protéines sur phospholipides est 1 à 1,5µg/µg (de Kroon, Dolis et al. 1997) et comporte environ 40 protéines différentes (Walther, Papic et al. 2009), parmi lesquelles des enzymes, des pores, des précurseurs de la machinerie de translocation et d'insertion.

La perméabilité de cette membrane est assurée par différentes familles de protéines impliquées dans le transport : les β -barrel, parmi lesquelles les trois isoformes de porines ou « Voltage-Dependent-Anion-Channel » (VDAC) pour le transport passif des molécules inférieures à 4-5kDa (Maldonado and Lemasters 2012) et les translocases de la membrane externe (« Translocase of the Outer Membrane » (TOM)) pour les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 10kDa (Schnell and Hebert 2003). La plupart des protéines mitochondriales synthétisées hors de la mitochondrie possède un signal d'adressage, leur permettant de pénétrer au sein de cet organite via des zones d'accolement entre la membrane interne et externe appelées complexe d'import (Dudek, Rehling et al. 2013).

La Membrane Interne possède une composition différente des autres membranes puisqu'elle contient 80% de protéines et 20% de phospholipides, tels que phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylsérine, acide phosphatidique et cardiolipines (Gohil and Greenberg 2009). Les cardiolipines sont impliquées dans la stabilisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire, dans l'import de protéines mitochondriales et l'apoptose (Zhang, Mileykovskaya et al. 2002). Riche en cardiolipines, la membrane interne est peu perméable et forme une barrière physique franchissable uniquement grâce à des transporteurs tels que le transporteur de nucléotide adénylique (ANT) qui permet l'échange de l'ATP mitochondrial avec l'ADP du cytosol, le co-transporteur de phosphate inorganique/protons, le transporteur du pyruvate, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate et la carnitine/acylcarnitine translocase. A l'instar de la membrane externe, elle possède également des translocases (« Translocase of Inner Membrane » (TIM)) qui permettent le passage de protéines dans la matrice mitochondriale.

La membrane interne forme des structures particulières avec des replis appelés crêtes mitochondriales. Au sein de ces crêtes se trouve la chaîne de phosphorylations oxydatives, responsable de la synthèse d'ATP.

L'espace Intermembranaire se situe entre les deux membranes et comprend aussi le volume situé entre les crêtes. La composition physico-chimique de l'espace inter membranaire est proche de celle du cytosol cellulaire mais le pH y est plus élevé (cytosol pH=7,3, mitochondrie pH=8), en raison de la forte concentration en protons qui lui confère également une charge positive. Plus de

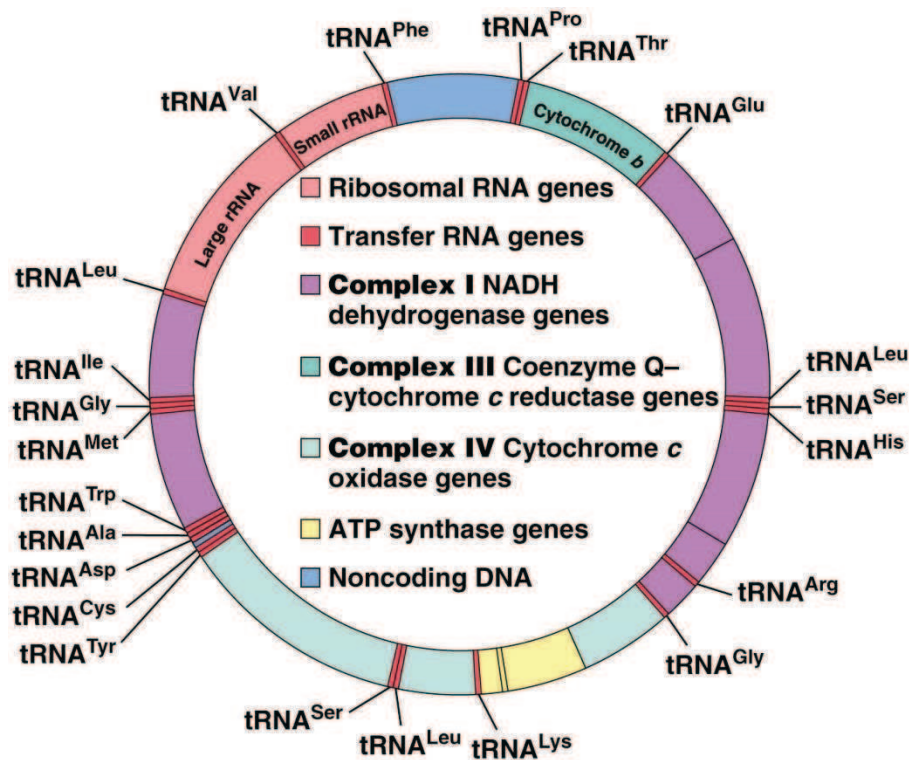


Figure 2 : Le génome mitochondrial humain

Cet ADN code pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (13 protéines, 7 sous-unités du complexe I, 1 sous-unité du complexe III, 3 sous-unités du complexe IV), deux sous-unités de l'ATP synthase. 22 ARN de transfert (tRNA sur le schéma) et 22 ARN ribosomiques (en rose sur le schéma) sont aussi codés par ce génome. La zone bleue correspond à la D-loop, c'est une région non codante régulant la transcription. (D'après <http://www.lookfordiagnosis.com/>)

100 protéines ont été identifiées au sein de ce compartiment et sont impliquées dans différentes fonctions biologiques. La plus abondante est le cytochrome c (navette nécessaire au transport d'électrons entre le complexe III et le IV) (Herrmann and Riemer 2010).

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie. Ce compartiment métaboliquement très actif, est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. La matrice contient aussi de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème et des centres Fer-Soufre, ainsi que des enzymes spécifiques d'un tissu impliquées dans le cycle de l'urée, la néoglucogenèse et la synthèse des hormones stéroïdes.

De plus, elle contient l'ADN mitochondrial (ADNmt), des ribosomes et des ARN de transfert. De transmission maternelle, le génome mitochondrial, dépourvu d'introns et d'histones, est constitué d'un ADN double brin circulaire de 16 569 paires de bases chez l'Homme (Schatz 1995). Il code pour treize des quatre-vingt-dix protéines présentes dans la chaîne respiratoire mitochondriale, deux ARN ribosomiaux et vingt-deux ARN de transfert (Figure 2). L'ADNmt n'est pas libre dans la matrice mais lié à des protéines (Twinkle, POLG, TFAM, mtSSB) nécessaires à sa transcription et à son maintien au sein d'une structure appelée nucléoïde (Garrido, Griparic et al. 2003, Spelbrink 2010, Kukat, Wurm et al. 2011).

Les brins d'ADNmt sont caractérisés par leur contenu nucléotidique. Ainsi, le brin H (« Heavy », lourd) est riche en guanine à la différence du brin L (« Light », léger). Chaque brin H ou L contient une région promotrice simple pour l'initiation de la transcription : HSP (« heavy-strand promoter ») et LSP (« light-strand promoter »). Ces régions spécifiques ainsi que l'origine de réplication du brin H sont localisées dans une partie de l'ADNmt non-codante unique appelée D-loop. La réplication de l'ADNmt est effectuée par l'ADN polymérase γ codée par le génome nucléaire. Elle est principalement bidirectionnelle et asynchrone, commençant par le brin H puis le brin L (Clayton 1982).

I.3. Métabolisme et phosphorylation oxydative

La principale fonction de la mitochondrie est la synthèse des molécules à haut potentiel énergétique, l'ATP. La production de cette molécule s'effectue au niveau de la membrane interne mitochondriale par un ensemble de réactions biochimiques appelées phosphorylations oxydatives. Les substrats nécessaires aux réactions de la phosphorylation oxydative sont apportés aux complexes de la chaîne respiratoire via la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs.

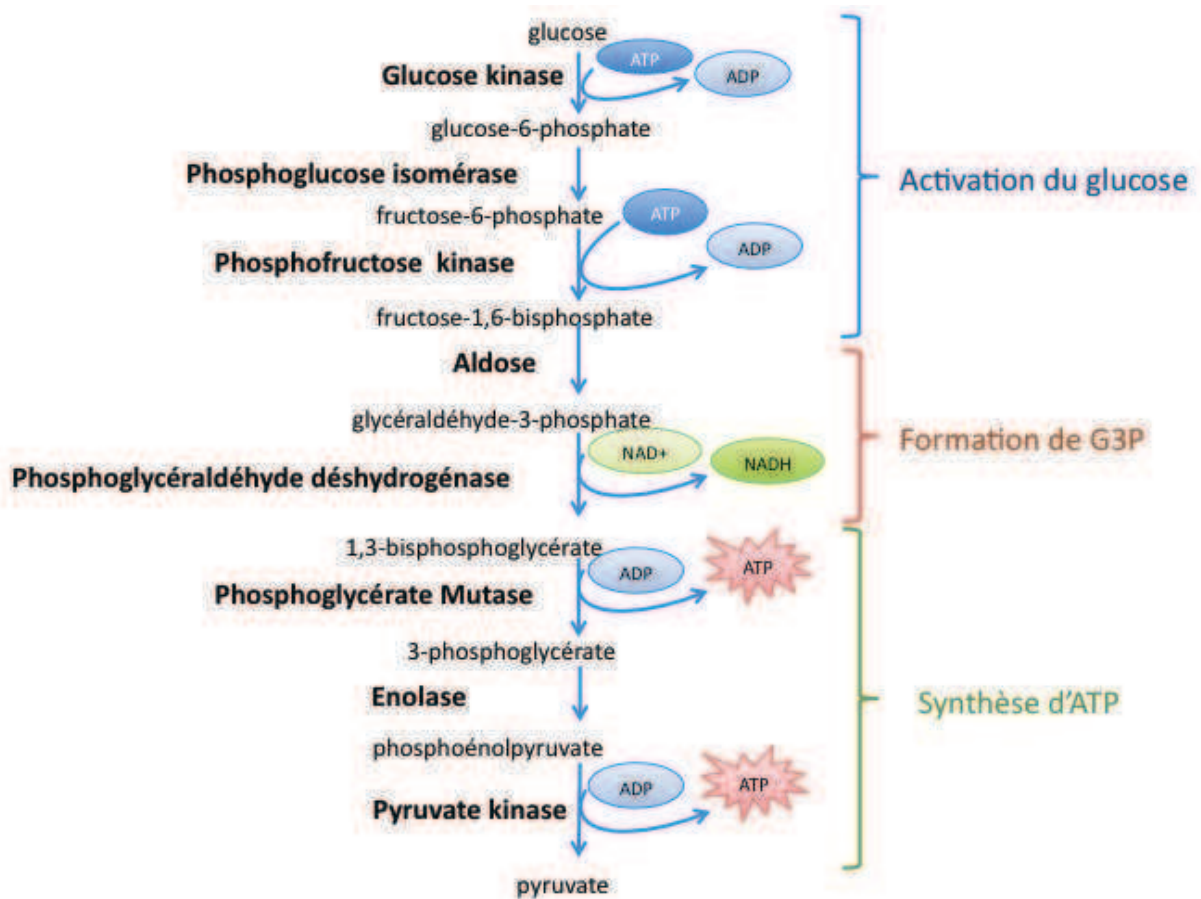


Figure 3 : Les différentes réactions de la glycolyse

La glycolyse est un ensemble de 10 réactions biochimiques qui ont pour but de transformer le glucose en deux molécules de pyruvate, générant l'ATP et deux molécules de substrat réduit (NADH+H⁺). Cette voie métabolique peut être divisée en 3 étapes, la voie d'activation consommatrice d'énergie, la formation de G3P et enfin la synthèse d'ATP.

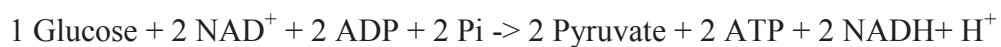
I.3.1. La production des coenzymes réduits

Les composés réduits sont produits par un ensemble de voies métaboliques regroupées sous le nom de catabolisme. Parmi, ces voies le catabolisme des glucides et plus particulièrement du glucose qui aboutit à la formation d'acétyl-CoA.

a) Formation de l'acétyl-CoA :

La glycolyse :

La glycolyse comprend 10 réactions enzymatiques pouvant être résumées de la manière suivante :



Ces réactions se décomposent en 3 étapes majeures (Figure 3):

- La phase d'activation où le glucose est transformé en deux trioses phosphates avec consommation d'énergie (2 ATP). La glucokinase (au niveau du foie) ou l'hexokinase phosphorylent le glucose, cette réaction irréversible consomme une molécule d'ATP. Le glucose 6-phosphate est ensuite isomérisé en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase et enfin la phosphofructose kinase 1 catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate en présence d'ATP.

- La formation de glycéraldéhyde : Le fructose-1,6-bisphosphate est clivé par la fructose-1,6-biphosphate aldose en 3-phospho-glycéraldéhyde et en 3-phosphodihydroxyacétone. Ce dernier va être transformé en glycéraldéhyde-3-phosphate par la phosphotriose isomérase.

- La phase "de remboursement" ou synthèse du pyruvate et de l'ATP : cinq réactions enzymatiques composent cette étape. La 3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase catalyse la transformation du 3-phospho-glycéraldéhyde en 3-phospho-glycérol-1-phosphate. Cette réaction d'oxydoréduction s'effectue en présence de phosphate inorganique (Pi) et est la seule à produire un composé réduit (NADH+H⁺). La réaction suivante consiste au transfert d'un groupement phosphate sur l'ADP par la 3-phosphoglycérate kinase aboutissant à la formation d'ATP. Le 3-phosphoglycérate va être isomérisé en 2-phosphoglycérate. Cette réaction est catalysée par la phosphoglycérate mutase dont l'activité nécessite la présence de Mg²⁺. Le 2-phospho-glycérate est ensuite déshydraté, aboutissant à la formation de phosphoenolpyruvate. Ce composé riche en énergie va ensuite être transformé en pyruvate en générant deux ATP.

La glycolyse est finement régulée, les produits des différentes réactions enzymatiques contrôlent l'activité de l'enzyme à l'origine de leur formation. L'enzyme clé dans ce contrôle est la

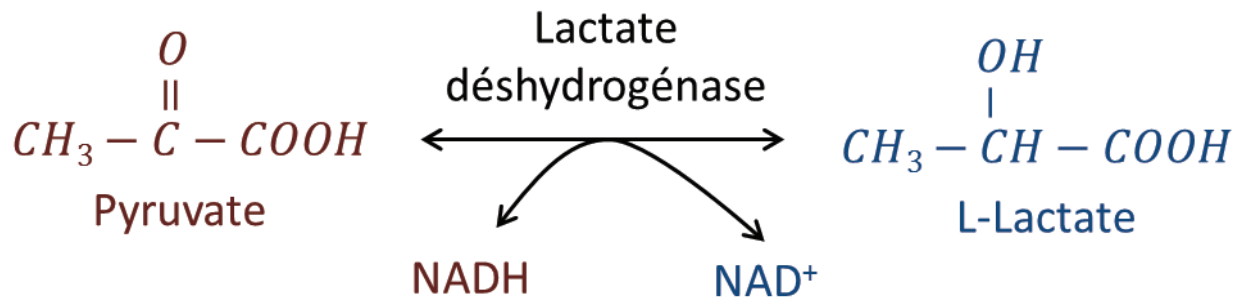


Figure 4 : Réaction catalysée par la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase convertit le pyruvate en L-lactate et couple cette réaction à l'oxydation du NADH en NAD⁺. On parle de glycolyse anaérobie. Quand cette réaction est à l'équilibre le rapport NADH/NAD⁺ peut être calculé à partir de rapport des concentrations du pyruvate/Lactate.

phosphofructose kinase qui est régulée par de nombreux effecteurs allostériques en fonction du statut énergétique cellulaire. Ainsi, l'ATP et le citrate en sont des inhibiteurs, alors que le l'AMP l'active (Lenzen 2014).

Glycolyse anaérobie vs aérobie, le recyclage du NADH :

Le pyruvate est le produit final de la glycolyse. Son devenir est lié à la voie de régénération du NADH, et dépendra donc de l'équipement enzymatique de la cellule ainsi que de la disponibilité en oxygène.

Au niveau cytosolique, la lactate déshydrogénase (LDH) (Figure 4), enzyme ubiquitaire, couple la réduction du pyruvate en L-lactate à l'oxydation du NADH en NAD^+ . On parle alors de glycolyse anaérobie. La conversion catalysée par la LDH est réversible et joue donc un rôle très important dans le maintien d'un ratio NAD^+/NADH . Ce ratio est relativement constant dans le cytosol. Ainsi, le rapport Lactate/Pyruvate augmente ou diminue en réponse à la conversion du NADH en NAD. La LDH est une enzyme non limitante, la réaction de conversion entre le pyruvate+NADH et le lactate+NAD⁺ est à l'équilibre (Williamson, Lund et al. 1967) et le rapport NAD^+/NADH peut donc être calculé par le rapport L/P selon l'équation d'équilibre chimique (méthode des indicateurs métaboliques (Williamson, Lund et al. 1967)).

Le recyclage du NADH en NAD^+ est également connecté au métabolisme mitochondrial. Les cellules eucaryotes possèdent deux grandes navettes permettant de transférer les électrons du NADH cytosolique au sein de la mitochondrie, sans que la molécule soit elle-même transportée à travers la membrane interne : la navette du glycérol phosphate, et la navette malate/aspartate (Mracek, Drahotka et al. 2013). La navette glycérol phosphate est principalement exprimée dans le foie, et se compose de deux glycérol-3-phosphate déshydrogénases, la première est dépendante du NADH et tournée vers le cytosol, la seconde est liée à la membrane et dépendante du FAD. Ce cycle de navettes permet ainsi de transférer les équivalents réducteurs d'un NADH cytosolique à un FADH_2 au sein de la membrane interne mitochondriale. La navette malate/aspartate, prédominante dans le muscle strié et le cerveau, en particulier dans les neurones (McKenna, Waagepetersen et al. 2006), est composée de deux malate déshydrogénases, l'une cytosolique, l'autre mitochondriale, d'une aspartate aminotransférase et de deux transporteurs, le transporteur glutamate/aspartate et le transporteur malate/ α -cétoglutarate. Dans le cytosol, la réduction de l'oxaloacétate en malate par une malate déshydrogénase assure l'oxydation du NADH en NAD^+ . Le malate est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale où une malate déshydrogénase l'oxyde en oxaloacétate avec réduction du NAD^+ en NADH. L'oxaloacétate ainsi produit est transaminé en aspartate qui traverse

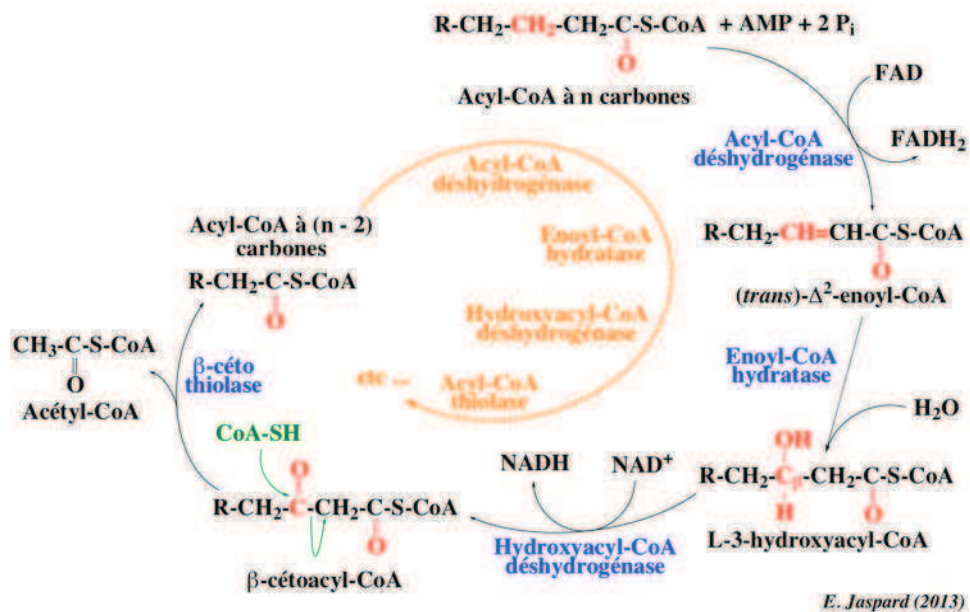


Figure 5 : Les différentes réactions de la β -oxydation des acides gras.

La β -oxydation des acides gras est un ensemble de 4 réactions enzymatiques successives pouvant être résumées par :



Les enzymes nécessaires aux 4 réactions enzymatiques, les différents carbones transformés sont représentés respectivement en bleu et rouge sur les schémas ci-dessus. D'après E.Jaspard 2013 (<http://biochimej.univ-angers.fr/>).

la membrane interne. Une deuxième transamination dans le cytosol redonnera de l'oxaloacétate.

D'autre part le pyruvate est un substrat critique alimentant le cycle de Krebs : on parle alors de glycolyse aérobie. Son transport à travers la membrane interne mitochondriale nécessite un transporteur spécifique, le transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC), qui relie le métabolisme du pyruvate cytosolique avec le cycle de Krebs (Papa, Francavilla et al. 1971). Après son passage au sein du MPC, le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) convertit le pyruvate et un NAD^+ en acétyl-CoA, NADH et dioxyde de carbone.

L'activité catalytique de ce complexe est finement régulée par quatre pyruvates déshydrogénases kinases (PDK) et deux pyruvates déshydrogénases phosphatases (PDP) (Rowles, Scherer et al. 1996, Huang, Gudi et al. 1998). Ces enzymes sont responsables de la phosphorylation-déphosphorylation de la sous-unité PDE1. Ainsi, le pyruvate augmente l'activité de la PDH vraisemblablement en inhibant la PDK4 (Kerbey, Randle et al. 1976) ; à l'inverse, en présence d'une concentration élevée en NADH et/ou en acétyl-CoA, la phosphorylation par la PDK du complexe de la pyruvate déshydrogénase inhibe l'entrée du pyruvate au sein de la mitochondrie (Pettit, Pelley et al. 1975, Batenburg and Olson 1976, Roche and Hiromasa 2007). Une telle augmentation de la concentration intramitochondriale en acétyl-CoA s'observe notamment lors d'une activation de la β -oxydation : par exemple, l'oxydation du palmytoyl-L-carnitine, augmente le rapport Acétyl-CoA/CoA, d'un facteur 15 à 16 et inhibe environ 90 % de l'oxydation du pyruvate (Kerbey, Randle et al. 1976).

b) Formation des coenzymes réduits

La β -oxydation :

Le catabolisme des acides gras débute dans le cytoplasme par leur activation, correspondant à la formation d'une liaison thioester entre un coenzyme A et un acide gras libre formant un acyl-CoA. Ces acyl-CoA pénètrent dans la mitochondrie grâce au système carnitine acyl-carnitine transférase (CPT I et II)/Carnitine Acylcarnitine Translocase (CAT). Ce transport d'un acylCoA dans la matrice mitochondriale consomme une molécule d'ATP.

Tout comme l'entrée du pyruvate au sein de la mitochondrie, l'entrée des acyl-CoA est finement régulée. Cette régulation s'effectue essentiellement au niveau de la CPT I, par le malonylCoA (Cook, Otto et al. 1983, Kerner and Hoppel 2000). L'acétyl-CoA-carboxylase (ACC), en particulier son isoforme β , serait responsable de la régulation de l'activité de CPT-I, via la synthèse du malonyl-CoA (Ha, Lee et al. 1996). Les esters de type acyl-CoA à longue chaîne sont également des inhibiteurs de la CPT I (Abdel-Halim and Farah 1985).

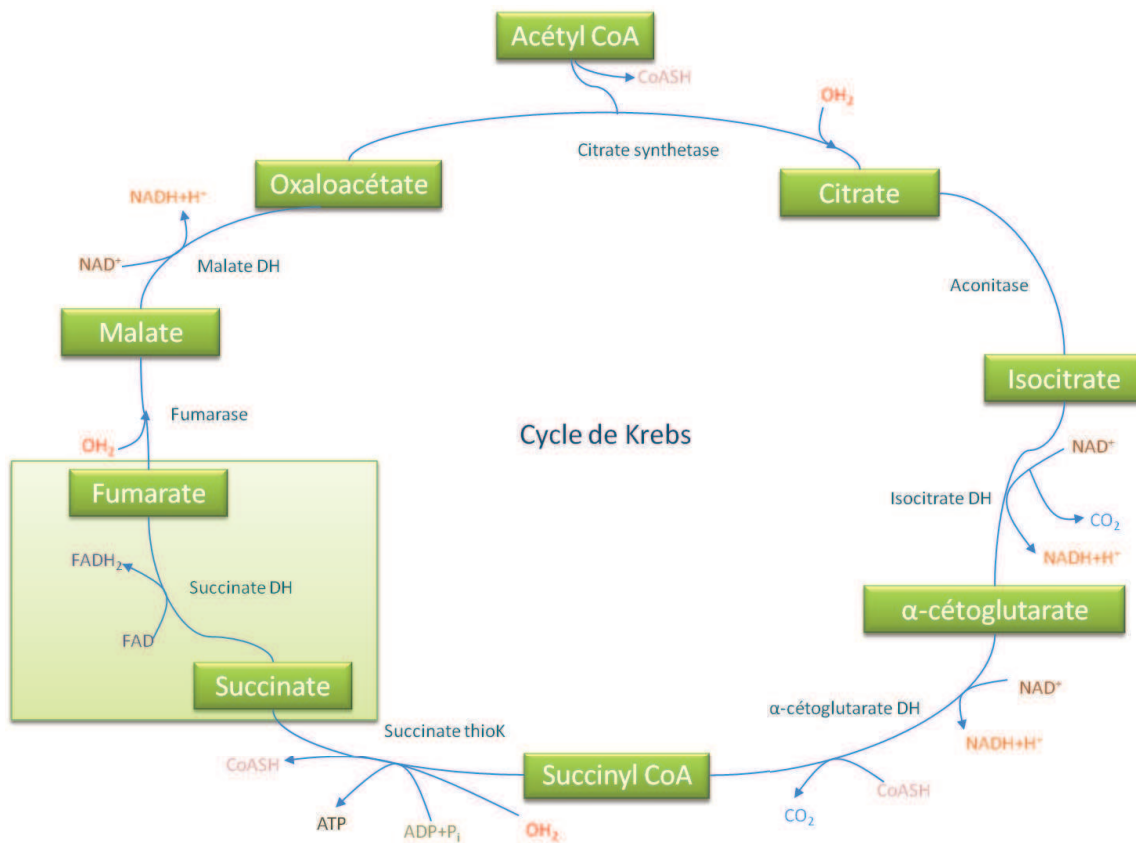
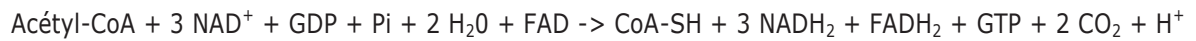


Figure 6 : Les différentes réactions du cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs est un ensemble de 10 réactions biochimiques successives pouvant être résumées par l'équation suivante :



Au sein de la mitochondrie, les acides gras sont ensuite dégradés par un cycle de 4 réactions successives appelées hélice de Lynen ou β -oxydation (Figure 5). Cette voie métabolique est strictement aérobie. La première étape implique une famille d'acyl-CoA déshydrogénases FAD^+ -dépendantes, chacune avec sa gamme de spécificité de substrat, déterminée par la longueur de l'acide gras (SCAD ou « Short Chain AcylCoA Deshydrogenase » pour les chaînes courtes, MCAD pour les chaînes moyennes et LCAD pour les chaînes longues). Cette étape permet la formation d'un acyl-CoA insaturé, couplé à la réduction du FAD en $FADH_2$. L'enoyl-CoA formé est ensuite hydraté en 3-hydroxyacyl-CoA de type L. La troisième réaction, catalysée par l'enzyme NAD^+ -dépendante L- β -hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase, transforme le groupement hydroxyl en fonction cétone. Elle s'accompagne de la réduction du NAD^+ . Finalement, le clivage en un acétyl-CoA et un acylCoA réduit de 2 carbones est catalysé par la β -cétotliase.

A chaque tour de l'hélice de Lynen, l'acide gras perd donc 2 atomes de carbone et devient le substrat du nouveau tour de l'hélice. Chaque cycle produit une molécule de $FADH_2$, une de $NADH$, et un acétyl-CoA, lequel va alimenter le cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs, principale voie de formation des composés réduits

Le cycle de Krebs (Figure 6) est une voie indispensable pour la réduction des composés NAD^+ et FAD^+ en $NADH$ et $FADH_2$. Ce cycle métabolique s'initie avec l'acétyl-CoA formé par les voies du catabolisme précédemment évoquées. La première étape correspond à la condensation, par la citrate synthétase, de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate, aboutissant à la formation de citrate. Ce dernier est déshydraté par l'aconitase en cis-aconitate. Le cis-aconitate forme par hydratation l'isocitrate. L'isocitrate déshydrogénase catalyse l'oxydation de l'isocitrate en α -cétoglutarate en présence de NAD^+ . L' α -cétoglutarate va ensuite être converti en succinyl-CoA par décarboxylation oxydative. Les cofacteurs nécessaires à cette réaction enzymatique sont le NAD^+ et le CoA-SH. Cette réaction est catalysée par un complexe de trois enzymes appelées le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase qui comprend l' α -cétoglutarate déshydrogénase, la dihydrolipoamide S-succinyltransférase et la dihydrolipoyl déshydrogénase. Le succinyl-CoA ainsi généré va être transformé par la succinyl-CoA synthétase en succinate, CoA et une molécule de GTP. La succinate déshydrogénase, enzyme connectant le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire transforme le succinate en fumarate en oxydant une molécule de $FADH_2$.

Enfin, la fumarase catalyse la transformation fumarate en L-malate lui-même transformé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase.

Cet ensemble de 10 réactions enzymatiques successives aboutit donc, par molécule d'acétyl-CoA consommée, à la formation d'une molécule de GTP, trois molécules de NADH,H^+ et une molécule de FADH_2 . Ces deux dernières seront ensuite oxydées par la chaîne respiratoire.

I.3.2. La chaîne respiratoire

La phosphorylation oxydative est un ensemble de réactions d'oxydoréduction couplée à la synthèse d'ATP. La chaîne d'oxydoréduction se compose des quatre complexes de la chaîne respiratoire, auxquels s'ajoute un complexe enzymatique responsable de la phosphorylation de l'ADP, ou ATP synthase (Figure 7).

a) La chaîne respiratoire : composition

NADH Ubiquinone OxydoReductase ou Complexe I

Le complexe I est le premier et plus important complexe (environ 1MDa) de la chaîne respiratoire. Il est composé d'au moins 44 sous-unités protéiques. Ce complexe possède une structure en forme de L divisée en deux domaines : le domaine membranaire hydrophobe et le domaine matriciel hydrophile. Au niveau catalytique, le complexe I, ou NADH Ubiquinone Réductase, oxyde le NADH, générant un transfert d'électrons le long de sept centres Fer-Soufre vers l'accepteur, l'ubiquinone. Couplé à ce transport d'électrons, le complexe I transfère 4 protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (Sharma, Lu et al. 2009).

Succinate Ubiquinone OxydoReductase ou complexe II

Le complexe II connecte le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire et apparaît donc comme une enzyme mitochondriale clé du métabolisme. Ce complexe d'environ 200 kDa est constitué de 4 sous-unités (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), toutes codées par le génome nucléaire. Les sous-unités A et B sont situées dans la matrice mitochondriale et forment le bras hydrophile de l'enzyme. La sous-unité A est une flavoprotéine et contient les sites de fixation du substrat et du cofacteur, le succinate et le FADH_2 . La sous-unité B est une protéine contenant 3 centres Fer-Soufre : 2Fe-2S , 4Fe-4S , 4Fe-3S . Le bras hydrophobe est formé par les sous-unités C et D enchâssées dans la membrane interne mitochondriale. Ces deux sous-unités contiennent le site de fixation de l'ubiquinone (Yankovskaya, Horsefield et al. 2003).

Ubiquinol cytochrome C reductase ou complexe III

Ce complexe homodimérique d'environ 500kDa, intégré à la membrane interne mitochondriale, est composé de onze sous-unités protéiques. Il est responsable du transfert de deux électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c et du transfert de quatre protons dans l'espace intermembranaire (cycle des quinones). Il comprend quatre groupes redox actifs : 2 cytochromes b (tous deux contenus dans la sous-unité cytochrome b, codée par le génome mitochondrial), le cytochrome c1 et un centre Fer-Soufre (de type 2Fe-2S) contenu dans la protéine Rieske (aussi appelée sous-unité 5 du complexe III). Les deux protéines codées par UQCRC1 (sous-unité 1 du complexe III), et UQCRC2 (sous-unité 2) sont essentielles à l'activité catalytique de ce complexe.

Cytochrome c oxydase ou complexe IV

Ce complexe d'environ 200KDa est composé d'au moins treize sous-unités protéiques, dont trois codées par le génome mitochondrial (COX1 à 3) et les dix autres par le génome nucléaire. Parmi les sous-unités nucléaires, certaines présentent plusieurs isoformes spécifiques des tissus comme la sous-unité VIIa qui possède une isoforme spécifique des muscles squelettiques et cardiaques (Arnaudo, Hirano et al. 1992). Les sous-unités catalytiques sont les 3 protéines codées par le génome mitochondrial. Les électrons transmis du complexe III au cytochrome c sont acceptés par un centre métallique CuA localisé au niveau de la sous-unité COX 2. Ce centre métallique réduit l'hème a de la sous-unité catalytique COX 1, qui est un hème à bas spin. Ensuite, les électrons sont transférés de l'hème a au site actif, l'hème a₃- CuB, hème à haut spin de COX 1. C'est à ce stade que les ligands gazeux (l'O₂, le CO₂ et le NO) se lient et sont réduits, en eau dans le cas du dioxygène. Couplé à ce transfert d'électrons, ce complexe transfère quatre protons dans l'espace intermembranaire (Cooper, Nicholls et al. 1991).

La F₀-F₁ ATP synthase ou complexe V

Ce complexe de 597 kDa est composé de quinze sous-unités protéiques dont deux codées par le génome mitochondrial (gènes ATP6 et ATP8, (Anderson, Bankier et al. 1981)). Ce complexe protéique en forme de champignon peut être divisé en deux domaines F₀ et F₁. Le domaine F₀ est enchâssé dans la membrane interne mitochondriale et contient les sous-unités conservées codées par le génome mitochondrial. Ce domaine se constitue d'un rotor formé d'une répétition de protéines c et d'une tige dite périphérique reliant les deux parties du complexe (contenant les sous unités b, d, F6, OSCP) fixée à la membrane par une sous-unité a. Le domaine F₁ matriciel est constitué de 3 protéines α, 3 protéines β et d'une protéine γ, δ et ε. Les sous-unités α et β forment le complexe catalytique, hexamérique autour d'une tige centrale constituée par les protéines γ, δ et ε, tige reliant les deux domaines de ce complexe (Jonckheere, Smeitink et al. 2012). L'ATP synthase génère de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Cette réaction se déroule au niveau du domaine

F_1 et nécessite la force générée grâce au passage de protons dans le domaine F_0 . L'activité enzymatique de cette enzyme est décrite comme «rotary catalysis» (Devenish, Prescott et al. 2008). En effet, les protons passent au travers de la sous-unité a puis au travers du rotor formé des sous-unités c , entraînant la rotation de celui-ci autour de la sous-unité α . La rotation de la sous-unité γ au sein du domaine F_1 génère l'énergie nécessaire la phosphorylation de l'ADP.

b) La phosphorylation oxydative

Les composés réduits ($NADH, H^+$ et $FADH_2$) issus de la glycolyse, de la β -oxydation des acides gras et du cycle de Krebs sont oxydés au niveau des complexes I ($NADH$) et II ($FADH_2$) de la chaîne respiratoire. Les électrons vont être transportés à travers le complexe III jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène, qui se fixe au niveau du complexe IV. Ces étapes nécessitent la participation de transporteurs qui échangent les électrons par des réactions d'oxydo-réduction, des molécules à faible potentiel énergétique vers les molécules à haut potentiel comme l'oxygène. Couplé à ce transfert d'électrons, au niveau des complexes I, III et IV, un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire est réalisé. La membrane interne est donc chargée positivement sur sa face externe et négativement sur sa face interne. Ce mouvement de protons est à l'origine d'un gradient électrochimique appelé force protomotrice (Δp). Cette force protomotrice correspond à la somme du potentiel de membrane ($\Delta \Psi$ compris entre -150 et -180 mV) (Perry, Norman et al. 2011), et du gradient de pH (ΔpH). Cette force tend à expulser les protons vers la matrice. La théorie chimio-osmotique, décrite pour la première fois par Mitchell en 1966 (Mitchell, 1966, chemiosmotic coupling), stipule que le gradient de concentration de protons créé à travers la membrane sert de réservoir d'énergie libre pour la synthèse d'ATP. En d'autres termes, l'oxydation des coenzymes réduits est couplée à la synthèse d'ATP *via* la force protomotrice, ce couplage est appelé phosphorylation oxydative. L'ATP ainsi généré est ensuite exporté dans le cytosol via la translocase des nucléotides (ANT).

Lors des réactions d'oxydo-réductions au sein des complexes de la chaîne respiratoire, des électrons s'échappent et peuvent ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire générant des composés hautement réactifs : les Espèces Réactives de l'oxygène ou ROS.

I.3.3. La production de ROS

Les molécules réactives dérivées de l'oxygène (ROS) regroupent à la fois l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH) produits au sein de la mitochondrie.

Le complexe I est décrit comme le principal site mitochondrial de production de ROS. Cependant, beaucoup de questions restent à élucider notamment celle du site exact de production. Cet aspect sera évoqué plus en détail section IV.3.

Le complexe II commence à être décrit comme un site de production de ROS. Dans la majorité des cas, la production de ROS par le complexe II est générée par le complexe I lors d'un flux reverse d'électrons (Hansford, Hogue et al. 1997, Zoccarato, Miotto et al. 2011). Dans de rares situations, le complexe II pourrait produire directement des ROS mais seulement lorsque la flavine est semi ou totalement réduite et que le site de fixation du cofacteur est libre, laissant ainsi, la possibilité à l'oxygène de réagir avec celle-ci (Quinlan, Orr et al. 2012).

Le complexe III a été longtemps perçu comme un producteur majeur de ROS (Bell, Klimova et al. 2007). La production de ROS par ce complexe serait liée à l'existence de semiquinone (Q-) (Zorov, Juhaszova et al. 2014) pouvant interagir avec l'oxygène. Ce phénomène semble être favorisé en cas d'inhibition de ce complexe (Eleff, Kennaway et al. 1984, Murphy 2009). Au niveau basal, la production de ROS par ce complexe est faible (Forman and Azzi 1997) et est proportionnelle à la quantité de cytochrome b réduit. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer le rôle de ce complexe dans la production de ROS en conditions physiologiques (Bleier and Drose 2013).

Des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et notamment dans le cycle de Krebs semblent avoir un rôle prépondérant dans la production mitochondriale de ROS, comme l' α -cétoglutarate déshydrogénase. La sous-unité E3 de celle-ci est responsable de la production de ROS uniquement en présence de forte quantité de CoA-SH et en l'absence de NAD^+ (Tretter and Adam-Vizi 2004) ou l' α -glycérophosphate déshydrogénase (Tretter, Takacs et al. 2007).

1.3.4. La détoxification mitochondriale des ROS

La détoxification (Figure 8) des ROS s'effectue par la transformation de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène. Ce processus peut se faire spontanément ou peut être catalysé par les superoxydes dismutases (SOD, CuZNSOD ou SOD1 dans le cytosol et l'espace intermembranaire et MnSOD ou SOD2 dans la matrice mitochondriale). L' H_2O_2 produit par les SOD peut induire des effets délétères au sein des cellules (dommage à l'ADN, peroxydation des lipides, cassure des ponts disulfures entre les molécules) et est donc détoxifié par la catalase, la glutathion peroxydase ainsi que la thiorédoxine peroxydase pour aboutir à la production d' H_2O (Holley, Bakthavatchalu et al. 2011).

a) MnSOD

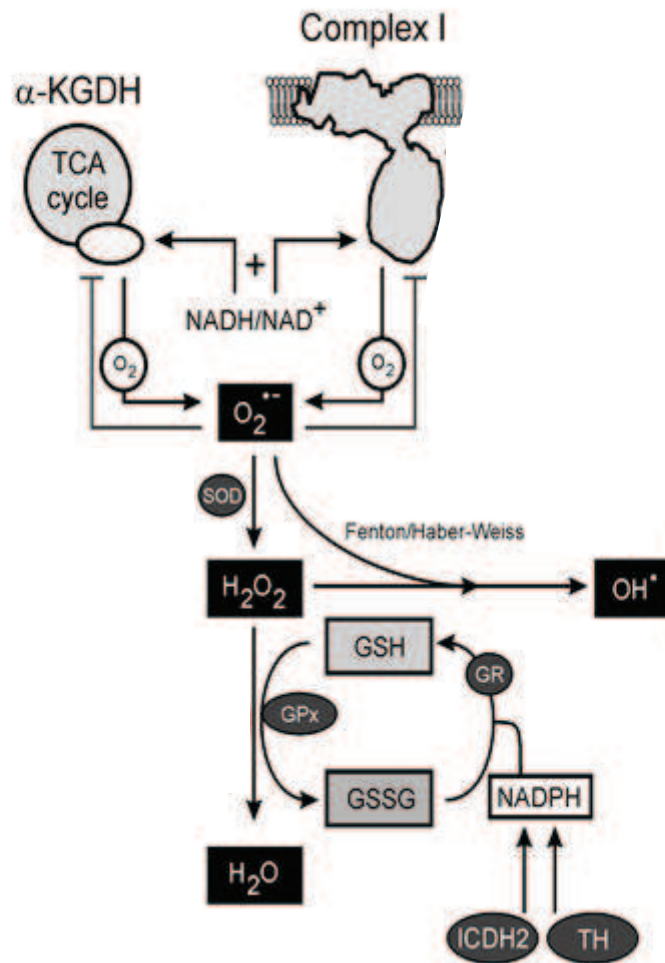
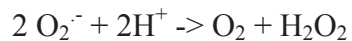


Figure 8 : Les voies de détoxification de la matrice mitochondriale.

Le complexe I et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH) apparaissent comme les deux principaux producteurs de ROS mitochondriaux. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) produit par ces enzymes transformé par la manganèse superoxyde dismutase (SOD2) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut être converti en H_2O notamment par la glutathione peroxydase (GPx) qui couple cette réduction à l'oxydation des glutathions (GSH : glutathions réduits, GSSG : glutathions oxydés). Le « pool » de glutathions réduits est notamment reformé par la glutathion réductase (GR) qui transforme le NADPH en $NADP^+$. (2010, Antioxydants & Redox signaling, koopman complexe I).

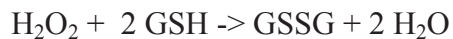
La MnSOD est abondante au sein de la matrice mitochondriale (Tyler 1975). Elle fonctionne sous forme de dimère et catalyse la réaction suivante (Borgstahl, Parge et al. 1992) :



Son expression est augmentée lors d'un stress cellulaire majeur. Le rôle prépondérant de cette enzyme est souligné par le fait que l'inactivation totale de ce gène conduit à la mort des animaux dans les premiers jours de vie (Li, Huang et al. 1995, Lebovitz, Zhang et al. 1996, Parajuli, Marine et al. 2011). La sous-expression de la MnSOD conduit, outre la diminution des défenses antioxydantes, à une réduction de l'activité des complexes I, II et III et de l'expression du complexe II en raison de l'oxydation des centres Fer-soufre (Li, Huang et al. 1995, Williams, Van Remmen et al. 1998).

b) Les glutathion peroxydases

Chez les mammifères, plus de huit isoformes de glutathion peroxydases existent (Toppo, Flohe et al. 2009). La réaction catalysée par ce tetramère enzymatique peut-être schématisée de la manière suivante :



La régulation de l'activité de cette enzyme s'effectue notamment par la disponibilité de son co-substrat, le glutathion réduit (GSH). Ce cofacteur sert de donneur d'électrons lors de la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau. Au cours de cette réaction le glutathion est oxydé aboutissant à la formation de glutathion disulfide (GSSG). Afin de reformer le « pool » de glutathion réduit, la glutathion réductase (GR) transforme le GSSG en GSH, cette réaction est dépendante $\text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+$.

Le glutathion apparaît comme un composé clé dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire (Aoyama, Watabe et al. 2008). En condition de stress oxydatif, ce dernier peut former des ponts disulfures entre les groupements thiols des protéines aboutissant à l'oxydation irréversible de celles-ci (Giustarini, Rossi et al. 2004). Le GSH est synthétisé dans le cytoplasme pour être ensuite importé dans la mitochondrie. En conditions de stress, le rapport GSH/GSSG est diminué (Maher 2005) et sert d'indicateur du statut redox de la cellule (Schafer and Buettner 2001).

II. Régulation de la phosphorylation oxydative

90% de l'énergie cellulaire est fournie par la mitochondrie sous forme d'ATP. Cette molécule est nécessaire à l'ensemble des réactions biochimiques du métabolisme. Un ajustement fin de la production d'ATP est donc nécessaire pour une adaptation rapide aux variations de l'environnement (une demande accrue en ATP lors d'un exercice par exemple) ou permettre une adaptation à plus long terme (restriction calorique).

Afin de répondre à ces situations, plusieurs niveaux de régulation existent. Ils font appel à un équilibre fin (homéostasie) de différentes molécules produites ou utilisées par la chaîne respiratoire et qui peuvent en retour moduler l'activité de cette dernière : le calcium, le rapport AMP/ATP et le rapport NADH/NAD⁺. Parmi les niveaux de régulation, on trouve des régulations à court terme comprenant la modulation de l'efficacité de la chaîne respiratoire ; des régulations enzymatiques ; ou encore des modifications post traductionnelles (phosphorylations et acétylations). A plus long terme, une voie de signalisation rétrograde dépendante du rapport AMP/ATP peut être mise en place et aboutir à la stimulation de la biogenèse mitochondriale.

II.1. Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative

L'efficacité de la phosphorylation oxydative peut être définie comme la quantité d'ATP formée par molécule d'oxygène consommée (ATP/O). Ce paramètre peut varier soit par modification de la force protomotrice, on parle de découplage extrinsèque, soit par modification de l'efficacité du pompage de protons, on parle alors de découplage intrinsèque.

II.1.1. La fuite de protons : les mécanismes extrinsèques

La phosphorylation de l'ADP par l'ATP synthase est dépendante du gradient de protons généré au niveau des complexes de la chaîne respiratoire. Une partie de ce gradient de protons retourne vers la matrice par simple diffusion, on parle de fuite basale de protons. Cette fuite représente environ 20% de la respiration mitochondriale (Brand, Pakay et al. 2005) et dépend notamment de la composition de la membrane interne (en particulier de la quantité de cardiolipines) (Porter, Hulbert et al. 1996, Bobyleva, Bellei et al. 1997, Hulbert, Else et al. 2002). Des protéines

peuvent aussi être impliquées dans la fuite basale de protons, notamment l'adénine nucléotide translocase (ANT) (Brand, Pakay et al. 2005).

Par opposition à la fuite basale, la fuite inductible est catalysée par des protéines de la membrane interne mitochondriale. Ces protéines ont pour but de transporter des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice. Parmi ces protéines, on trouve les protéines découplantes UCP (uncoupling protein). Ainsi, la protéine UCP1 capte des protons générés au niveau de la chaîne respiratoire afin de réguler la température corporelle. Cette protéine est notamment activée via des messagers hormonaux (noradrénaline) lors de baisse des températures (Nicholls and Locke 1984, Cannon and Nedergaard 2004). UCP2 est abondante dans certains types cellulaires tels que les macrophages et les cellules β du pancréas. Cette protéine est activée par une augmentation de la production de ROS et aboutit à une diminution de la synthèse mitochondriale d'ATP (Liu, Li et al. 2013). UCP3 est principalement exprimée dans le muscle et son activation lors d'une production accrue de ROS permettrait d'induire un découplage modéré afin de diminuer le potentiel de membrane (Brand, Buckingham et al. 2004).

II.1.2. Les mécanismes intrinsèques

Le découplage intrinsèque correspond à une variation de la stœchiométrie des protons pompés par électrons transférés modulant ainsi le rapport ATP/O. Ce phénomène physiologique a seulement été démontré pour le complexe IV et l'ATP synthase (Kadenbach 2003). En effet, l'efficacité du pompage de protons peut varier en fonction des conditions métaboliques (Capitanio, Capitanio et al. 1991, Capitanio, Capitanio et al. 1996). Par exemple, lors d'une hausse du rapport ATP/ADP, l'efficacité de pompage de protons du complexe IV varie de 1 à 0,5 (H^+/e^-) (Frank and Kadenbach 1996). Pour l'ATP synthase, la stœchiométrie des protons pompés par électrons transférés varierait selon la conformation et surtout du nombre de sous-unités contenues dans la partie F_0 du complexe (Stock, Leslie et al. 1999).

Des mutations dans les sous-unités des complexes (Pfitzner, Hoffmeier et al. 2000), ou l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques (Steverding and Kadenbach 1991) peuvent aussi altérer l'efficacité du pompage de protons.

II.2. Régulation allostérique

II.2.1. Homéostasie calcique

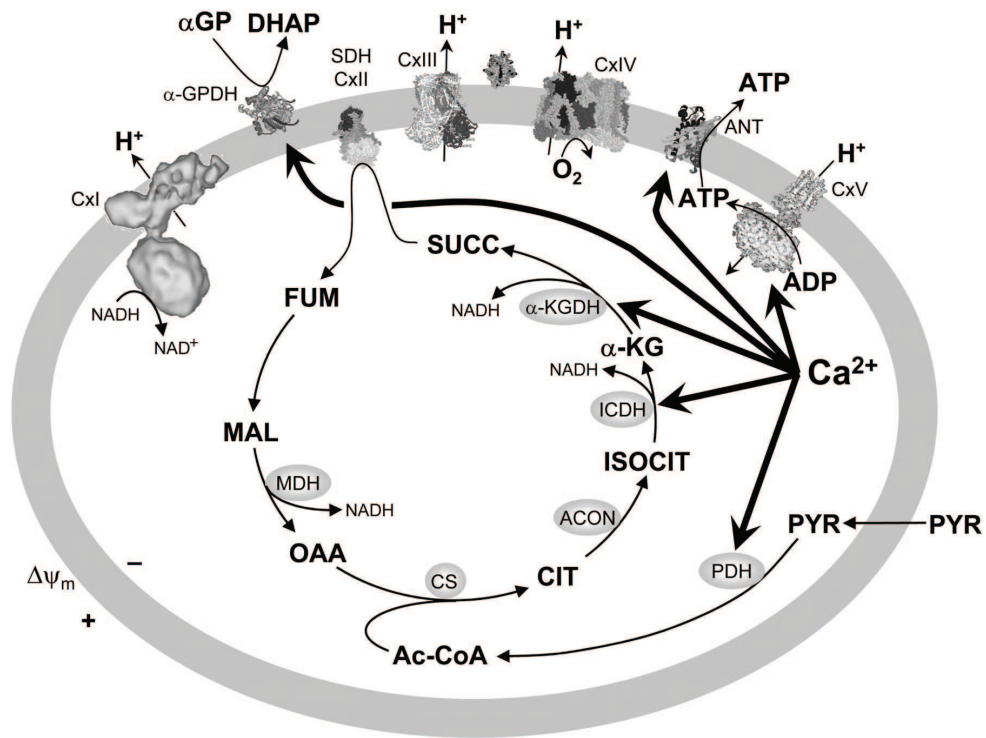


Figure 9 : La régulation du métabolisme énergétique par le calcium

La concentration en ion calcium (Ca^{2+}) est un facteur déterminant pour l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique mitochondrial. Le calcium régule ainsi le cycle de Krebs, tout d'abord en modulant l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH) et de l'isocitrate déshydrogénase (ISOCIT), deux enzymes de ce cycle, mais aussi en régulant l'entrée du pyruvate et donc la quantité d'acétyl-CoA (via la régulation de la PDH). Le calcium régule aussi l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (notamment le complexe IV et le complexe V).

(Brookes, Yoon et al. 2004).

La mitochondrie joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie calcique. En effet, la mitochondrie est stratégiquement placée à proximité des sites de relargage du Ca^{2+} . Ainsi, lors d'une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, soit issu des réserves internes ou via un influx à travers la membrane plasmique, celui-ci peut être rapidement être transféré au sein de la matrice mitochondriale. L'élévation du calcium libre mitochondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) stimule alors les déshydrogénases mitochondriales Ca^{2+} -sensibles, induisant une augmentation du NAD(P)H. Ainsi, l'activité des navettes malate/aspartate et glycérol phosphate est finement régulée par le calcium (Figure 9). En effet, MacDonald and Brown ont montré que des concentrations de calcium (10^{-5} à 10^{-6}M) diminuaient le K_m de l'enzyme glycérol-3- phosphate afin de l'activer (MacDonald and Brown 1996). La pyruvate déshydrogénase est également régulée par le calcium, via la stimulation de l'isoforme 1 de la Pyruvate déshydrogenase phosphatase (PDP1) (Turkan, Hiromasa et al. 2004). Enfin, dans le cycle de Krebs, deux déshydrogénases ont été montrées comme régulées par le calcium, parmi lesquelles l'isocitrate déshydrogénase ainsi que l' α -cétoglutarate déshydrogénase (Denton 2009). En plus de cette régulation des apports en NADH et FADH_2 , le calcium pourrait également réguler directement la synthèse d'ATP en se fixant sur la sous-unité F1- β de l'ATP synthase (Hubbard and McHugh 1996). Le couplage préférentiel entre l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ et du $[\text{Ca}^{2+}]_m$ est l'un des mécanismes proposés expliquant la coordination entre la production d'ATP mitochondrial et la demande cellulaire (Gellerich, Gizatullina et al. 2012, Gellerich, Gizatullina et al. 2013). L'activation coordonnée de ces déshydrogénases et de l'ATP synthase permettrait une forte augmentation de la vitesse de respiration, avec une altération minime du rapport NAD(P)H/NAD(P)⁺ (De Marchi, Santo-Domingo et al. 2014).

II.2.2. La Régulation par le statut énergétique (rapport ATP/AMP)

La consommation d'énergie par une cellule se traduit par une diminution de la concentration en ATP et une augmentation de la concentration en ADP, et/ou AMP. ATP, ADP et Pi sont tous trois directement connectés avec le système de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, *via* leur transport à travers la membrane mitochondriale interne par le transporteur ATP/ADP (ANT) et le transporteur de phosphate (Figure 10). Une élévation du rapport ATP/ADP cytosolique sera donc suivie d'une élévation du rapport intramitochondrial, lequel va activer la respiration mitochondriale par effet de substrat (stimulation de la F_0F_1 -ATP synthase). Cette stimulation de la respiration mitochondriale nécessite une activation concertée des voies d'apports en substrats et de leur oxydation. Le complexe PDH est activé par l'ADP, mais inhibé par l'ATP (Spriet and Heigenhauser 2002). Dans le cycle de Krebs, trois des étapes sont fortement exergoniques, celles catalysées par la

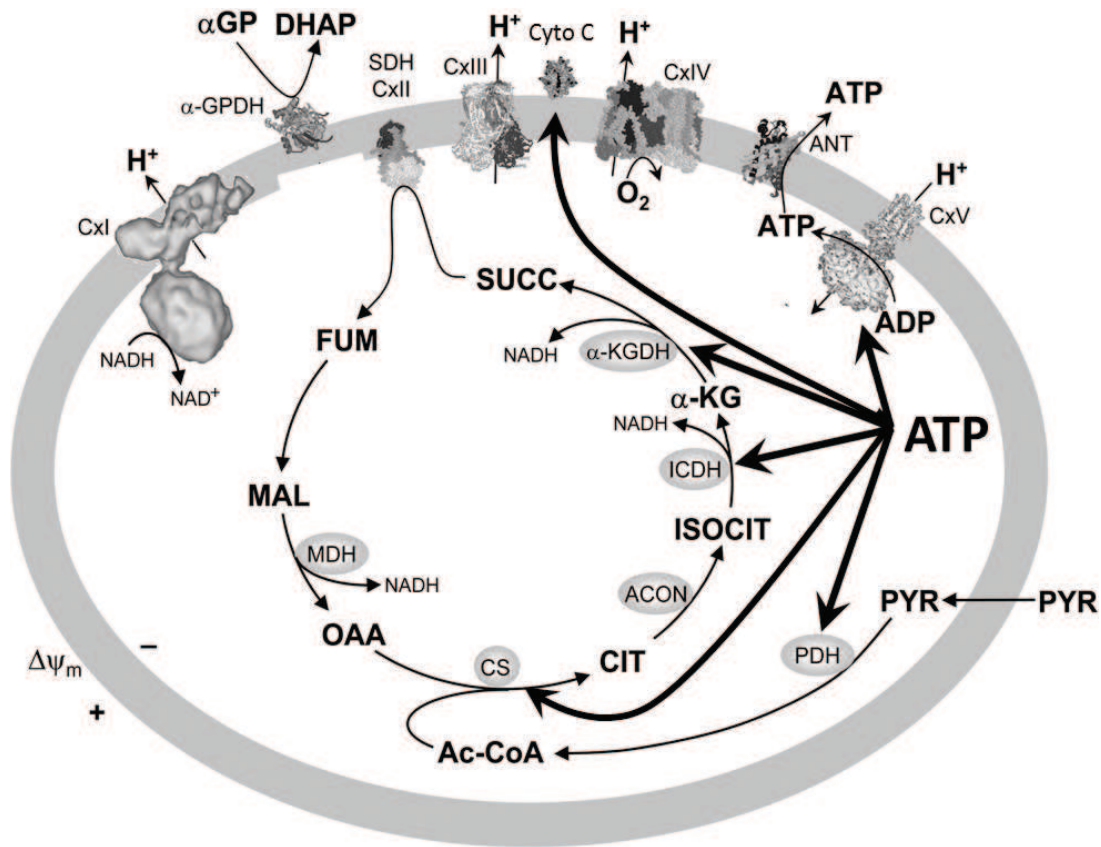


Figure 10 : La régulation du métabolisme énergétique par l'ATP

Le rapport ATP/ADP est régulateur clef du métabolisme énergétique mitochondrial. Ainsi, l'activité d'enzymes du cycle de Krebs (Isocitrate déshydrogénase (ISOCIT), Citrate Synthase (CS), (α-cétoglutarate déshydrogénase (α-KGDH)) est induite lors d'une diminution du rapport ATP/ADP. Une hausse de la concentration en ATP inhibe aussi l'activité du complexe V (CxV). L'activité de l'un des transporteurs de la chaîne respiratoire, le cytochrome C (Cyto C) pourrait aussi être régulée lors de modification du rapport ATP/ADP.

citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Ces trois enzymes semblent particulièrement sensibles au ratio ATP/ADP. Ainsi, une hausse de la concentration intramitochondriale en ATP peut inhiber l'activité de ces enzymes (Hathaway 1965, Harford and Weitzman 1975). A l'inverse, une diminution de la concentration en ATP et donc du rapport ATP/ADP, comme lors d'un exercice (Ghanbari-Niaki, Bergeron et al. 1999), induit l'augmentation de l'apport de coenzymes réduits à la chaîne respiratoire (Rutter and Denton 1988, Strumilo 2005). D'autre part, la cytochrome C oxydase, possède des sites de liaison spécifique, de haute affinité, à l'ADP et à l'ATP. Les études cinétiques sur l'enzyme reconstituée montrent que l'ADP diminue le K_m de l'enzyme pour le cytochrome c, tandis que l'ATP l'augmente (Huther and Kadenbach 1987, Huther and Kadenbach 1988). Si le nombre de sites de fixation reste débattu (Rieger, Napiwotzki et al. 1995, Napiwotzki, Shinzawa-Itoh et al. 1997, Napiwotzki and Kadenbach 1998), il semble qu'ADP et ATP entrent en compétition pour le même site, ce qui signifie que le ratio ATP/ADP, plus que l'ATP lui-même régule l'activité de l'enzyme.

II.2.3. La Régulation par le rapport $NAD^+/NADH$

Le rapport de $NAD^+/NADH$ libre joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Plus de 700 oxydoréductases utilisent le NAD^+ ou le NADH comme cofacteurs (Ying 2008). La majorité du NAD^+ cellulaire, semble être séquestré dans cet organite (jusqu'à 70% du NAD^+ dans les cellules cardiaques) (Di Lisa and Ziegler 2001, Stein and Imai 2012). La mitochondrie possède un rapport $NAD^+/NADH$ relativement faible de l'ordre de 7 à 8, comparé à celui du cytosol (qui oscille typiquement entre 60 et 700) (Stein and Imai 2012). Aussi, la biodisponibilité du NAD^+ va avoir une profonde influence sur l'ensemble des processus métaboliques mitochondriaux. Le NAD^+ est un co-substrat régulant l'activité de trois enzymes du cycle de Krebs : l'isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase, et la malate déshydrogénase. Le NADH, produit de par l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase lors de l'oxydation de l'isocitrate et de l' α -cétoglutarate, inhibe ces deux enzymes. De même, la réaction de malate déshydrogénase est à l'équilibre dans la cellule, la concentration en oxaloacétate dépend donc du rapport $NADH/NAD^+$ (Mullinax, Mock et al. 1982). Le complexe PDH chez les vertébrés est, comme nous l'avons vu, régulé allostériquement par l'ATP, l'acétyl-CoA mais également par le NADH. Une augmentation du rapport $NAD^+/NADH$, liée à une hausse du NAD^+ intramitochondrial active ce complexe enzymatique. A l'inverse, la vitesse du cycle de Krebs peut être limitée par la disponibilité de l'acétyl-CoA, lors de l'épuisement du NAD^+ (Harford and Weitzman 1975, Plaut, Cheung et al. 1979). Ainsi l'activité de la PDH est diminuée lorsque le

rapport $[NADH]/[NAD^+]$ est élevé et activée lorsque les besoins énergétiques sont élevés et que le flux de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs doit être stimulé (Pettit, Pelley et al. 1975).

En plus d'oscillation circadienne, le rapport $NAD^+/NADH$ est modulé en fonction de facteurs environnementaux et nutritionnels. Ainsi, les effets bénéfiques de la restriction calorique sur le vieillissement seraient liés à une hausse de ce rapport dans une variété de tissus, dont le foie, le muscle squelettique et le cerveau (Lin, Ford et al. 2004). Le jeûne induirait également une augmentation des taux de NAD^+ dans le foie et le muscle squelettique (Canto, Gerhart-Hines et al. 2009). Au contraire, un régime enrichi en graisse réduit de façon significative la concentration en NAD^+ hépatique (Yoshino, Mills et al. 2011). De plus, le taux de NAD^+ intramitochondrial semble également diminué au cours du vieillissement (Braidy, Guillemin et al. 2011).

En plus de sa participation aux réactions d'oxydoréductions, le NAD^+ est une molécule de signalisation cellulaire. Tout comme le rapport AMP/ATP, le rapport $NADH/NAD^+$ constitue également un mécanisme de « sensing » du statut énergétique cellulaire, déclenchant des modifications post-traductionnelles majeures, telles que la phosphorylation et l'acétylation.

II.3. La régulation post-traductionnelle

La phosphorylation et l'acétylation apparaissent comme des régulateurs majeurs des voies de production des composés réduits $NADH$ et $FADH_2$ mais également des complexes de la chaîne respiratoire. Elles s'appuient notamment sur un mécanisme de « sensing » du statut énergétique cellulaire basé sur les rapports AMP/ATP et $NADH/NAD^+$.

II.3.1. Mécanisme de phosphorylation

Une étude menée par Pagliarini et Dixon a montré que 60 protéines mitochondriales étaient phosphorylées (Pagliarini and Dixon 2006). Environ un tiers de ces protéines sont des sous-unités de la chaîne respiratoire. L'activité des complexes I et IV est régulée par phosphorylation.

Dans le complexe I, le premier site de phosphorylation démontré se situe sur la sous-unité $NDUFS4$ (Scacco, Vergari et al. 2000). La phosphorylation de la sous-unité $NDUFS4$ par la protéine PKA induit une augmentation de la respiration liée à ce complexe. Lors d'une mutation dans la sous-unité $NDUFS4$, une diminution de la phosphorylation est observée, responsable au

moins en partie de la réduction de l'activité et de la respiration liée au complexe I (Papa, Petruzzella et al. 2004). Dans les mitochondries de cœur de bœuf, les sous-unités MWFE (sous unité homologue de NDUFA1), ESSS (sous unité homologue de NDUFB11) peuvent également être phosphorylées (Chen, Fearnley et al. 2004). La phosphorylation de MWFE semble indispensable pour l'assemblage et la stabilité du complexe I (Yadava, Potluri et al. 2008).

L'inhibition allostérique induite par l'ATP au niveau du complexe IV serait régulée par phosphorylation/déphosphorylation selon une voie dépendante de l'AMPc. Ainsi, la sous-unité COX I serait phosphorylée au niveau des résidus sérine 441 (Bender and Kadenbach 2000) et tyrosine 304 (Lee, Salomon et al. 2005). Les sous-unités COX IV et COX Vb possèdent également des sites de phosphorylation (Ogbi and Johnson 2006, Prabu, Anandatheerthavarada et al. 2006).

Le cytochrome c peut également être phosphorylé, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la respiration mitochondriale en augmentant le potentiel de membrane pour une meilleure synthèse d'ATP sans production excessive de ROS (Huttemann, Lee et al. 2012).

Un site de phosphorylation sur la sérine 82 de l'enzyme de détoxification des ROS, MnSOD, a été mis en évidence. La phosphorylation de cette enzyme aurait un rôle inhibiteur (Bykova, Stensballe et al. 2003, Castellano, Cecere et al. 2009). Inversement, le calcium induit une déphosphorylation de la MnSOD aboutissant à une augmentation de son activité (Hopper, Carroll et al. 2006).

II.3.2. Mécanisme d'acétylation

Cette modification post-traductionnelle apparaît comme un régulateur clé de la fonction mitochondriale. En effet, 20% des protéines mitochondriales possèdent un site putatif d'acétylation (Kim, Sprung et al. 2006). Une étude menée chez les souris a montré que sur 133 protéines mitochondriales peuvent être acétylées dont 49 impliquées dans la synthèse d'ATP (Anderson and Hirschey 2012).

Ainsi, de nombreuses déshydrogénases semblent être régulées par ce phénomène : quatre déshydrogénases du cycle de Krebs (fumarate déshydrogénase, malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et succinate déshydrogénase), cinq enzymes en lien ou impliquées dans la β -oxydation des acides gras et neuf sous-unités du complexe I (NUDFV1, NDUF51, NDUF56, NDUFA1, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA9, NDUFA10, NDUFB3) (Kim, Sprung et al. 2006).

La principale déacétylase mitochondriale est la protéine NAD⁺-dépendante SIRT3. Elle est responsable de la perte d'un groupement acétyl sur les résidus lysine de ses protéines cibles. Son activité est étroitement régulée par le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial (Desquiret-Dumas,

Gueguen et al. 2013). Les fonctions et les régulations induites par les protéines de la famille des sirtuines seront développées plus amplement dans le paragraphe V.

NDUFA9 est la plus étudiée des sous-unités acétylées du complexe I. Chez les souris SIRT3 KO, une hyperacétylation de NDUFA9 est observée et semble corrélée à une diminution d'activité de ce complexe ainsi qu'une synthèse d'ATP moindre (Ahn, Kim et al. 2008).

SIRT3 peut interagir également avec la sous-unité SDHA du complexe II. Cette sous-unité possède 7 lysines acétylées et sa déacétylation par SIRT3 induit une augmentation d'activité du complexe II (Finley, Haas et al. 2011).

L'activité du complexe V pourrait être régulée par l'acétylation au niveau de la sous-unité OSCP (Finley, Haas et al. 2011, Vassilopoulos, Pennington et al. 2014).

L'activité de la principale enzyme de détoxification des ROS mitochondriaux, la MnSOD, est également régulée par acétylation. Ainsi dans des cellules invalidées pour SIRT3, la quantité de superoxydes est augmentée, suggérant que la MnSOD sous forme acétylée est inactive (Tao, Coleman et al. 2010, Ozden, Park et al. 2011).

II.4. Régulation transcriptionnelle : la biogenèse mitochondriale

La régulation transcriptionnelle permet une adaptation du métabolisme cellulaire pour faire face à des besoins accrus en énergie, qui se déroulent de manière répétée ou de façon prolongée, comme les entraînements physiques réguliers (Joseph, Pilegaard et al. 2006), les régimes ou la restriction calorique. En réponse à ces situations, des messagers induisent des modifications de la masse mitochondriale. Lorsque celle-ci est augmentée, on parle de biogenèse mitochondriale qui se définit comme l'ensemble des processus nécessaires au développement et à la division de mitochondries préexistantes dans le but d'augmenter la masse mitochondriale, pour faire face à des modifications de l'environnement (Jornayvaz and Shulman 2010).

Du fait de la double origine des protéines mitochondriales, ce mécanisme requiert l'expression coordonnée des 2 génomes. Des protéines sont responsables de cette coordination notamment le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α qui se fixe sur les régions promotrices des gènes cibles, recrute les facteurs généraux de transcription et initie ainsi le déclenchement d'une cascade d'activation impliquant notamment NRF1 et NRF2. Ceci aboutit à la synthèse des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. En parallèle, la transcription du génome mitochondrial est activée par TFAM. Une bonne corrélation spatio-temporelle entre ces différents facteurs est nécessaire et un défaut dans l'un des mécanismes peut aboutir à une dérégulation de la voie de biogenèse mitochondriale.

III. *Altérations de la fonction mitochondriale*

L'activité mitochondriale est dérégulée dans de nombreuses situations qui peuvent être physiologiques, telles que le vieillissement, ou pathologiques, comme par exemple dans le cas des maladies mitochondriales. Ces situations se caractérisent par une altération de la fonction mitochondriale : une production de ROS accrue, une diminution de la synthèse d'ATP, une augmentation du rapport NADH/NAD^+ ...

III.1. Le vieillissement

Le vieillissement et la compréhension des mécanismes à l'origine de ce phénomène ont depuis toujours suscité de nombreuses interrogations. Malgré l'existence d'une variabilité interindividuelle, le vieillissement se caractérise par une diminution des capacités d'adaptations face à l'effort et au stress et une détérioration progressive du métabolisme. La mitochondrie, de par son rôle clef dans le stress oxydant et dans le métabolisme énergétique, pourrait donc être impliquée ce processus biologique (Bratic and Larsson 2013).

III.1.1. Aspect historique

La première théorie liant la mitochondrie au vieillissement date des années 1954 et a été émise par Denham et Harman (Harman 1956). Selon cette théorie, le vieillissement résulterait de l'augmentation de la production de ROS et de leurs effets délétères sur la cellule. En effet, des études ont montré que le stress oxydant était augmenté avec l'âge du fait d'un déclin de la fonction mitochondriale. Celui-ci s'accompagnerait d'une augmentation des mutations au sein de l'ADN mitochondrial. L'apparition de ces mutations contribue à amplifier la défaillance mitochondriale liée à l'âge et donc la production de ROS ainsi que leurs effets délétères (dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN).

Même si cette théorie est à l'heure actuelle discutée (Sanz and Stefanatos 2008), il est communément admis que la mitochondrie puisse être un élément majeur du processus de vieillissement (Bratic and Trifunovic 2010, Bratic and Larsson 2013). Ainsi, de nombreuses

altérations de la fonction, de la structure de l'ADN mitochondrial ont été constatées au cours du vieillissement.

III.1.2. Altération de la fonction mitochondriale au cours du vieillissement

La première fonction de la mitochondrie est de produire de l'énergie sous forme d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. La synthèse d'ATP semble particulièrement impactée au cours du vieillissement. Short *et al.* (2005), ont montré que la capacité maximale de synthèse d'ATP diminuait de 5% par décennie (Short, Bigelow et al. 2005). La diminution de la synthèse d'ATP observée dans les modèles soumis au vieillissement s'explique tout d'abord par une diminution de la respiration liée aux différents complexes de la chaîne respiratoire (Cooper, Mann et al. 1992). Ainsi, l'activité des complexes I et IV serait particulièrement impactée par le vieillissement aussi bien chez l'homme (Boffoli, Scacco et al. 1994) que chez le rongeur (Picard, Ritchie et al. 2010). A l'inverse, l'activité du complexe II semble inchangée (Pastoris, Boschi et al. 2000, Kerner, Turkaly et al. 2001). Les données concernant les autres complexes de la chaîne respiratoire sont plus discordantes (Mootha, Bunkenborg et al. 2003).

Une incidence du vieillissement sur les complexes I et IV sans impact sur le complexe II pourrait s'expliquer par une augmentation des mutations au sein de l'ADN mitochondrial. En effet, le complexe II est le seul complexe de la chaîne respiratoire entièrement codé par le génome nucléaire. Or, lors du vieillissement, une augmentation des altérations du génome mitochondrial (augmentation du nombre de délétions et de mutations) a été montrée dans de nombreux tissus parmi lesquels le muscle, les hépatocytes, le système nerveux central (Khrapko and Vijg 2009). Ces mutations pourraient résulter des dommages à l'ADN induit par les ROS (Barazzoni, Short et al. 2000, Peterson, Johannsen et al. 2012). En effet, chez l'animal, le vieillissement ou les maladies liées au vieillissement (comme Alzheimer ou Parkinson) se caractérisent par une augmentation de la production de ROS (Pimentel, Batista-Nascimento et al. 2012). De plus, le vieillissement se caractérise par une diminution de l'activité d'enzymes impliquées dans la détoxification de ces molécules comme la MnSOD (Armeni, Principato et al. 2003, Ren, Li et al. 2007). Cependant une étude menée par Raamsdonk *et al.* (2009) a montré que l'inactivation du gène de la MnSOD chez *C.elegans* augmentait l'espérance de vie des animaux malgré une augmentation du stress oxydant (Van Raamsdonk and Hekimi 2009). A l'inverse, plusieurs études menées chez la souris ont montré que le KO de la MnSOD réduisait l'espérance de vie des animaux traités (Weyemi, Parekh et al. 2012).

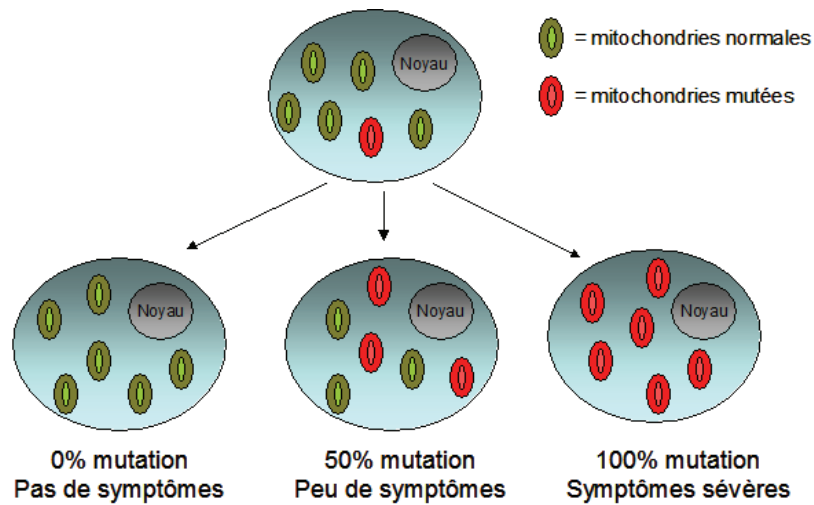


Figure 11 : Schéma représentant la définition de l'hétéroplasmie

Lors de la division cellulaire, une cellule mère possédant un mélange de copies d'ADNmt mutées et normales peut former plusieurs cellules filles. Dans le premier cas la cellule fille ne reçoit que des copies d'ADNmt normales, elle sera donc homoplasmique saine. Dans le dernier cas, la cellule fille ne reçoit que des copies d'ADNmt mutées, elle sera donc homoplasmique mutée. Enfin la cellule fille située au milieu reçoit un mélange d'ADNmt muté et sauvage, elle est dite hétéroplasmique.

La diminution de la synthèse énergétique observée dans les différents modèles de vieillissement pourrait aussi résulter d'une modification de la structure des crêtes mitochondriales. En effet, Daum *et al.* (2013) (Daum, Walter et al. 2013), a montré qu'au cours du vieillissement une altération de la dimérisation de l'ATP synthase était observée. La dimérisation de l'ATP synthase est un élément important pour la formation des crêtes de la membrane interne (Davies, Anselmi et al. 2012). Une étude menée en 2005, avait précédemment démontré que la structure globale des mitochondries était altérée au cours du vieillissement (Balaban, Nemoto et al. 2005).

Le vieillissement apparaît comme un phénomène physiologique multifactoriel dont l'initiateur et les acteurs biochimiques restent méconnus. De plus, les différents phénomènes impliqués dans le vieillissement (augmentation de la production de ROS, augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial, modification du métabolisme énergétique) semblent étroitement liés. La plupart des études s'attachent à décrire l'un de ces paramètres mais des études plus globales semblent nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes mitochondriaux impliqués dans le vieillissement.

III.2. Les maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par un déficit de la chaîne respiratoire. Ces pathologies résultent de mutations altérant la fonction des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Du fait la double origine des sous-unités des complexes, les mutations peuvent toucher soit le génome nucléaire ou le génome mitochondrial. De multiples copies d'ADN sont présentes au sein des mitochondries. Ainsi, une mutation peut affecter toutes les copies d'ADN, on parle alors de mutation homoplasmique. Si une partie seulement des copies est affectée par la mutation, on parle d'hétéroplasmie (Figure 11).

Le déficit du complexe I est le plus commun des déficits observés dans les pathologies mitochondriales, représentant environ 30% des cas (Tucker, Compton et al. 2011, Fassone and Rahman 2012). Les phénotypes cliniques présentés par les patients porteurs d'un déficit du complexe I sont très hétérogènes, parmi ces phénotypes on distingue : le syndrome de Leigh (Sofou, De Coo et al. 2014), qui est un désordre multi-systémique et la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) (Chinnery and Hudson 2013).

III.2.1. La neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)

La maladie de Leber ou LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) a été décrite pour la première fois par Theodor LEBER en 1871. Son mode de transmission, non mendélienne, maternelle, a été exposé en 1972 par Erickson (Erickson 1972). Enfin, la première mutation ponctuelle sur l'ADN mitochondrial en position nucléotidique 11778 a été découverte en 1988 par Wallace *et al.*, (m.11778G>A) (Wallace, Singh et al. 1988).

a) Aspect clinique

Cette pathologie se caractérise par une perte rapide de la vision centrale chez le jeune adulte (entre 18 et 35 ans). Sa prévalence va de 1/30 000 à 1/50 000 individus, en fonction de la population étudiée ; ainsi, la prévalence serait de 1 pour 31 000 en Angleterre et 1 pour 50 000 en Finlande (Spruijt, Kolbach et al. 2006, Puomila, Hamalainen et al. 2007). Sa pénétrance est incomplète et cette pathologie affecte principalement les hommes (5 cas sur 6). Au niveau clinique, deux phases sont distinguées. La phase aiguë, qui se caractérise par une perte de l'acuité visuelle généralement sévère, brutale et le plus souvent unilatérale (dans 25% des cas bilatérale d'emblée). Après un délai qui peut aller de quelques jours à quelques mois l'atteinte devient bilatérale (Yu-Wai-Man and Chinnery 1993). La vision globale est profondément altérée avec la présence d'un scotome centro-caecal, la vision périphérique étant plus ou moins préservée. La phase chronique se caractérise par l'apparition d'un disque optique atrophié dû à la dégénérescence sélective des cellules de la rétine (RGC) et de leurs axones (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004). L'amélioration spontanée de l'acuité visuelle est rare et ces patients souffrent de cécité légale (acuité visuelle inférieure à 20/200). L'atteinte visuelle est généralement le seul symptôme identifié, mais certains patients peuvent présenter des atteintes neurologiques additionnelles tels qu'une encéphalopathie, une neuropathie périphérique, une dystonie, ou des atteintes cardiaques (arythmies) ; on parle alors de forme Leber « plus » (Nikoskelainen, Marttila et al. 1995, Palace 2009).

b) Aspect génétique

La maladie de Leber est causée par des mutations de l'ADN mitochondrial. 95% des cas sont dus à 3 mutations dans des gènes codant pour des sous-unités du complexe I : m.3460G>A (sous-unité ND1), m.11778G>A (sous-unité ND4), m.14484T>C (sous-unité ND6). D'autres mutations pathogènes plus rares ont été décrites au sein des sous-unités ND1, ND4, ND4L, ND6 du complexe I (Carelli, Ross-Cisneros et al. 2004). Ces mutations sont généralement homoplasmiques. Cependant, une étude menée sur 167 patients a montré que dans 40% des cas la mutation m.3460G>A était hétéroplasmique. Le taux d'hétéroplasmie pourrait influencer l'expression de la maladie, ainsi le risque de développer la pathologie est plus important chez les patients présentant

un taux d'hétéroplasmie supérieur à 75% (Yen, Wang et al. 2006). D'autre part, l'haplogroupe mitochondrial semble également exercer une influence sur l'expression de la pathologie : en effet, un risque accru de cécité a été associé avec l'haplogroupe J pour les mutations m.11778G>A et m.14484T>C, tandis que l'haplogroupe H en association avec la mutation m.11778G>A semble plutôt protecteur (Hudson, Carelli et al. 2007).

c) Aspect biochimique

Au niveau biochimique, les études se sont essentiellement portées sur des modèles cellulaires : fibroblastes de patients ou modèles cybrides porteurs des différentes mutations. L'altération principale étudiée porte sur l'activité du complexe I, puisque les mutations sont localisées au sein de sous-unités de ce complexe. La mutation m.3460G>A dans la sous-unité ND1 semble entraîner une diminution majeure de l'activité NADH:Ubiquinone oxydoréductase du complexe I. A l'inverse, des mutations dans les sous-unités ND4 et ND6 n'induisent pas forcément de diminution significative de l'activité de ce complexe (Carelli, Ghelli et al. 1999). Ainsi, l'activité du complexe I est diminuée de 79% dans les cybrides porteurs de la mutation m.3460G>A, de seulement 20% dans ceux porteurs de la mutation m.11778G>A et n'est pas modifiée dans ceux porteurs de la mutation m.14484T>C (Brown 1999). L'analyse de la respiration liée au complexe I (malate+pyruvate ; malate+glutamate) sur des cybrides a montré que ces trois mutations aboutissaient à un défaut de la respiration (Brown, Trounce et al. 2000). Une diminution de la respiration liée au complexe I accompagnée par un défaut de la synthèse d'ATP a également été retrouvée sur un panel de fibroblastes de patients porteurs de ces mutations (Chevrollier, Guillet et al. 2008). Une augmentation de la production de ROS peut parfois être observée chez certains patients atteints par cette pathologie (Yen, Wang et al. 2006, Kirches 2011). Dans le modèle cybride, une diminution de l'expression des défenses anti-oxydantes a pu être observée dans les cellules porteuses des mutations induisant le phénotype le plus sévère (mutations m.3460G>A puis m.11778G>A; (Floreani, Napoli et al. 2005)). A l'heure actuelle, la physiopathologie de syndrome LEBER reste encore mal connue. Ainsi, les différences de sévérité clinique et biochimique observées en fonction des différentes mutations restent mal comprises, et pourraient être liées aux différents rôles du complexe I.

III.2.2. Le syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh, ou encéphalomyopathie juvénile subaiguë nécrosante, est ainsi nommé d'après Archibald Denis Leigh (1915-1998), un neuropsychiatre britannique qui a décrit le premier cette pathologie en 1951.

a) Aspect clinique

Le syndrome de Leigh se caractérise par des lésions nécrotiques bilatérales, focales, principalement dans le tronc cérébral, les noyaux gris centraux et dans les ganglions de la base du cerveau. Les patients peuvent également présenter des anomalies du cervelet et de la moelle épinière. Les symptômes débent généralement dans la première année de vie et aboutissent à la mort du patient dans l'enfance. Dans de rares cas, ce syndrome s'exprime plus tard dans l'enfance voire chez l'adulte (Tiranti, Corona et al. 2000, Van Maldergem, Trijbels et al. 2002). Les symptômes apparaissent souvent après un événement déclenchant, caractérisé par une hausse de la demande énergétique, comme un épisode infectieux. La maladie de Leigh débute par une régression psychomotrice rapide, accompagnée de symptômes incluant diarrhée, vomissements et dysphagie. La pathologie progresse généralement par une atteinte majeure du système musculaire, avec une hypotonie (faible tonus musculaire), une dystonie (contraction musculaire involontaire, prolongée) et ataxie (manque de contrôle du mouvement). Ces signes peuvent s'accompagner au niveau oculaire d'une ophtalmoparésie et/ou un nystagmus; au niveau cardiaque, d'une hypertrophie, ou encore au niveau neurologique d'une neuropathie périphérique. Enfin, l'insuffisance respiratoire est plus fréquente cause de décès ces patients (Shrikhande, Kalakoti et al. 2010).

b) Aspect génétique

Cette pathologie peut être due à la fois à des mutations affectant le génome mitochondrial ou nucléaire. Le phénotype clinique de Leigh a été retrouvé chez des patients porteurs de mutations dans plus de 32 gènes.

Entre 20 et 25% des syndromes de Leigh sont liés à des mutations de l'ADN mitochondrial. La plus commune de ces mutations (10 à 20 % des patients) est une mutation ponctuelle située dans la sous-unité MT-ATP6 de l'ATP synthase, en position nucléotidique m.8993T>G/C. Les autres mutations dans l'ADN mitochondrial associées au syndrome de Leigh se situent dans des sous-unités du complexe I, des mutations ont notamment été décrites dans 6 des 7 sous-unités mitochondriales du complexe I (excepté ND4L).

La grande majorité des patients Leigh sont donc porteurs de mutations au sein de gènes nucléaires (75 à 80% des cas). Ces mutations se répartissent dans des gènes codant pour des sous-unités des complexes II et IV, la PDH et des facteurs d'assemblage comme SURF1 (Lee, El-Hattab et al. 2012). Les autres mutations majeures associées au syndrome de Leigh ont été retrouvées au sein d'au moins 11 des sous-unités du complexe I, parmi lesquelles NDUFA10 sur le chromosome 2; NDUFS4, NDUFAF2 et NDUFA2 sur le chromosome 5 ; NDUFAF6 sur le chromosome 8, NDUFS3, NDUFS8, NDUFV1 et FOXRED1 sur le chromosome 11; NDUFA9 et NDUFA12 sur le chromosome 12; et NDUFS7 sur le chromosome 19. Les sous-unités NDUFS4 et NDUFV1

constituent des « hot spot » mutationnels avec plus de 10 mutations différentes décrites pour chacune de ces deux sous-unités (Pagniez-Mammeri, Loublrier et al. 2012).

c) Aspect biochimique

Au niveau biochimique, à l'image des autres pathologies mitochondriales, une élévation du taux de lactate dans le sérum, les urines ou le liquide céphalo rachidien, est souvent observée. De même une élévation du ratio Lactate/Pyruvate est fréquemment retrouvée dans les cultures fibroblastiques issues de ces patients.

Des études menées sur les muscles des patients ont montré que la fonction mitochondriale était altérée dans plus de 50% des cas (Finsterer 2008). Les altérations présentées par les patients sont généralement des déficits enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, chez les patients porteurs de mutations dans des sous-unités du complexe I, l'activité NADH:Ubiquinone oxydoréductase serait réduite de plus de 60% par rapport à des cellules contrôles (Loeffen, Smeitink et al. 2000). De plus, une altération globale du métabolisme mitochondrial est observée chez certains patients : augmentation de la production de ROS, diminution du potentiel de membrane, diminution du taux d'ATP, diminution de la concentration calcique... (Distelmaier, Koopman et al. 2009).

IV. Le complexe I, cible et moteur de régulation

Le complexe I est le plus gros (1MkDa) des complexes de la chaîne respiratoire. Ce complexe se compose d'au moins 44 sous-unités dont 14 sont essentielles pour la fonction catalytique (Brandt 2006, Carroll, Fearnley et al. 2006). Il catalyse l'oxydation du NADH couplée à la réduction de l'ubiquinone et à un transfert de protons au travers de la membrane interne mitochondriale.

IV.1. Assemblage du complexe I

Depuis les années 2000, de nombreux travaux ont porté sur l'assemblage de ce complexe aboutissant à plusieurs modèles (Lazarou et al, 2009 et Mimaki et al, 2012). Jusqu'en 2014, en l'absence de structure cristallographique du complexe I, les travaux menés sur l'assemblage du

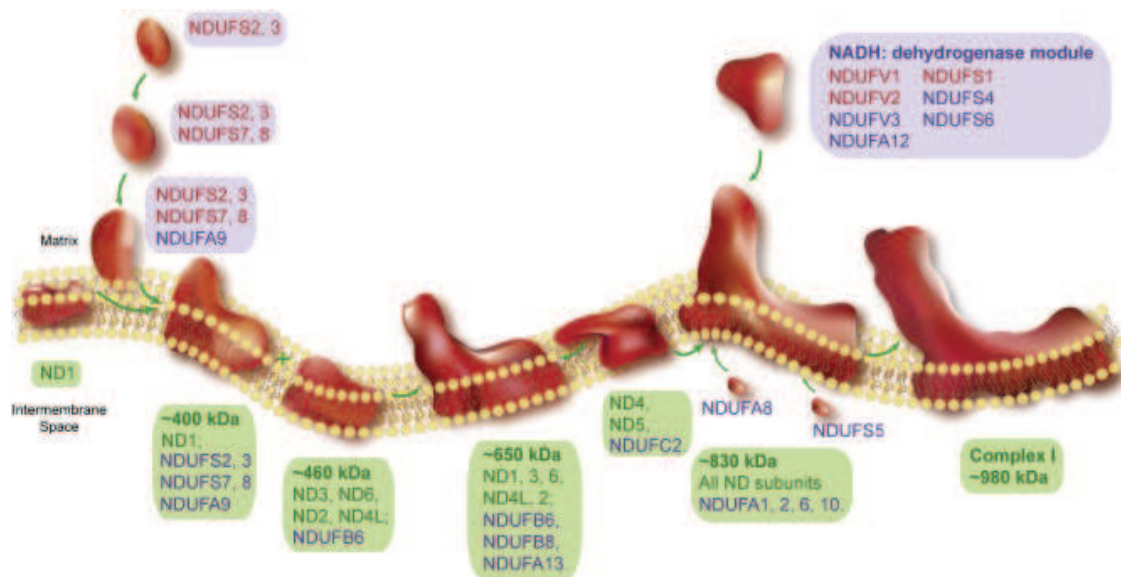


Figure 12 : Schéma représentant l'assemblage du complexe I

Modèle d'assemblage du complexe I proposé par Mimaki *et al.*, (2012). L'assemblage débute par l'association des sous-unités NDUFS2, NDUSF3, NDUFS7, NDUFS8 et NDUFA9 à la sous-unité ND1 formant un complexe d'environ 400kDa. Trois des sept sous-unités mitochondriales (ND3, ND6, ND2, ND4L) ainsi que la sous-unité NDUFB6 s'associent à ce complexe. L'ajout des sous-unités NDUFB8 et NDUFA13 aboutit à la formation d'un intermédiaire d'assemblage de 650kDa. Les dernières sous-unités mitochondriales (ND4 et ND5) s'intègrent dans le complexe. Puis l'assemblage se finalise avec l'ajout du module N contenant NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFV12, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS6, NDUFA12, NDUFV3. (Mimaki, Wang *et al.* 2012).

complexe I se basaient principalement sur un défaut d'assemblage induit (par des mutations) ou sur la structure du domaine hydrophile de la bactérie (*Thermus thermophilus*) (Potluri, Yadava et al. 2004, Sazanov and Hinchliffe 2006). La structure cristallographique obtenue récemment par Vinothkumar *et al.*, (Vinothkumar, Zhu et al. 2014) permettra certainement de mieux comprendre l'assemblage de ce complexe.

D'après Mimaki *et al.*, (2012), NDUFS2 et NDUFS3 s'associent puis s'assemblent avec les sous-unités NDUFS7, NDUFS8 (Figure 12). L'assemblage du complexe I s'initie alors par l'attachement de ce sous complexe (NDUFS2+NDUFS3+NDUFS7+NDUFS8+NDUFA9) à la sous-unité ND1 enchâssée dans la membrane. Un sous complexe contenant les sous-unités ND2, ND3, ND4L, NDUFB6 et ND6 est stabilisé grâce aux facteurs d'assemblage NDUF1. Ces deux sous complexes s'assemblent et sont stabilisés en présence de NDUF2 (facteur d'assemblage) formant un intermédiaire d'assemblage d'environ 650kDa. Les dernières sous-unités mitochondriales ND4 et ND5 sont alors assemblées ainsi que la sous-unité nucléaire NDUC2. Les sous-unités nucléaires NDUF1, NDUF2, NDUF6, NDUF10 ainsi que les sous-unités NDUF8 et NDUFS5 s'associent successivement à cet intermédiaire d'assemblage pour former un complexe de 830kDa environ. L'assemblage du complexe I se termine par l'ajout d'un bloc contenant le module catalytique (module N : NDUFS1, NDUFV1, NDUFS2, NDUFS4, NDUFS6, NDUFV3, NDUF12) (Mimaki, Wang et al. 2012).

Contrairement au modèle proposé par Lazarou et al, dans lequel les sous-unités mitochondriales ND4 et ND5 sont les dernières sous-unités assemblées. Ces sous-unités mitochondriales s'intègrent de manière plus précoce dans le modèle ci-dessus.

Défaut d'assemblage du complexe I

De nombreux déficits du complexe I se caractérisent par un défaut d'assemblage ou une réduction de la quantité d'holoenzyme correctement formée (Mimaki, Wang et al. 2012). Ainsi, selon Assouline *et al.*, (Assouline, Jambou et al. 2012) des mutations dans la sous-unité NDUFS4 aboutissent à un défaut d'assemblage constant quelle que soit la mutation, avec un intermédiaire d'assemblage à environ 830kDa, et peu (ou pas) d'holoenzyme (1MDa). Cet intermédiaire d'assemblage correspond au complexe I sans le N-module.

De même, des patients porteurs de mutations pour des sous-unités mitochondriales ont montré une réduction de la quantité d'enzyme correctement assemblé (Ugalde, Triepels et al. 2003). Les défauts d'assemblage observés dans les cellules de patients s'accompagnent généralement d'une réduction majeure de l'activité catalytique du complexe I.

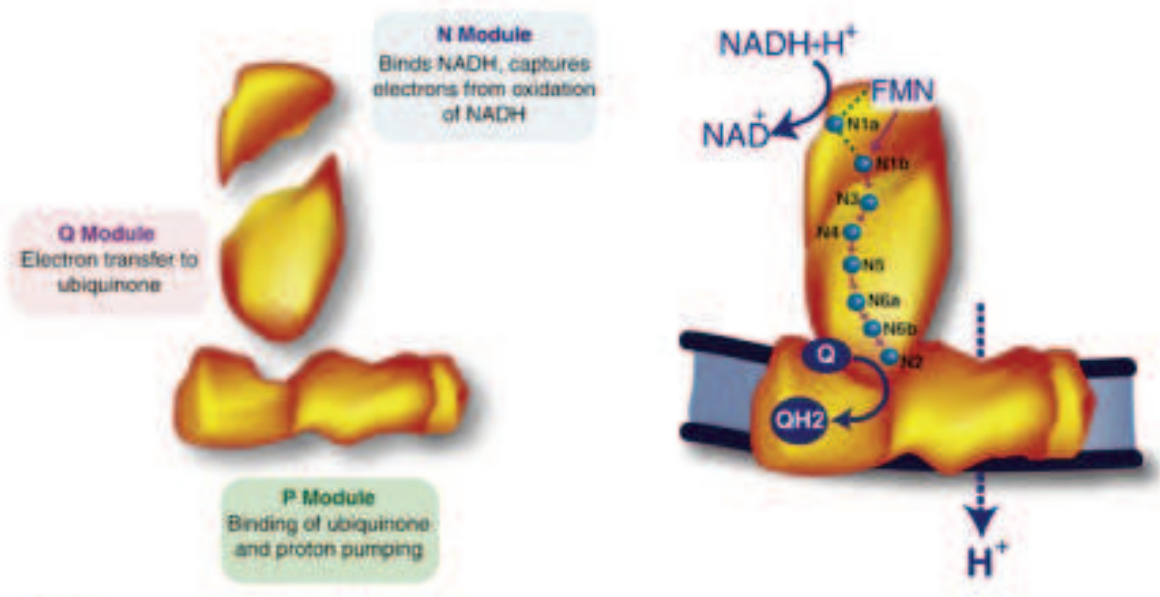


Figure 13 : Schéma des différents modules du complexe I et de ses fonctions catalytiques
 Le complexe I peut être divisé en trois modules catalytiques, le module N responsable de la fixation et de l'oxydation du NADH, le module Q responsable du transfert des électrons jusqu'à la quinone et aussi de sa réduction. Enfin, le module P responsable du pompage de protons.
 (Lazarou, Thorburn et al. 2009)

IV.2. Les activités enzymatiques du complexe I

Le complexe I peut être divisé en 3 modules possédant chacun leur activité enzymatique : le module N responsable de l'oxydation du NADH, le module Q responsable de l'oxydation de la quinone et le module P responsable du transfert de protons (Figure 13).

IV.2.1. L'activité NADH déshydrogénase du complexe I

Le complexe I oxyde le NADH au niveau du module N. La composition de ce module comprendrait la sous-unité NDUFV1 fixant la FMN et deux sous-unités contenant des clusters Fe-S (NDUFS1, NDUFV2), plus les sous-unités accessoires NDUFV3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6 et NDUFV12. En 2006, la découverte de la structure cristalline du domaine hydrophobique du complexe I de la bactérie (*Thermus thermophilus*) a permis de progresser dans la compréhension du fonctionnement de ce complexe (Sazanov and Hinchliffe 2006), cependant, le mécanisme catalytique n'est pas clairement démontré.

La communauté scientifique s'accorde sur le fait que le NADH se lie dans une cavité de la sous-unité NqO1 (homologue de NDUFV1 chez l'homme) (Berrisford and Sazanov 2009). Cette fixation serait notamment due à la présence de 3 résidus phénylalanines très conservés (F70, F78, F205) de la sous-unité NqO1. Le noyau nicotinamide du NADH se positionne face au groupement alexine de la FMN, et son oxydation s'effectue par transfert hybride du carbone C4 du NADH vers l'atome N5 de la FMN (Birrell, King et al. 2011).

L'oxydation du NADH par le site FMN du complexe I pourrait faire intervenir au moins trois mécanismes différents (Birrell, King et al. 2011). Tous ces mécanismes se caractérisent par la fixation du NADH, un transfert d'électrons avec la FMN, la dissociation du NAD^+ et l'oxydation de la FMN (Figure 14). Dans le premier cas, le NADH se fixe, la flavine est réduite par le NADH, le NAD^+ formé se dissocie et la flavine libre est réoxydée par les clusters Fe-S (en bleu et noir). D'autres accepteurs d'électrons peuvent réduire la flavine en l'absence de nicotinamide chargé, comme l'oxygène (Kussmaul and Hirst 2006), des quinones hydrophiles (King, Sharpley et al. 2009) (en bleu sur le schéma).

D'autres accepteurs peuvent réduire la flavine en présence de nucléotides comme l'héxaammineruthenium III et ceux en aval ou en amont de la dissociation du NAD^+ (voie en rouge et verte sur le schéma).

La concentration en NADH et en NAD^+ , le rapport NADH/NAD^+ et l'état d'oxydation de la chaîne Fer- Soufre détermine le mécanisme de réduction de la FMN.

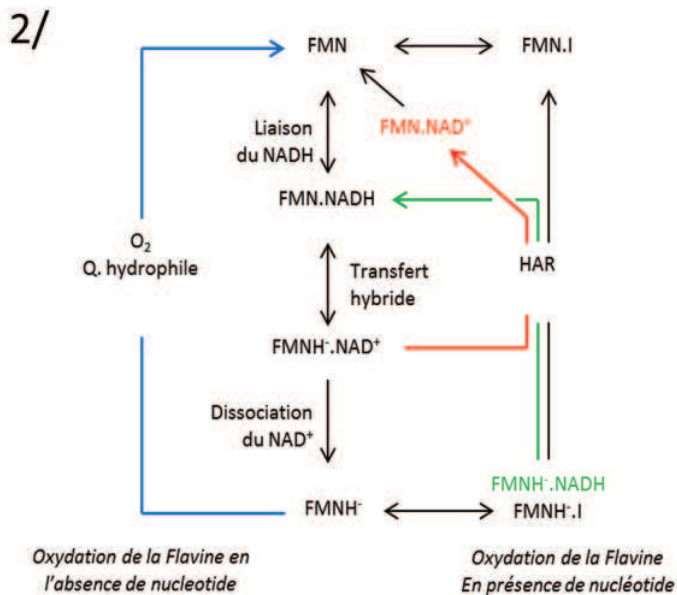
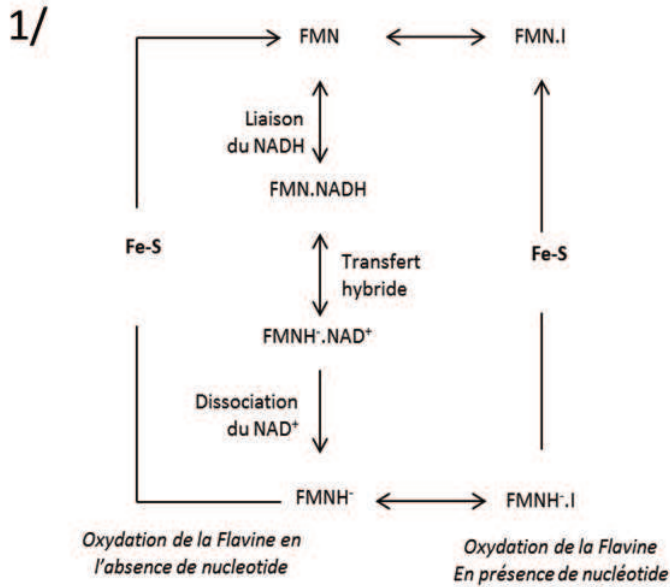


Figure 14 : Mécanisme de l'oxydation du NADH et de la réduction de la FMN au sein du complexe I
 1/Le NADH se lie à la FMN (FMN.NADH) et induit son oxydation (FMNH·) et la dissociation du NAD⁺. La FMN est réduite par les centres Fer-Soufre que ce soit en présence de nucléotide (noté I sur le schéma) ou en l'absence de nucléotide (voie de gauche sur le schéma).

2/ D'autres accepteurs d'électrons peuvent réduire la flavine. Deux cas sont possibles, les accepteurs d'électrons qui se lient en l'absence de nucléotide (comme l'oxygène voie bleue sur le schéma) et ceux qui se lient comme le HAR en présence de nucléotide tel que l'ADP, ATP, NADH. Il semblerait que le HAR (chargé positivement) possède moins d'affinité avec la FMNH oxydé lié NAD⁺ du fait de la charge de ce dernier (voie en rouge sur le schéma).

D'après (Birrell, King et al. 2011, Birrell and Hirst 2013).

IV.2.2. La réduction de la quinone par le complexe I

La réduction de la quinone s'effectue grâce aux électrons générés lors de l'oxydation du NADH. L'oxydation de la quinone nécessite donc le transfert des électrons jusqu'au site de réduction des quinones.

a) Le transfert des électrons de la FMN à la quinone

L'oxydation du NADH par le module N génère deux électrons, nécessaires à la réduction de la quinone au niveau du module Q. En 2010, l'étude sur la levure *Yarrowia lipolytica* (Hunte, Zickermann et al. 2010) a montré l'existence de 8 clusters, un cluster avec deux noyaux [2Fe-2S] organisé de part et d'autres de la FMN (N1a, N1b) et six clusters avec 4 centres Fe-S [4Fe-4S], (N3, N4, N5, N6a, N6b, N2). Cette organisation des clusters Fe-S a aussi été observée chez la bactérie (*Thermus thermophilus*) dont le complexe I a une structure proche de celle de l'homme (Sazanov and Hinchliffe 2006).

Parmi les deux premiers clusters avec deux noyaux [2Fe-2S], le cluster N1b semble être la voie préférentielle d'entrée des électrons au sein de cette chaîne. Le rôle physiologique du cluster N1a reste méconnu. Il pourrait être impliqué dans le stockage transitoire d'un électron de la flavine semi réduite, soit pour minimiser la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du turnover soit pour diminuer la production directe de H₂O₂ (Esterhazy, King et al. 2008). Cependant cette hypothèse reste controversée (Birrell and Hirst 2013).

Le transfert des électrons le long de la chaîne du cluster N1b au cluster N2 est un processus rapide et ne semble pas être le facteur limitant de l'activité catalytique du complexe I (Hirst 2013). La vitesse de transfert des électrons entre les clusters dépend de la distance les séparant (inférieure à 14 angstroms chez *T. Thermophilis*, (Sazanov and Hinchliffe 2006)) ainsi que de leurs différents potentiels redox. Les potentiels énergétiques nécessaires à la réduction de chaque cluster sont connus et des simulations mathématiques permettent d'évaluer le temps nécessaire pour le transfert des électrons. En tenant compte des interactions électrostatiques entre clusters, la vitesse de catalyse de la réaction NADH Ubiquinone Reductase, calculée par simulation informatique, se situerait entre 0.4 ms et 3.9 ms, ce qui est en accord avec le turnover observé *in vitro*, d'environ 1,7 ms (Hirst 2013).

b) La réduction de la quinone

Les électrons transmis au cluster N2 *via* l'ensemble des 5 clusters Fe-S vont permettre la réduction de la quinone. La réduction de la quinone en quinol est un processus engageant les électrons un par un, ce qui pourrait permettre la formation d'espèces semiquinones pendant le cycle. De tels intermédiaires ont été obtenus dans des études EPR (Ohnishi, Ohnishi et al. 2012) et sur d'autres réalisées sur des vésicules mitochondriales (Burbaev, Moroz et al. 1991). Cependant, leur présence n'a pas été confirmée expérimentalement *in situ*.

Le site de fixation de la quinone reste également incomplètement caractérisé. Ce site se situe à l'interface entre les bras hydrophile et hydrophobe du complexe I, dans un environnement formé des sous-unités ND1, NDUFS2, NDUFS7, NDUFS8, supporté par la première boucle matricielle de la sous-unité ND3. Des études par mutagenèse ont permis à Kerscher *et al.*, (2001) (Kerscher, Kashani-Poor et al. 2001) et Kashani-Poor *et al.*, (2001) (Kashani-Poor, Zwicker et al. 2001) de démontrer que les sous-unités NDUFS7 (aussi appelée PSST) et NDUFS2 seraient le lieu de la fixation et de la réduction de la quinone. La tyrosine 144 de la sous-unité NDUFS2, très proche du cluster final N2, serait notamment essentielle à la réduction de la quinone et reconnaîtrait par son groupement hydroxyl le cycle de la quinone ; toute mutation de cet acide aminé entraîne la perte de l'activité réductase du complexe I (Tocilescu, Fendel et al. 2010).

Les sous-unités NDUFS7 et NDUFS2 interagissent avec la sous-unité ND3 (Kao, Matsuno-Yagi et al. 2004). Cependant, cette sous-unité aurait plus un rôle structural qu'un rôle catalytique (Hirst 2013). Enfin, plusieurs études ont montré que la sous-unité ND1 était impliquée dans la fixation des inhibiteurs du cycle des quinones comme l'arylazidoamorphigenin (analogue de la roténone) (Earley and Ragan 1984, Schuler and Casida 2001, Murai, Sekiguchi et al. 2009).

IV.2.3. Le transfert de protons

Pour une molécule de NADH oxydé par le complexe I, 4 protons sont transférés de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce transfert se déroule au niveau du P module, bras hydrophobe membranaire.

Selon des algorithmes mathématiques, le P module serait constitué d'environ 17 sous-unités dont 7 impliquées dans le pompage de protons. Ces sous-unités sont toutes codées par le génome mitochondrial (ND1 à ND6 et ND4L). Ce module peut être divisé en deux sous modules de taille équivalente le P_P et le P_D (Drose, Krack et al. 2011). ND5 est la plus grande sous-unité hydrophobe du complexe pouvant contenir jusqu'à 18 hélices. ND2 et ND4 sont homologues à ND5 mais sont tronqués en C terminal. ND4L et ND6 ont respectivement les 3 et 5 hélices transmembranaires. Les sous-unités ND4 et ND5, contenus dans le P_D module, possèdent une structure homologue des transporteurs Na⁺/H⁺ bactériens, mais leur fonctionnement n'est pas clairement établi (Steuber

2001, Mathiesen and Hagerhall 2002). En effet, 3 modèles différents pour le pompage de protons sont proposés.

Le premier est un transfert direct couplé à un transfert d'électrons. Ce type de transfert nécessite donc que les sites impliqués dans la translocation de protons soient situés à proximité du site de fixation de la quinone et donc du cluster N2. La capacité du cluster N2 à capter des électrons (« midpoint potential ») a été montrée comme dépendante du pH (Ingledeew and Ohnishi 1980). Cette démonstration, ainsi que la localisation de ce cluster à environ 20-25 Å de la membrane (Efremov, Baradaran et al. 2010) appuient cette hypothèse. Cependant, en 2006, Zwicker *et al.*, ont montré chez *Yarrowia lipolytica* que la mutation du résidu lysine de ce cluster réduisait le potentiel redox du cluster N2, mais n'affecte pas la stœchiométrie du H^+/e^- , ni l'activité du complexe I (Zwicker, Galkin et al. 2006).

La deuxième théorie est liée au cycle des quinones. Dans celle-ci, proposé par Dutton *et al.*, 1998, pour chaque NADH oxydé, deux quinones sont réduites et une quinol est oxydée (Dutton, Moser et al. 1998). En 2006, Sherwood et Hirst (Sherwood and Hirst 2006) ont étudié ce mécanisme et n'ont pas pu clairement démontrer la formation de quinone par le complexe I remettant ainsi en cause le modèle de Dutton.

Le troisième mécanisme de transfert de protons induit par le complexe I semble indirect et serait lié à un changement de conformation de complexe I. Dans cette théorie, le premier proton serait transporté lors de la réduction de la quinone. Bottcher *et al.*, 2002, Sazanov *et al.*, 2003 et Morgan *et al.*, 2008 (Bottcher, Scheide et al. 2002, Sazanov, Carroll et al. 2003, Morgan and Sazanov 2008) ont observé des transitions conformationnelles du complexe I d'une forme active à une forme inactive. La théorie d'un transfert indirect des protons s'appuie sur un changement conformationnel dans l'environnement de la sous-unité ND5. Cette sous-unité contient une hélice transverse, longeant tout le domaine membranaire et formant une sorte de piston. La sous-unité ND5 est connectée aux sous-unités ND2 et ND4 *via* sa partie C-terminale et va induire le transfert de protons au sein de ces sous-unités.

D'autres études semblent donc nécessaires afin de déterminer les mécanismes biochimiques impliqués dans le transfert de protons par le complexe I.

IV.3. La production de ROS

Comme évoqué précédemment, la mitochondrie est la principale source de molécules dérivées de l'oxygène hautement réactives (ROS), à la fois de l'anion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène. Au niveau de la chaîne respiratoire, les complexes I et III étaient initialement décrits comme les deux principaux producteurs de ROS (Boveris and Chance 1973, Cino and Del Maestro 1989). Cependant, beaucoup d'auteurs s'accordent sur le fait que le complexe I semble être le principal producteur de ROS dans les mitochondries intactes de mammifères (McLennan and Degli Esposti 2000, Liu, Fiskum et al. 2002). La production de superoxyde par le complexe I a été démontrée aussi bien en utilisant le complexe isolé (Esterhazy, King et al. 2008), des particules submitochondriales (Vinogradov and Grivennikova 2005) ou des mitochondries intactes (Kushnareva, Murphy et al. 2002). Certaines questions concernant la production de ROS par ce complexe restent cependant très discutées.

Tout d'abord, la plupart des études qui démontrent l'implication de ce complexe dans cette production sont réalisées en présence d'un inhibiteur (la roténone) ou dans des conditions pathologiques (ischémie/reperfusion, dysfonction de l'un des complexes de la chaîne respiratoire). En conditions physiologiques, la production de ROS pourrait être faible (Murphy 2009, Zorov, Juhaszova et al. 2014).

D'autre part, le type d'espèces réactives générées reste débattu : anions superoxydes ou peroxyde d'hydrogène. Chez la bactérie *E.coli* (*Escherichia coli*) une étude a montré que le complexe I produisait du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Esterhazy, King et al. 2008). Bien que la structure catalytique du complexe I bactérien soit relativement proche de celle des mammifères, une étude menée sur complexes I isolés issus de cœur de bœuf a montré que 90% des espèces formées seraient des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), (Esterhazy, King et al. 2008). Des études complémentaires ont confirmé que le complexe I produisait majoritairement de l'anion superoxyde chez les mammifères (Hirst, King et al. 2008, Grivennikova and Vinogradov 2013). La différence observée entre les deux espèces n'est à l'heure actuelle pas clairement expliquée.

Enfin, le site de production de ROS fut très longtemps discuté (Genova, Ventura et al. 2001, Lambert and Brand 2004). La production de ROS par le complexe I serait induite que dans des conditions particulières. La première serait lorsque le rapport $NADH/NAD^+$ est augmenté dans la matrice (Kussmaul and Hirst 2006, Kudin, Malinska et al. 2008). La seconde serait lorsque le « pool » des quinones est très réduit, en conjonction avec un Δp maximal (absence de synthèse d'ATP (Korshunov, Skulachev et al. 1997, Lambert and Brand 2004)). Ce second mode entraînerait une production de ROS par flux reverse, c'est-à-dire un retour des électrons du complexe II vers le complexe I en passant par la quinone (Fato, Bergamini et al. 2009).

Ainsi, le composant particulier du complexe NADH Ubiquinone Oxidoreductase qui interagit directement avec l'oxygène fait toujours débat : un NAD^{\cdot} radical, la FMN (Galkin and

Brandt 2005, Vinogradov and Grivennikova 2005, Kussmaul and Hirst 2006), des espèces semiquinones (Lambert and Brand 2004, Ohnishi, Ohnishi et al. 2005), ou encore l'un des centres fer-soufre, N1a (Kushnareva, Murphy et al. 2002) ou N2 (Genova, Ventura et al. 2001) ont été suggérés comme les espèces impliquées dans la production de ROS. Les études réalisées sur complexe I et mitochondries isolés ont permis de retenir deux sites essentiels de production de ROS, le premier au niveau de la FMN (lors du transfert classique d'électrons mais aussi lors du flux reverse) et le second au niveau du site de réduction des quinones (Hirst, King et al. 2008).

Le premier site, impliquant la FMN du module N, est le site de production de ROS le plus reconnu (Massey, Strickland et al. 1969, Kudin, Bimpong-Buta et al. 2004, Kussmaul and Hirst 2006). Des études menées notamment sur enzymes isolées ont permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette production de ROS (Hirst, King et al. 2008). Ces études ont montré que la production de ROS est liée à l'oxydation du NADH, puisqu'en son absence la production de ROS est quasiment nulle. De plus, une production accrue de ROS est observée en l'absence d'accepteur d'électrons (notamment de type quinone). Cette production est inhibée lors d'une stimulation du turnover catalytique de l'enzyme par l'ajout d'un accepteur d'électrons (ubiquinone) ; tandis que l'ajout d'un inhibiteur du cycle des quinones (comme la roténone) n'induit pas de production accrue de ROS. L'utilisation de la Diphényleneiodonium (DPI) qui réagit spécifiquement avec la FMN inhibe la production de ROS (Liu, Fiskum et al. 2002). Ces résultats démontrent ainsi que lors de l'oxydation du NADH, les électrons sont transférés à la FMN. La FMN se retrouve alors sous forme semi-quinone, de type FMNH[•] ou totalement réduite de type FMNH₂. Comme nous l'avons vu au chapitre V.2.2.a, seule la FMN réduite libre est accessible aux molécules d'oxygènes, ainsi la présence de NAD⁺ ferme complètement l'accès à la FMN. Le NAD⁺ est donc un inhibiteur fort de la production de ROS par la FMN réduite. L'ajout d'un accepteur d'électron active l'oxydation du NADH en NAD⁺, induisant une augmentation du rapport NAD⁺/NADH, ce qui explique l'inhibition de la production de ROS (Kussmaul and Hirst 2006). L'état de réduction de la FMN est donc directement dépendant du ratio NADH/NAD⁺ (Birrell and Hirst 2013). La titration redox de la production de H₂O₂ liée à l'oxydation du NADH (production de ROS en fonction du ratio NADH/NAD⁺ imposé) fournit une courbe correspondant à l'équation de Nernst avec un potentiel d'oxydoréduction moyen de -347mV à pH=8,0, une valeur correspondant bien au potentiel d'oxydoréduction de la FMN (Pryde and Hirst 2011).

Chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, l'analyse de la production de ROS, sur complexe I isolé a démontré que la FMN serait responsable de cette production (Keeney, Xie et al. 2006). De même, une étude menée par Knutti *et al.*, (2013), a montré que la substitution d'un acide aminée dans le site de liaison du NuoF (équivalent à NDUFV1), sous-unité contenant la FMN,

augmente l'affinité de la FMN pour l'oxygène et induit une production de ROS accrue (Knuuti, Belevich et al. 2013).

Le deuxième site de production de ROS par le complexe I se situerait au niveau du cycle des quinones. L'importance physiologique de ce site reste controversée. Une étude menée en 2009, par Fato *et al.*, (Fato, Bergamini et al. 2009) a notamment montré que la roténone et la piericidine A induisaient la production de ROS alors que la stigmatelline (inhibiteur du complexe III) n'a aucune conséquence sur cette production. Les auteurs concluent donc que le site de production de ROS se situe entre le site de fixation de ces inhibiteurs et donc au niveau du site de réduction des quinones. Cependant, cette étude a été menée sur mitochondrie isolée, après stimulation de la respiration liée au complexe I. Or, dans ces conditions, l'ajout de roténone inhibe le transfert d'électron du cluster N2 à la quinone, mais entraîne également, rétroactivement, une augmentation majeure de l'état de réduction de la FMN et du ratio NADH/NAD^+ . Il est donc difficile dans ce cas d'incriminer spécifiquement les espèces semiquinones dans la production de ROS. Sur complexe I isolé, la roténone n'induit pas d'augmentation de la production de ROS (Hirst, King et al. 2008), ce qui signifie que le site de production se situe en amont du site de fixation de la roténone.

Initialement perçu comme le principal site de production de ROS, à l'heure actuelle beaucoup d'études s'accordent sur le fait que ce site n'est responsable d'une production accrue de ROS qu'en présence d'un inhibiteur, notamment la roténone (Hirst, King et al. 2008), ou lors d'un flux reverse d'électrons en présence d'un potentiel de membrane élevé (Treberg, Quinlan et al. 2011).

Les ROS apparaissent comme des messagers cellulaires important notamment dans la communication entre le noyau et la mitochondrie. De part, le rôle prépondérant du complexe I dans la production mitochondriale de ROS, ce complexe apparaît comme un régulateur clef de ces voies cellulaires. De nombreuses études ont montré que la production de ROS et le métabolisme énergétique sont dépendants du rapport NADH/NAD^+ . Par la modulation de ce rapport, le complexe I apparaît comme un régulateur du métabolisme énergétique.

IV.4. Complexe I régulateur du métabolisme mitochondrial

IV.4.1. Régulation via la production de ROS

Si les ROS ont tout d'abord été connus pour leur toxicité, celles-ci constituent également des molécules de signalisation. Ainsi, les ROS pourraient réguler divers paramètres physiologiques allant du métabolisme à la croissance cellulaire, la régulation des cycles circadiens, ou encore la génération de la réponse inflammatoire. Les exemples sont variés et comprennent des régulations

métaboliques rétroactives, telle que la régulation de l'AMPK, de la glycogène synthase kinase 3β et glycogène synthase (Nemoto, Takeda et al. 2000), la régulation du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α) dans des situations d'hypoxie (Brunelle, Bell et al. 2005, Guzy, Hoyos et al. 2005). Les ROS semblent également jouer un rôle important dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, notamment via des facteurs tels que AIF, ou encore de l'autophagie par régulation directe de l'activité Atg4 (Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007). La dérégulation de la signalisation par les ROS peut au contraire contribuer à la physiopathologie de nombreuses pathologies humaines. Les ROS peuvent induire des modifications covalentes des résidus cystéines de protéines cibles sensibles à l'oxydoréduction (comme les phosphatases). Ces modifications diminuent ainsi l'activité enzymatique de ces protéines.

Comme nous l'avons vu précédemment, le complexe I est un acteur majeur de la production de ROS et est par ce biais impliqué dans de nombreux processus cellulaires clés aussi bien physiologiques que pathologiques. En conditions physiologiques, par exemple, la production de ROS par le complexe I est impliquée dans la différenciation des cellules immunitaires. Une étude menée par Li *et al.*, 2006 a montré que les cellules CD8⁺ T ne pouvaient plus être activées en présence de roténone (Li, Eppolito et al. 2006). L'activation de ces cellules serait donc dépendante de la production de ROS par le complexe I. Dans cette situation, la roténone empêcherait la communication ROS-dépendante entre le noyau et la mitochondrie.

A l'inverse, de nombreuses situations pathologiques, dans lesquelles un déficit enzymatique du complexe I est observé, se caractérisent par une augmentation de la production de ROS (Di Lisa and Bernardi 2005, Distelmaier, Koopman et al. 2009). Dans ces situations, l'induction de ROS n'apparaît plus comme un mécanisme temporaire de réponse à une situation mais comme une conséquence du déficit du complexe avec des effets délétères (Kirkinezos and Moraes 2001). Une étude récente sur culture de fibroblastes présentant des pathologies mitochondriales et certains avec un déficit du complexe I (Voets, Huigslot et al. 2012) a montré une modification de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la détoxification des ROS. Les mécanismes à l'origine de la surproduction de ROS dans le cadre d'un déficit du complexe I restent très mal définis. L'inhibition partielle de l'activité du complexe I par la roténone sur des cultures de fibroblastes augmente la production de superoxydes et le stress oxydant (Koopman, Verkaart et al. 2005). De même, une étude menée sur des patients porteurs de mutations dans des sous-unités du complexe I a montré que la production de ROS serait inversement proportionnelle à l'activité de ce complexe (Verkaart, Koopman et al. 2007). Cependant, ces résultats sont remis en cause par différentes études (Iuso, Scacco et al. 2006, Distelmaier, Koopman et al. 2009). Dans ces études, malgré une même atteinte enzymatique certains patients présentent un stress oxydant alors que les autres non. De même, dans

la souris NDUFS4 KO aucun marqueur de stress oxydant n'a pu être mis en évidence, malgré un déficit enzymatique d'environ 50% dans le foie et le muscle cardiaque (Kruse, Watt et al. 2008).

IV.4.2. Régulation via le NADH/NAD⁺

Le NAD⁺ est le cofacteur enzymatique indispensable à de nombreuses enzymes du cycle de Krebs et de la β -oxydation des acides gras. Comme évoqué, de nombreuses situations modulant le métabolisme mitochondrial se caractérisent par une diminution du rapport NADH/NAD⁺. Ainsi, lors d'une hausse du taux de NAD⁺, une augmentation du métabolisme énergétique, de la biogenèse mitochondriale et une diminution de la production de ROS peuvent être observées (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006). Le principal lieu de recyclage du NADH formé au sein de la mitochondrie est le complexe I qui ré-oxyde le NADH en NAD⁺, il semble donc raisonnable de supposer que le complexe I pourrait constituer un régulateur majeur du ratio NADH/NAD⁺ mitochondrial.

En accord avec cette hypothèse, une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ a été décrite dans des tumeurs mammaires métastatiques et induirait la croissance de celles-ci (Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013). Cette augmentation serait liée à une diminution de l'activité du complexe I et plus particulièrement du module N. En effet, un KO de la sous-unité NDUFV1, responsable de l'oxydation du NADH induit une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ couplé à une augmentation de la croissance tumorale. Ainsi, des altérations de l'expression des sous-unités du complexe I peuvent moduler le rapport NADH/NAD⁺. Une étude menée dans un modèle murin NDUFS4 KO a également montré une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (Karamanlidis, Lee et al. 2013).

Aussi, par ce rôle prépondérant dans l'oxydation du NADH, le complexe I pourrait réguler la disponibilité en NAD⁺ et donc le métabolisme énergétique et la production de ROS. Le NAD⁺ est aussi le cofacteur des sirtuines qui apparaissent comme des régulateurs métaboliques.

V. Les sirtuines

V.1. Généralités (Structure, Fonction)

Les sirtuines sont des histones déacétylases dont l'activité est NAD⁺ dépendante (Imai, Armstrong et al. 2000). L'activité histone déacetylase fait intervenir un substrat acétylé, du NAD⁺ et de l'eau. Les produits formés par les sirtuines sont le substrat déacétylé, du nicotinamide et un 2-O-acétyl-ADPR. Le mécanisme biochimique de la réaction n'est pas clairement démontré (Sauve,



Figure 15 : Structure détaillée de l'isoforme humaine SIRT5.

En bleu le petit domaine, en violet le domaine de Rossmann-Fold, en vert les boucles liant les deux domaines, en noir le domaine de fixation des cofacteurs et en rouge le site de fixation du Zinc.

(Sanders, Jackson et al. 2010).

Wolberger et al. 2006). Le nicotinamide produit est capable de se lier au site de fixation du NAD^+ empêchant la fixation de celui-ci (Avalos, Bever et al. 2005). La synthèse du composé 2'-AADPR résulterait de transformation d'un amide en ester et nécessiterait donc de l'énergie issue de la dégradation du NAD^+ (Sauve, Wolberger et al. 2006). Certaines isoformes possèdent également une activité ADP ribosyltransferase (Hawse and Wolberger 2009) mais le mécanisme exact et l'existence de ce processus *in-vivo* restent à déterminer. Des fonctions de succinylation et de malonylation ont également été reportées pour certaines isoformes (Peng, Lu et al. 2011).

V.1.1. Structure

Les sirtuines ont fait l'objet de très nombreuses études au cours de cette dernière décennie. Elles sont ainsi décrites aujourd'hui comme des régulateurs majeurs du statut énergétique cellulaire et sont souvent évoquées comme une cible thérapeutique potentielle dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives.

Les sirtuines sont composées d'un domaine catalytique conservé de 275 acides aminés avec des extensions N et C terminales plus variables responsables de la localisation subcellulaire des différentes isoformes ainsi que de leur état d'oligomérisation (Moniot, Weyand et al. 2012). Le domaine catalytique adopte une forme divisée en 2 domaines structuraux différents (Figure 15) :

- le grand domaine ou pli de Rossmann qui est une région très conservée typique des protéines fixant le NAD^+ . Il contient les séquences importantes pour la fixation du phosphate et des résidus chargés capables de fixer le ribose.

- le petit domaine qui est une région très variable au sein des différentes isoformes. Cette grande variabilité de structure pourrait être impliquée dans les spécificités propres à chaque isoforme (spécificité de substrats, de localisation). Le site de fixation du Zinc est conservé chez toutes les isoformes. La localisation de ce site de fixation est trop loin du site actif de l'enzyme mais est nécessaire à son activité. En effet, des mutations dans ce site inhibent l'activité catalytique de la sirtuine. La fixation du Zinc aurait un rôle dans le maintien de la conformation de la protéine particulièrement dans celle du petit domaine (Sanders, Jackson et al. 2010).

La région reliant ces deux domaines est constituée de boucles qui forment un sillon dans lequel se fixe le NAD^+ et la lysine acétylée. Cette région contient les acides aminés les plus conservés au sein des différentes isoformes parmi lesquels les glycines (34, 223) et la phénylalanine 44, tryptophane 58, valine 228, histidine 135, glutamine 115. La liaison du groupement acétyl-lysine induit une réorganisation de l'agencement des deux domaines, ce qui a pour conséquence de combler le sillon et de positionner correctement les résidus cités ci-dessus pour leur interaction avec la lysine acétylée (Moniot, Weyand et al. 2012).

V.2. Les différentes isoformes

Chez l'homme, il existe sept isoformes de sirtuines (SIRT1 à 7). Parmi les histones déacétylases, les sirtuines sont les seules à posséder le NAD^+ comme cofacteur. Malgré de fortes homologies de structure, la localisation, la taille, les substrats et même l'activité enzymatique diffèrent entre ces isoformes.

V.2.1. Les isoformes nucléaires

SIRT1 est l'isoforme humaine la plus proche de sir2, première sirtuine découverte chez la levure. Cette protéine est décrite comme majoritairement nucléaire. Cependant, elle pourrait être localisée dans le cytoplasme au cours de la différenciation cellulaire ou lors de certaines pathologies (Byles, Chmielewski et al. 2010). La localisation cytosolique de SIRT1 serait due à des modifications post traductionnelles de la protéine (phosphorylation). Cette isoforme est très exprimée dans le cerveau, le foie, le pancréas, les muscles, le cœur.

SIRT6 est une isoforme nucléaire peu étudiée. En 2012, une étude implique cette isoforme dans la régulation de la déacétylation de la chromatine (Michishita, McCord et al. 2008). La modulation de l'expression génique induite par cette isoforme est importante pour la régulation de l'espérance de vie (Kanfi, Naiman et al. 2012). SIRT6 pourrait également être localisée dans le réticulum endoplasmique et hydrolyser les acides gras de type acyl lysine (Jiang, Khan et al. 2013).

SIRT7 est également nucléaire. Son activité ainsi que ses cibles moléculaires et donc sa fonction restent assez peu étudiées. Une étude publiée en 2012, a toutefois montré que SIRT7 induisait une déacétylation de la lysine 18 de l'histone 3. Ce phénomène serait important pour la transformation des cellules cancéreuses (Barber, Michishita-Kioi et al. 2012).

V.2.2. L'isoforme cytoplasmique

SIRT2 est décrite comme majoritairement cytoplasmique mais peut se transloquer dans le noyau particulièrement lors de la phase G2/M du cycle cellulaire et ainsi déacétyler l'histone H4 sur la lysine 40 (Vaquero, Scher et al. 2006). Cette isoforme semble aussi avoir un rôle prépondérant dans la régulation du cytosquelette avec la déacétylation de la tubuline. Le gène codant pour SIRT2 se situe sur le chromosome 7. Chez l'homme, il y aurait 5 isoformes de cette protéine possédant des masses moléculaires de 33 à 51KDa.

V.2.3. Les isoformes mitochondriales

Trois isoformes de sirtuines ont une localisation majoritairement mitochondriale : SIRT3, SIRT4 et SIRT5. Comme évoqué précédemment, les événements d'acétylation/déacétylation sont des régulateurs majeurs de l'activité mitochondriale puisque 20% des protéines mitochondriales possèdent un site d'acétylation (Lombard, Tishkoff et al. 2011).

SIRT3 est l'isoforme mitochondriale la plus étudiée. Cependant, la localisation de cette isoforme fut controversée. Ainsi, elle est tantôt décrite comme une protéine nucléaire, qui est transloquée dans la mitochondrie lors d'un stress (Scher, Vaquero et al. 2007, Nakamura, Ogura et al. 2008). En revanche, d'autres études la décrivent comme exclusivement mitochondriale (Onyango, Celic et al. 2002, Michishita, Park et al. 2005). Cette controverse provient notamment du modèle employé puisque contrairement à l'Homme, chez la souris, SIRT3 possède plusieurs transcrits dont un qui est nucléaire (Cooper, Huang et al. 2009, Jin, Galonek et al. 2009). Chez l'homme, SIRT3 est traduite dans le cytoplasme sous forme d'une protéine inactive de 44kDa qui est importée dans la mitochondrie grâce à un signal d'adressage en N-terminal (Schwer, North et al. 2002). Les cent premiers acides aminés sont ensuite clivés, ce qui aboutit à la forme active de 28kDa (Newman, He et al. 2012). SIRT3 est surtout exprimée dans les tissus à forte demande énergétique tels que le foie, les reins et le cœur (Onyango, Celic et al. 2002). Son expression varie en fonction des conditions énergétiques cellulaires (état de jeûne ou nourri, (Alhazzazi, Kamarajan et al. 2011, Jing, Emanuelli et al. 2011)), ce qui confère à cette protéine un rôle important dans l'adaptation du métabolisme cellulaire à la demande énergétique.

SIRT4 est décrite comme une ADP-Ribosyltransférase mitochondriale (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006). Une des cibles majeures de cette protéine est la glutamate déshydrogénase dont l'activité est inhibée par SIRT4 en fonction des apports caloriques (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006). Cette isoforme a également été décrite comme un suppresseur de tumeurs impliqué dans la réparation de l'ADN en inhibant les voies anaplastiques. Ceci a pour effet de bloquer le métabolisme mitochondrial de la glutamine dans le cycle de Krebs et d'induire un arrêt du cycle cellulaire (Jeong, Xiao et al. 2013).

SIRT5 est peu étudiée. Sa principale cible mitochondriale décrite jusqu'à lors était la carbamoyl phosphate synthétase 1, une des enzymes clés du cycle de l'urée (Nakagawa, Lomb et al. 2009). Cependant, elle a été récemment décrite comme possédant une activité lysine succinylase qui régulerait de nombreuses enzymes du métabolisme et notamment le complexe pyruvate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase (Park, Chen et al. 2013, Rardin, He et al. 2013). Une activité de démalonylation a également été évoquée pour cette protéine mais les cibles restent encore peu connues (Du, Zhou et al. 2011).

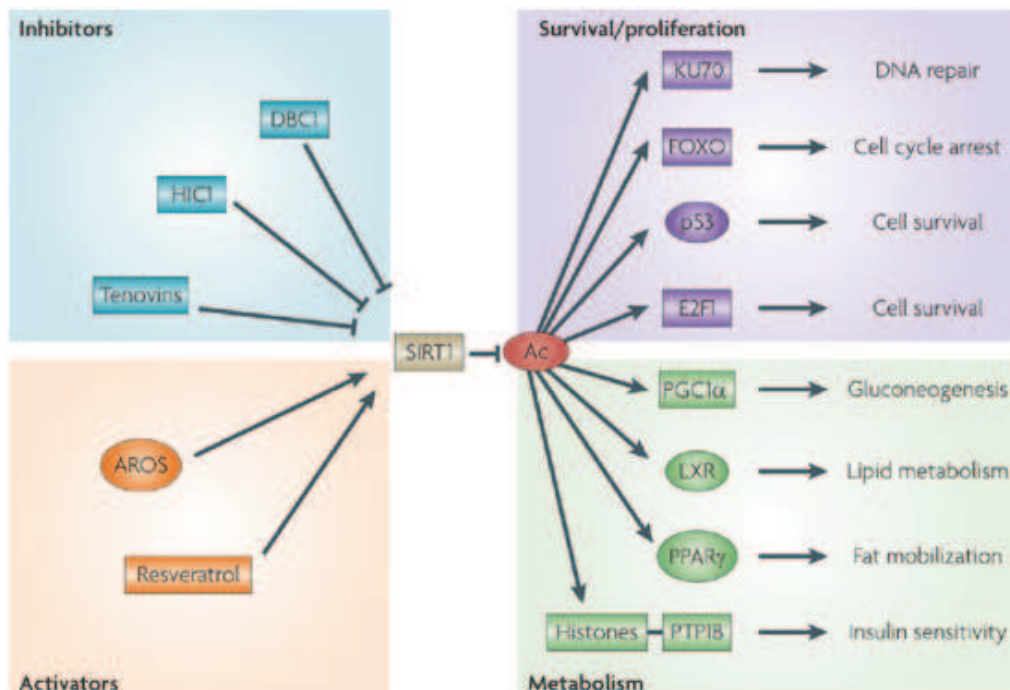


Figure 16 : Cibles moléculaires de SIRT1 et les principales voies métaboliques impactées

Schéma représentant les principales cibles moléculaires de SIRT1, parmi lesquelles de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme énergétique. Ainsi, SIRT1 régule par déacétylation l'activité de PGC-1 α . L'activation de PGC-1 α conduit à une augmentation de la biogénèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif. Parmi les autres cibles SIRT1 impliquées dans la régulation du métabolisme PPAR γ , LXR.

SIRT1 est aussi impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de la survie notamment en régulant p53. SIRT1 inhibe p53 par déacétylation modulant le cycle cellulaire et la voie p21/p53.

Parmi les activateurs de SIRT1 citons le Resveratrol. A l'inverse HIC1 apparait comme un inhibiteur de cette protéine.

(Brooks and Gu 2009).

V.3. Les Cibles des sirtuines

V.3.1. Les cibles de SIRT1

Parmi toutes les isoformes humaines, SIRT1 est l'isoforme la mieux caractérisée. De par la double localisation de cette isoforme, les cibles de celle-ci peuvent être à la fois nucléaires et cytoplasmiques. SIRT1 est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques (métabolisme énergétique, biogenèse mitochondriale, réparation à l'ADN, apoptose) expliquant la multitude de ses cibles protéiques (figure 16).

La principale cible décrite de SIRT1 est p53. La déacétylation de la lysine 382 inhibe l'activité de p53 et est nécessaire à l'activation de p21 pour arrêter le cycle cellulaire et induire l'apoptose.

SIRT1 régule également l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial. Une des cibles privilégiée de SIRT1 est le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α qui peut être activé par déacétylation (Nemoto, Fergusson et al. 2005) et ainsi initier notamment la cascade de biogenèse mitochondriale (Austin and St-Pierre 2012). SIRT1 interagit également avec l'AMPK mais l'ordre d'activation reste encore débattu. Ainsi, certaines études décrivent un rôle régulateur de SIRT1 sur l'AMPK par l'intermédiaire de la kinase LKB1 (Hou, Xu et al. 2008, Price, Gomes et al. 2012). D'autres en revanche placent l'AMPK en amont de la protéine SIRT1, la première régulant la quantité de NAD⁺ nécessaire à l'activation de la seconde (Canto and Auwerx 2009, Canto, Jiang et al. 2010). Quelle que soit la cascade d'activation, cette voie aboutit à l'activation du métabolisme énergétique mitochondrial par stimulation de la voie de biogenèse mitochondriale et stimulation directe de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Canto, Houtkooper et al. 2012).

V.3.2. Les cibles de SIRT3

SIRT3 semble avoir un rôle prépondérant dans la régulation de la fonction mitochondriale. Des études récentes ont montré que 44% des déshydrogénases mitochondriales sont acétylées (Wang, Zhang et al. 2010, Zhao, Xu et al. 2010). Parmi ces déshydrogénases 14 ont le NAD⁺ comme cofacteur. Ces résultats soulignent le lien étroit entre le NAD⁺, SIRT3 et le métabolisme énergétique mitochondrial.

a) SIRT3 apparaît comme un régulateur du métabolisme énergétique

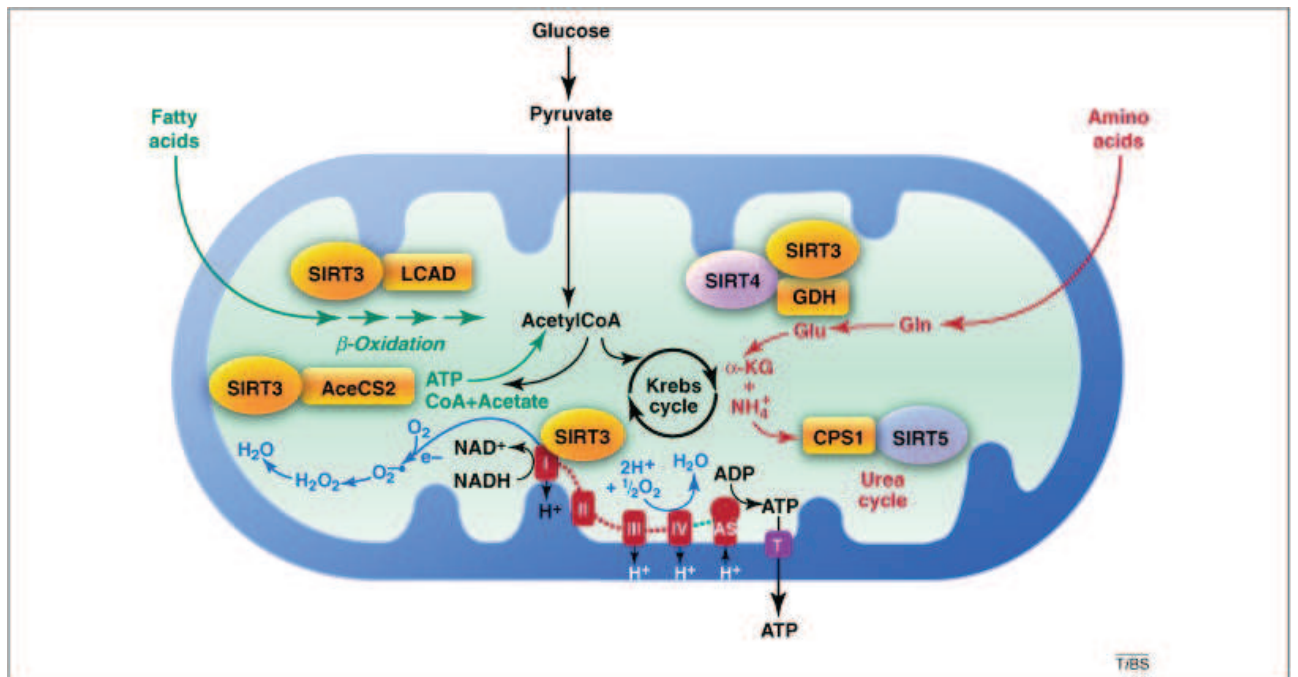


Figure 17 : Les principales cibles métaboliques de la déacétylase SIRT3

SIRT3 est l'isoforme mitochondriale qui possède le plus de cibles au sein de la mitochondrie. Cette isoforme régule l'acétylation d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial comme la LCAD (enzyme de la β -oxydation des acides gras), des enzymes du cycle de Krebs (SDHA, isocitrate déshydrogénase) ou en lien avec celui-ci (Acétyl-CoA synthétase 2, PDE-1a), des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (NDUFA9 (complexe I), SDHA (complexe II), la sous-unité α du complexe V).

La protéine SIRT3 régule l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial (Figure 17). Elle régule tout d'abord l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie en activant PDH E1 α (Jing, O'Neill et al. 2013). Elle active également les voies d'apports en substrats : la β -oxydation des acides gras en déacétylant la LCAD (Hirschey, Shimazu et al. 2010) et le cycle de Krebs en interagissant avec l'acetyl-CoA synthétase 2 (Schwer, Bunkenborg et al. 2006, Verdin, Hirschey et al. 2010) et l'isocitrate déhydrogénase (Schlicker, Gertz et al. 2008). Cette enzyme est responsable de la formation d'acétyl-CoA composé indispensable au bon fonctionnement du cycle de Krebs. SIRT3 active également directement les complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, le complexe I possède un site d'acétylation au sein de la sous-unité NDUFA9 (Ahn, Kim et al. 2008). De même, la sous-unité SDHA du complexe II, et la sous-unité alpha de la part F_o de l'ATP synthase (Finley, Haas et al. 2011, Anderson and Hirschey 2012) sont déacétylés par SIRT3.

b) SIRT3 est un régulateur de la production de ROS

SIRT3 semble impliquée dans la régulation du stress oxydant en interagissant avec deux enzymes majeurs de la détoxification des ROS (la MnSOD et l'isocitrate déshydrogénase NADP dépendante). La MnSOD est déacétylée par SIRT3 au niveau de la lysine 122 en réponse à un stress (Tao, Coleman et al. 2010). Plusieurs autres résidus lysines de cette enzyme pourraient également être déacétylés par SIRT3 induisant ainsi une augmentation de son activité (Qiu, Brown et al. 2010). L'ICDH est impliquée dans le recyclage du NADP/NADPH utilisé lors de la détoxification du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase. L'activité de cette enzyme est induite par la déacétylation par SIRT3 (Yu, Dittenhafer-Reed et al. 2012).

Ainsi en condition de stress oxydant SIRT3 pourrait induire à la fois la détoxification des anions superoxydes par la MnSOD ainsi que l'activité de l'isocitrate déshydrogénase afin de générer un « pool » de NADPH suffisant à la détoxification du peroxyde d'hydrogène.

V.4. Régulations des sirtuines

L'expression de SIRT1 est régulée en fonction des conditions métaboliques de la cellule ou de l'organisme. Elle est, par exemple, augmentée lors d'un jeûne ou d'une situation de forte demande énergétique (Lagouge, Argmann et al. 2006, Rutanen, Yaluri et al. 2010). L'expression de SIRT1 serait régulée par le facteur Foxo3 (Nemoto, Fergusson et al. 2004) qui posséderait un site de fixation dans le promoteur du gène SIRT1 (Xiong, Salazar et al. 2011). En retour, une boucle d'amplification est mise en place puisque foxo3 peut également être déacétylé et activé par SIRT1 (Canto and Auwerx 2012).

A l'inverse, l'expression de SIRT1 peut être réprimée par le répresseur transcriptionnel HIC1 (hypermethylated in cancer 1). Cette protéine interagit avec CtBP un senseur du métabolisme énergétique et du stress oxydant (Zhang, Wang et al. 2007). L'interaction CtBP/HIC1 est notamment favorisée par le NADH.

L'expression de SIRT1 est aussi régulée par les microARNs. Ces séquences sont capables de se lier à l'ARN de leur cible et d'inhiber la traduction protéique. SIRT1 interagit notamment avec le miR-34a (Yamakuchi and Lowenstein 2009) et le miR-138 (Liu, Wang et al. 2013).

La régulation de l'expression de SIRT3 est très peu étudiée. Cependant, il a été montré que le promoteur de SIRT3 possédait une séquence « estrogen relative receptor » (ERR). PGC-1 α , en interagissant avec ERRalpha induit l'expression de SIRT3 (Kong, Wang et al. 2010). Comme évoqué précédemment, SIRT1 étant un régulateur de PGC-1 α , il semble donc exister un lien étroit entre l'activité de SIRT1 et l'expression de SIRT3.

La régulation de l'activité transcriptionnelle de SIRT3 n'apparaît pas comme un élément majeur de régulation de SIRT3. En effet, dans les diverses situations physiologiques ou pathologiques telles que la restriction calorique et le jeûne (dans ce cas, SIRT3 est activée (Qiu, Brown et al. 2010, Hebert, Dittenhafer-Reed et al. 2013)) ou les régimes enrichis en lipides (dans ce cas, l'activité de SIRT3 est diminuée (Kendrick, Choudhury et al. 2011) l'expression de SIRT3 ne soit pas modifiée.

L'activité des sirtuines peut aussi être régulée par des modifications post traductionnelles parmi lesquelles la phosphorylation et la sumoylation. SIRT1 possède de nombreux sites de phosphorylation (Sasaki, Maier et al. 2008). La phosphorylation induit une activation de cette enzyme. Les principales kinases impliquées dans ces phosphorylations sont cycline B/cdk1 (Sasaki, Maier et al. 2008), Jun Kinase 1 (JNK1) (Nasrin, Kaushik et al. 2009) et caséine kinase II (Zschoernig and Mahlknecht 2009).

SIRT1 peut également être sumoylée et activée notamment lors d'un stress induit par les UV ou l'H₂O₂ (Yang, Fu et al. 2007).

Peu d'études décrivent des modifications post traductionnelles sur SIRT3. Cependant 6 sites de phosphorylation ont été identifiés sur la protéine SIRT3 sur des sérines entre les positions 101 et 118 (Chen, Chiang et al. 2013). A l'heure actuelle, les acteurs responsables de la phosphorylation/déphosphorylation, tout comme les conséquences de ces phosphorylations sur l'activité de SIRT3 n'ont pas été étudiés.

V.5. Les sirtuines senseurs du métabolisme

SIRT1 et SIRT3 possèdent une activité déacétylase dépendante du NAD^+ . La constante d'affinité entre le NAD^+ et les sirtuines est suffisamment faible pour que celles-ci soient régulées par la concentration de ce dernier (de 100 à $550\mu\text{M}$) (Sauve 2010). Dans de nombreuses situations (vieillesse, restriction calorique, exercice) caractérisées par une modification de la concentration en NAD^+ , une modulation de l'activité des sirtuines a été observée (Massudi, Grant et al. 2012, Gomes, Price et al. 2013).

La diminution du ratio NADH/NAD^+ observée lors d'une restriction calorique (Lin, Ford et al. 2004) est à l'origine de l'augmentation du métabolisme énergétique, de la biogenèse mitochondriale (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006) ainsi que d'une diminution de la production de ROS. Ces modulations pourraient impliquer la protéine SIRT3 (Qiu, Brown et al. 2010). A cause de son rôle central dans le métabolisme énergétique, SIRT3 a été évoquée comme une potentielle cible thérapeutique dans le vieillissement ainsi que dans les maladies neurodégénératives.

VI. Modulation pharmacologique de l'activité des sirtuines : une cible thérapeutique ?

L'activation pharmacologique des sirtuines a été très étudiée ces dernières années et le Resveratrol a émergé comme un régulateur majeur de l'activité de cette famille de protéines (Borra, Smith et al. 2005, Morita, Wada-Hiraike et al. 2012, Price, Gomes et al. 2012, Lakshminarasimhan, Curth et al. 2013). Le mode d'action de ce composé (direct ou non) est très débattu (Kaeberlein, McDonagh et al. 2005, Pacholec, Bleasdale et al. 2010) et quels que soient les effecteurs décrits, le rapport NAD^+/NADH semble jouer un rôle prépondérant (Morita, Wada-Hiraike et al. 2012, Desquiret-Dumas, Gueguen et al. 2013).

VI.1. Le Resveratrol

VI.1.1. Structure

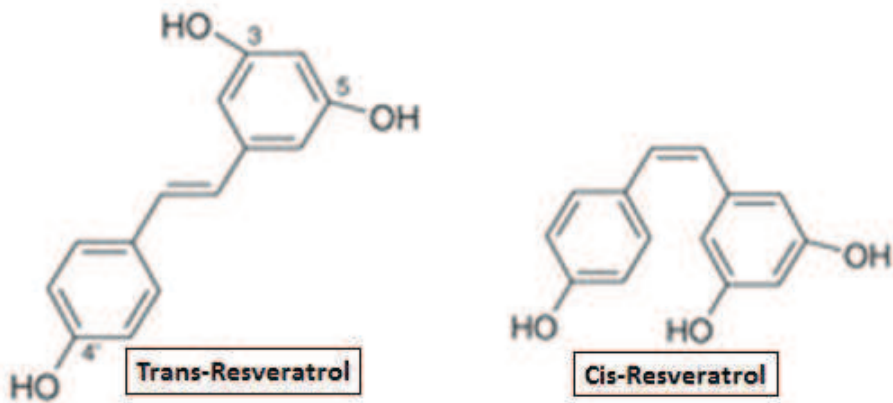


Figure 18 : Structure du Resveratrol, *trans* et *cis*.

Structure du Resveratrol, 3,5,4'-trihydroxystilbène qui possède deux isomères : l'isomère *trans* et *cis*.

L'isomère *trans* est le plus stable, le plus utilisé et celui ayant le plus de propriétés biologiques.

L'isomérisation en forme *cis* se fait notamment sous l'effet des UV.

Adapté de (Cottart, Nivet-Antoine et al. 2010).

Le resvératrol (RSV) fait partie de la famille des polyphénols. Il existe plus de 8000 composés polyphénoliques identifiés chez les plantes. Les polyphénols peuvent être divisés en plusieurs classes parmi lesquelles : les acides polyphénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignans. Les stilbènes, classe dont fait partie le RSV, se caractérisent par deux groupements phényles connectés par deux ponts carbonés méthylènes. Parmi les stilbènes deux classes peuvent être distinguées les hydroxystilbènes et les alkoxy stilbènes. Les alkoxy stilbènes se caractérisent par la présence de groupements méthyles ou éthyles sur les groupements phénoliques des polyphénols. A l'inverse, les hydroxystilbènes se caractérisent par la présence de groupements hydroxyles comme dans le cas du RSV ou 3,5,4'-trihydroxystilbène. La molécule contient un groupement récinol et un groupement phénol. Il existe deux isomères structuraux : *cis*-(Z) et *trans*-(E) (Figure 18). Du fait de la double liaison conjuguée liant ses deux groupes phénol et récinol, la forme *trans* est une structure plane. La forme *trans* peut subir une isomérisation en forme *cis* lorsque celui-ci est chauffé ou exposé à des rayons ultraviolets.

Chacun des 3 groupes hydroxyles (-OH) de la molécule est électro-active. D'après Sinclair *et al.*, (2006) (Baur and Sinclair 2006), le RSV ne serait pas une molécule facile à protéger contre l'oxydation, et se dégraderait facilement par l'exposition à la lumière, à la chaleur et à l'oxygène. S'il a été montré que le *trans*-resvératrol subit une oxydation négligeable en atmosphère normale à température ambiante, celui-ci peut être oxydé au niveau des groupements phénoxy ou hydroxyl par de nombreuses réactions enzymatiques : ainsi, le RSV est oxydé (déprotoné) par les polyphénols oxydases, les laccases, les lipooxygénases, les NQO1/2 oxidoréductases et les peroxydases (Espin, Soler-Rivas *et al.* 2000, Pinto Mdel, Garcia-Barrado *et al.* 2003). En particulier, le RSV peut être hydroxylé sur son groupement phényle par la glutathion peroxydase ou la horse radish peroxydase (Hirano, Kondo *et al.* 2002, Corduneanu, Janeiro *et al.* 2006). L'oxydation du RSV peut aboutir à sa glucuronidation, sulfatation ou hydrogénation, mais la forme dominante est son hydroxylation (de Santi, Pietrabissa *et al.* 2000, De Santi, Pietrabissa *et al.* 2000). L'oxydation du RSV sur ses différents groupements hydroxyles est également très sensible au pH en solution aqueuse, avec des constantes de dissociation (pKa) de 8.1, 9.8 and et 11.4 pour les groupes en positions 4', 3 et 5, respectivement (Lopez-Nicolas, Perez-Gilabert *et al.* 2009).

L'état de protonation de la molécule affecte fortement son activité biologique (Lopez-Nicolas, Perez-Gilabert *et al.* 2009). Les formes déprotonées forment un radical resveratrol, en particulier le radical phénoxy (Figure 19).

Les formes radicalaires agissent généralement comme des pro-oxydants (Galati, Sabzevari *et al.* 2002), tandis que les formes réduites (protonées) sont plus connues pour leurs propriétés

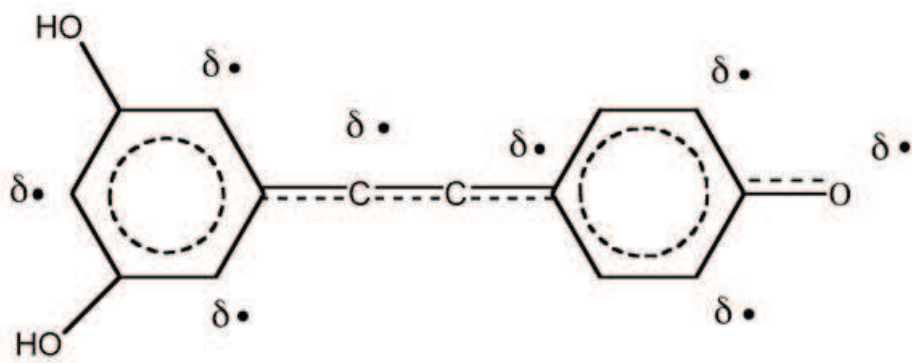


Figure 19 : Le Resveratrol sous forme radicalaire.

Le radical phénoxy est généré au cours de l'oxydation du RSV ou lors de la détoxification.

D'après (Kovacic and Somanathan 2010).

antioxydantes. Les effets bénéfiques du RSV, seraient en partie attribués à cette action antioxydante. Ces propriétés antioxydantes sont liées au groupement phénol de la molécule (Kaindl, Eyberg et al. 2008). La comparaison des effets antiradicalaires du RSV et ses analogues *trans*-4-hydroxystilbènes et *trans*-3,5-dihydroxystilbenes a révélé une plus grande activité antiradicalaire du groupe para-hydroxyl (Stojanovic, Sprinz et al. 2001).

VI.1.2. Absorption et métabolisme

Une voie métabolique commune pour les phénols comporte l'oxydation en catéchols ou hydroquinones. Le résultat qui s'ensuit est souvent un recyclage redox impliquant l'oxygène et entraînant la production de ROS. Il est difficile de trouver dans la littérature des données comparables concernant le RSV. Une explication pourrait être que celui-ci est rapidement métabolisé. Ce métabolisme rapide conduit à une excrétion dans les urines d'environ 75 % de la prise orale (Wenzel and Somoza 2005). La métabolisation rapide s'effectue par sulfatation ou glucuronidation du RSV. Ainsi, selon Delmas *et al.*, 2011, le RSV monosulfaté, deux isomères de RSV monoglucuroconjugué, le dihydroresveratrol monosulfaté et le dihydroresveratrol monoglucuroconjugué sont les principales formes métabolisées du RSV retrouvées dans les urines (Delmas, Aires et al. 2011). L'absence d'effets toxiques apparents du RSV résulterait de cette conjugaison préférentielle, plutôt que l'oxydation en quinones. La quantité de chaque isoforme varie en fonction des caractéristiques individuelles de chaque individu (âge, sexe...). Une métabolisation plus lente est aussi observée notamment dans les cellules hépatiques, aboutissant à la formation de formes monosulfatées (3-sulfate-resveratrol et 4'-sulfate-resveratrol) ou disulfatées (3,4'-disulfate-resveratrol et 3,5-disulfate-resveratrol). Du fait de son excrétion et de sa métabolisation rapide, sa biodisponibilité semble très faible, des études sont actuellement en cours pour tenter d'augmenter cette biodisponibilité (Munin and Edwards-Levy 2011).

VI.1.3. Le Resveratrol : un modulateur majeur du métabolisme mitochondrial

En 2006, Lagouge *et al.*, ont montré que le RSV pouvait améliorer la production énergétique mitochondriale dans un modèle de souris nourries par un régime hyperlipidique. La voie de signalisation décrite par ces auteurs impliquait l'activation de SIRT1 par le RSV puis la cascade de biogenèse mitochondriale PGC-1 α , NRF1, TFAM (Lagouge, Argmann et al. 2006). Cette même voie d'activation induite par le RSV a été retrouvée dans de nombreux modèles par la suite (dans les cellules endothéliales, dans le muscle, le cœur (Csiszar, Labinsky et al. 2009, Biala, Tauriainen et al. 2010, Menzies, Singh et al. 2013)). Cependant, depuis les trois dernières années, les voies de

signalisation intracellulaire ainsi que les cibles moléculaires du RSV sont soumises à controverse. En effet, un nombre croissant d'études remettent en cause le lien direct RSV/SIRT1 ainsi que son rôle activateur sur PGC-1 α (Hu, Liu et al. 2011, Higashida, Kim et al. 2013). Pour expliquer ces discordances, il semble donc que selon la dose, le modèle utilisé ainsi que le temps de traitement, les résultats obtenus soient très variables. Il en est de même pour les propriétés antioxydantes du RSV. En effet, les groupements hydroxyls phénoliques de cette molécule lui confèrent la capacité de réagir avec les radicaux peroxydes pour les détoxifier (Pervaiz 2003). En plus de ces propriétés physicochimiques, le RSV peut stimuler les défenses antioxydantes en activant les enzymes de détoxification : les superoxydes dismutases, la catalase ou les glutathions peroxydases (Mokni, Elkahoui et al. 2007, Kumar, Tripathi et al. 2013). Plusieurs études montrent un rôle de la protéine SIRT1 dans ces effets (Ungvari, Labinskyy et al. 2009, Gu, Wang et al. 2014, Li, Feng et al. 2014). Cependant, une littérature récente a identifié d'autres cibles moléculaires impliquées dans les effets antioxydants de cette molécule. Ainsi, la voie PTEN/Akt (Ingles, Gambini et al. 2014) et la voie de signalisation oestrogénique (ER/MAPK/NFKB, (Robb and Stuart 2010)) ont été évoquées comme des cibles directes du RSV.

D'autres études évoquent également un rôle pro-oxydant du RSV qui en retour induirait une augmentation des défenses antioxydantes jouant ainsi un rôle dans les phénomènes de « Mitohormesis » (de la Lastra and Villegas 2007, Martins, Coelho et al. 2014). En effet, outre le RSV, de nombreux polyphénols et flavonoïdes ont un rôle pro-oxydant modéré stimulant ainsi les systèmes antioxydants. Cette réponse mise en place permettrait une induction plus rapide des défenses antioxydantes lors d'un stress oxydant permettant ainsi de diminuer ces effets délétères. Ces effets ont été regroupés sous le terme de « Mitohormesis » (Ristow and Schmeisser 2014).

Le RSV, de par sa structure est également capable d'interagir directement avec de nombreuses protéines dont certaines sont directement impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial. Par exemple, des études ont montré que le RSV inhibe l'activité des complexes I (Moreira, Silva et al. 2013) et III (Zini, Morin et al. 1999) de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase (Zheng and Ramirez 2000). Cependant, ces effets inhibiteurs du RSV sur la fonction mitochondriale semblent doses et tissus-dépendants et des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier les sites d'interactions entre le RSV et ces protéines.

VI.2. Modulation du rapport NADH/NAD⁺

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le ratio NADH/NAD⁺ intramitochondrial est augmenté dans différentes situations en lien avec une réduction du métabolisme mitochondrial, soit physiologique (vieillesse) soit pathologiques (régime enrichi en graisse, diabète de type 2).

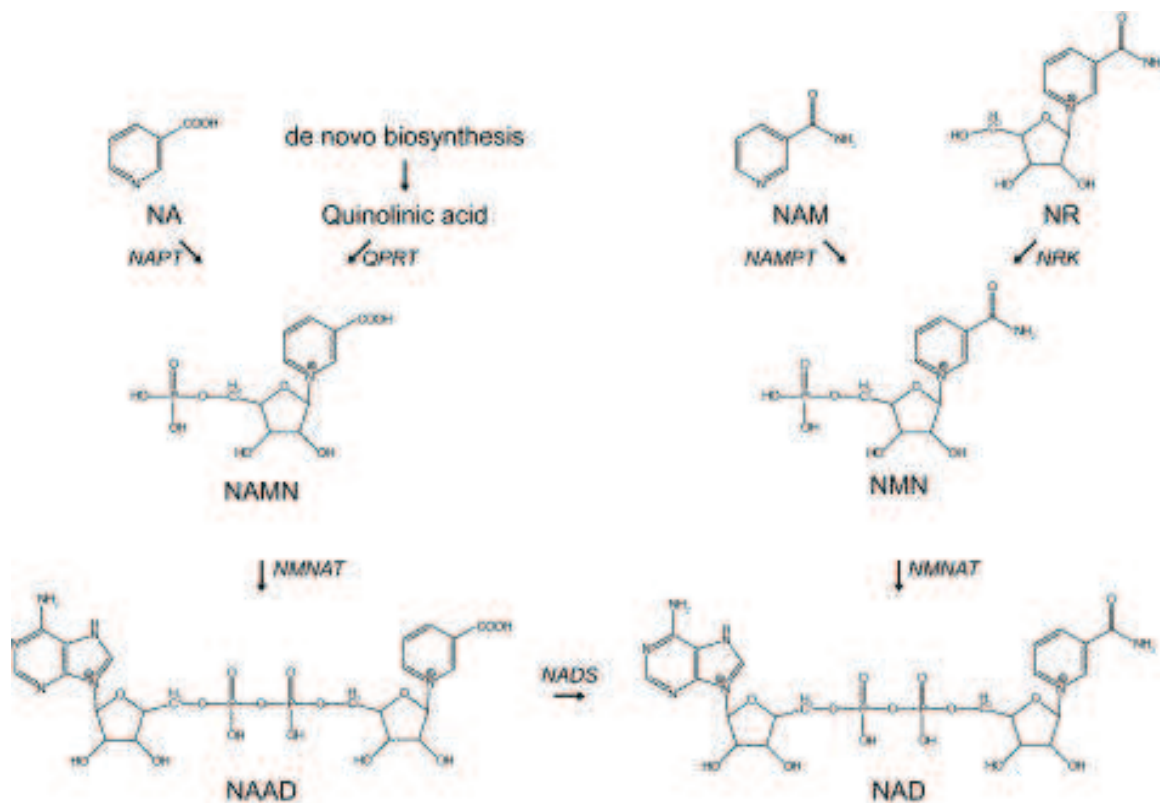


Figure 20 : Les voies de synthèse et de recyclage du NAD⁺.

Deux voies de synthèse du NAD⁺ sont à l'heure actuelle connues. La voie de synthèse de novo qui s'initie à partir de l'acide quinolinique, celui-ci est converti en acide nicotinique mononucléotide (NAMN). La mononucléotide adénylyltransferase spécifique de l'acide nicotinique (NMNAT) transforme ce dernier en acide nicotinique dinucléotide (NAAD). L'acide nicotinique dinucléotide est transformé par la NAD synthase en NAD⁺.

La voie de recyclage du NAD⁺ s'initie à partir du nicotinamide (NAM) ou nicotinamide riboside (NR). Ces composés vont tous deux être transformés en nicotinamide mononucléotide (NMN) par la phosphoryltransferase spécifique du nicotinamide (NAMPT) ou une kinase spécifique du NR (NRK). L'adénylyltransferase spécifique du nicotinamide mononucléotide génère à partir du NMN le NAD⁺.

D'après (Houtkooper, Canto et al. 2010).

D'autre part, le NAD^+ est un cofacteur essentiel à l'activité des sirtuines, lesquelles régulent le métabolisme énergétique. Afin de diminuer ce rapport NADH/NAD^+ , plusieurs stratégies sont à envisager ; il s'agirait soit d'augmenter la synthèse de NAD^+ , soit de diminuer sa consommation en inhibant par exemple les enzymes fortement consommatrices (PARP).

VI.2.1. Métabolisme du NAD^+

La découverte des sirtuines a souligné l'importance du NAD^+ dans de nombreux processus. De ce fait, les voies de synthèse de cette molécule ont suscité un intérêt grandissant. Ainsi, deux voies permettent la formation de NAD^+ ont été identifiées : la voie de synthèse de novo et la voie de recyclage ou sauvetage (Figure 20).

La voie de synthèse de novo s'initie par la transformation du tryptophane en acide quinolinique. Ce composé est ensuite converti en acide nicotinique mononucléotide (NAMN) grâce à la phosphoryltransférase spécifique de l'acide quinolinique (« quinolinic acid phosphoryltransferase », QRPT). L'acide nicotinique mononucléotide est transformé en acide nicotinique dinucléotide (NAAD) par la mononucléotide adénylyltransférase spécifique de l'acide nicotinique (NMNAT). La NAD synthase (NADS) transforme ce dernier en NAD^+ (Houtkooper, Canto et al. 2010).

Bien que le NAD^+ puisse être synthétisé de novo, sa source principale reste la voie de recyclage. Celle-ci est-elle même divisée en deux voies en fonction du composé initial à recycler. Ce composé peut être soit le nicotinamide (NAM), soit le nicotinamide riboside (NR), soit l'acide nicotinique (NA). La phosphorybosyltransférase spécifique de l'acide nicotinique (NAPRT) va transformer ce dernier en acide nicotinique mononucléotide. Ce composé est commun à la voie de synthèse *de novo* du NAD^+ , la même voie moléculaire va donc être ensuite utilisée pour le générer. Le NR est phosphorylé par une NR kinase pour former du nicotinamide mononucléotide NMN. Le nicotinamide (NAM) va quant à lui être transformé par la phosphoryltransférase spécifique du nicotinamide (NAMPT) NMN. Chez les mammifères, le NAM serait le principal précurseur de la voie de recyclage (Jacobson, Cervantes-Laurean et al. 1995). Le NMN est transformé en NAD^+ par l'adénylyltransférase spécifique du nicotinamide mononucléotide (NMNAT) (Mattevi 2006). Trois isoformes de cette dernière sont à l'heure actuelle connues chez l'homme, NMNAT-1 spécifique du noyaux, NMNAT-2 spécifique de l'appareil de golgi et NMNAT-3 spécifique de la mitochondrie (Berger, Lau et al. 2005).

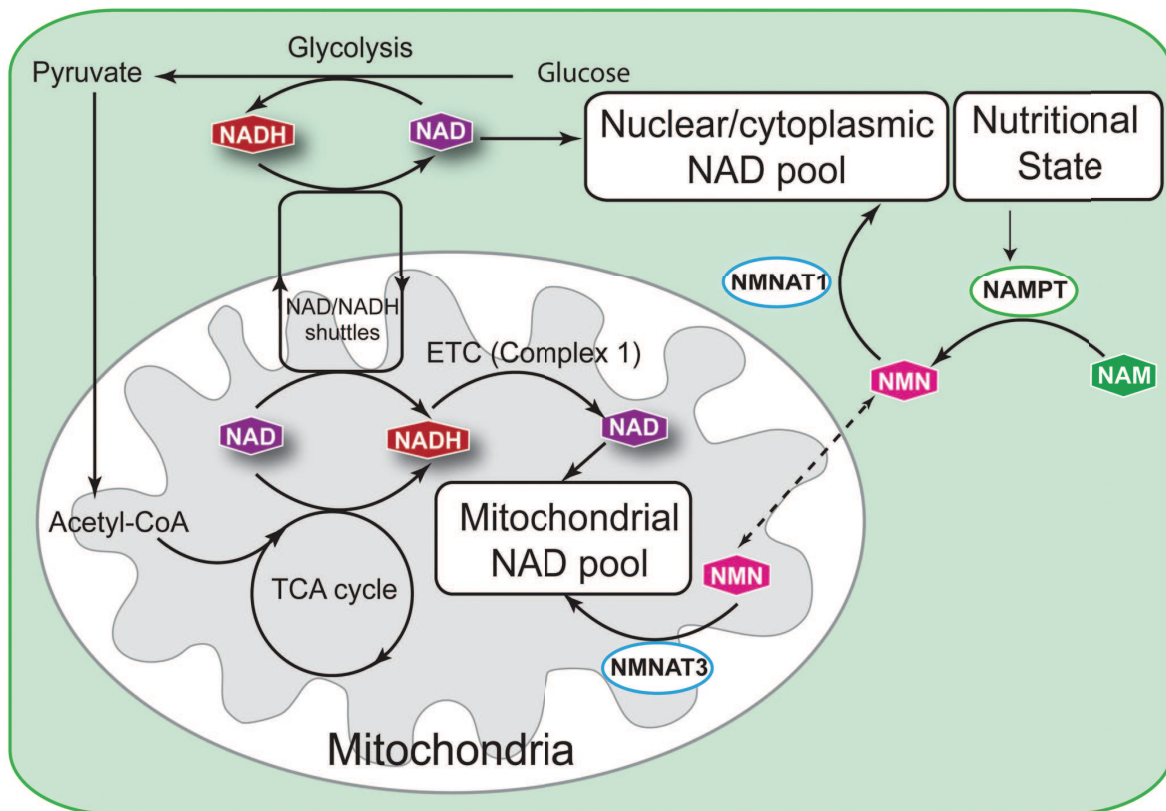


Figure 21: La maintenance du pool de NAD⁺ mitochondrial.

Au sein de la mitochondrie, le NAD⁺ est en partie généré à partir du NMN grâce à l'isoforme 3 de la phosphoryltransférase spécifique du nicotinamide. Bien que la majorité du NAD⁺ cellulaire se trouve au sein de la mitochondrie, le rapport NADH/NAD⁺ de ce compartiment est connecté au reste de la cellule notamment via les navettes (malate/aspartate, G3P) et la glycolyse. Le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial et celui nucléaire ainsi que la voie de synthèse du NAD⁺ semblent aussi étroitement liés et régulés par différents stimuli tels que la restriction calorique ou l'exercice.

D'après (Stein and Imai 2012).

La régulation des taux de NAD^+ en réponse à l'apport ou la demande énergétique est encore mal comprise, mais semble liée à des modifications d'expression et/ou d'activité de la NAMPT (Stein and Imai 2012), l'enzyme limitante dans la voie de biosynthèse et de sauvetage du NAD^+ (Revollo, Korner et al. 2007). Ainsi, l'expression de cette enzyme est réduite lors d'une sénescence prématurée, associée à une augmentation du ratio NADH/NAD^+ et sa surexpression diminue le ratio NADH/NAD^+ et retarde la sénescence cellulaire (van der Veer, Ho et al. 2007). Il a également pu être mis en évidence une expression et une régulation circadienne (Nakahata, Sahar et al. 2009, Ramsey, Yoshino et al. 2009). Cependant, de plus amples recherches restent nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation les « pools » de NAD^+ et NADH .

Le « pool » de NAD^+ mitochondrial est relativement distinct de celui cellulaire. Celui-ci est également relativement robuste. Ainsi, malgré une déplétion massive du NAD^+ cytosolique, le taux de NAD^+ mitochondrial peut être préservé pendant 24h (Pittelli, Formentini et al. 2010). Bien que séparés, les « pools » de NAD^+ cytosolique et mitochondrial sont étroitement liés par deux processus : la glycolyse et la voie de synthèse mitochondriale du NAD^+ (Figure 21).

Comme nous l'avons vu précédemment (1.3.1), la glycolyse et le métabolisme mitochondrial du NAD^+ sont connectés à la fois par l'entrée du pyruvate au sein de la mitochondrie et le transfert du NADH du cytoplasme vers la mitochondrie via les navettes NADH/NAD^+ malate/aspartate et glycérol phosphate.

En revanche, malgré la présence de NMNAT-3 au sein des mitochondries, la voie de synthèse du NAD^+ dans ce compartiment n'est pas clairement établie. L'absence de NAMPT et NAPT suggère que le NAD^+ est synthétisé à partir du NMN, la NMNAT-3 le transformant en NAD^+ (Figure 21). Cependant, aucun transporteur spécifique du NMN n'a à l'heure actuelle été identifié.

VI.2.2. La diminution du rapport NADH/NAD^+

La modulation de la concentration en NAD^+ apparaît dans un nombre croissant de publications comme une cible thérapeutique prometteuse dans différentes situations pathologiques telles que le syndrome métabolique (Yoshino, Mills et al. 2011, Canto, Houtkooper et al. 2012), le vieillissement (Braidy, Guillemin et al. 2011) ou les pathologies neurodégénératives (Gong, Pan et al. 2013). Dans le but d'augmenter la concentration cellulaire et mitochondriale en NAD^+ , trois stratégies sont envisagées : stimuler les activités des enzymes des voies de synthèse NAD^+ , fournir

des précurseurs du NAD^+ ou au contraire inhiber les voies qui sont fortement consommatrices en NAD^+ .

a) Stimuler l'activité des enzymes de la voie de synthèse du NAD^+

A l'heure actuelle, peu d'activateurs pharmacologiques des enzymes impliquées dans la synthèse du NAD^+ sont connus. Deux études ont cependant décrit que l'activation de l'enzyme NQO1 par le β -lapachone permet d'augmenter le rapport NAD^+/NADH cellulaire (Lee, Park et al. 2012, Kim, Oh et al. 2014). De même, une étude démontre que le RSV permettrait d'induire une augmentation de l'activité de la NAMPT dans les hépatocytes (100 μM , 24h) (Schuster, Penke et al. 2014).

b) Augmenter la concentration des précurseurs du NAD^+ .

Comme décrit précédemment, il existe deux voies principales de synthèse du NAD^+ . L'une d'elles fait intervenir l'acide nicotinique (NA) comme précurseur et l'autre se base sur le nicotinamide riboside (NR) et le nicotinamide mononucléotide (NMN). Apporter ces précurseurs peut apparaître comme une stratégie thérapeutique intéressante pour augmenter le taux cellulaire en NAD^+ . L'acide nicotinique est utilisé depuis de nombreuses années en traitement des dyslipidémies (Altschul, Hoffer et al. 1955) et plus récemment pour le diabète de type 2 (Karpe and Frayn 2004). Cependant, ce traitement entraîne des effets secondaires cutanés chez certains patients et sa capacité à induire une augmentation cellulaire de NAD^+ semble différente selon les organes considérés (Hara, Yamada et al. 2007, Gille, Bodor et al. 2008). Jusqu'à lors, sa biodisponibilité au niveau mitochondrial reste discutée même si sa capacité à améliorer le fonctionnement de la chaîne respiratoire est évoquée (Zhang, Tsukikawa et al. 2013). Depuis quelques années, l'utilisation du nicotinamide riboside suscite un intérêt thérapeutique grandissant notamment pour les pathologies impliquant une dysfonction mitochondriale. Il a en effet été démontré par Canto *et al.*, que la supplémentation en NR améliore le métabolisme oxydatif chez des souris soumises à un régime riche en lipide (Canto, Houtkooper et al. 2012). De même, une étude a récemment reporté l'efficacité du NR dans le traitement d'une myopathie mitochondriale chez la souris. En effet dans ce modèle le NR permet d'induire une augmentation de la biogenèse mitochondriale et de stimuler le système d'élimination des protéines mitochondriales défectueuses (Khan, Auranen et al. 2014).

Le NMN est quant à lui capable d'améliorer le métabolisme énergétique dans des souris diabétiques (Yoshino, Mills et al. 2011). La mitochondrie contenant une isoforme spécifique de l'enzyme permettant de convertir le NMN en NAD^+ (NMNAT3), la supplémentation en NMN pourrait être un bon moyen thérapeutique pour restaurer le rapport NADH/NAD^+ mitochondrial (Pittelli, Formentini et al. 2010).

c) **Inhiber les enzymes fortement consommatrices en NAD⁺.**

Une des causes majeures de mort cellulaire au cours d'un stress génotoxique est la déplétion en NAD⁺ induite par l'hyperactivation de la NAD⁺-dépendant enzyme poly(ADP-ribose)polymérase-1 (PARP-1). PARP-1 ajoute un groupement ADP ribose à une protéine en consommant du NAD⁺. Au niveau mitochondrial l'inhibition de PARP1 induit une augmentation de la biodisponibilité du NAD⁺ et active ainsi le métabolisme mitochondrial (Bai, Canto et al. 2011, Modis, Gero et al. 2012). De même, deux miRNA ont été décrits comme des régulateurs de l'activité de PARP2 (miR-149 and miR-712-3p). La surexpression de ces miRNA entraîne une augmentation de la concentration en NAD⁺ et une activation de SIRT1 qui régule PARP2 ainsi que la voie de biogenèse mitochondriale (Svensson and Handschin 2014). Cette stratégie a été utilisée pour traiter le diabète dans un modèle de souris (Yonemura, Takashima et al. 1984) et les dyslipidémies (Ba and Garg 2011).

Problématique de la thèse

Le NAD⁺ cellulaire semble être concentré dans la mitochondrie (jusqu'à 70% du NAD⁺ cellulaire se trouve dans cet organite (Stein and Imai 2012) et de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique mitochondrial consomment du NADH. Ces constats suggèrent que le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial joue un rôle prépondérant dans les fonctions énergétiques de cet organite. En effet, le NAD⁺ est le cofacteur de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique (cycle de Krebs, β -oxydation des acides gras). De même, parmi les principaux producteurs de ROS mitochondriaux, les activités du complexe I de la chaîne respiratoire et de l' α -cétoglutarate déshydrogénase sont régulées par le rapport NADH/NAD⁺ (Tretter and Adam-Vizi 2004, Kussmaul and Hirst 2006). Ce rapport varie lors de différentes situations de stress métabolique et cellulaire comme la restriction calorique (Lin, Ford et al. 2004) au cours de laquelle la réduction du taux de NADH s'accompagne d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006) et d'une réduction du stress oxydant (Qiu, Brown et al. 2010). A l'inverse, le processus de vieillissement se caractérise par une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (Braidy, Guillemin et al. 2011), une diminution de l'activité des complexes I et IV, de la synthèse d'ATP (Tatarkova, Kuka et al. 2011), de la biogenèse mitochondriale (Reznick, Zong et al. 2007) et des défenses antioxydantes.

Ainsi, le rapport NADH/NAD⁺ est un régulateur clef de la fonction énergétique mitochondriale. Les sirtuines, des enzymes déacétylases NAD⁺ dépendantes, sont des cibles moléculaires pouvant être induites par une variation du rapport NADH/NAD⁺. L'acétylation apparaît comme un régulateur majeur de fonction mitochondriale. SIRT3, la principale isoforme mitochondriale des sirtuines peut notamment déacétyler des enzymes clefs du métabolisme énergétique et du système antioxydant mitochondrial. Or peu de travaux ont jusqu'à présent étudié l'impact de la modulation du rapport NADH/NAD⁺ sur l'activité de cette isoforme. Le principal site de recyclage du NADH au sein de la mitochondrie est le complexe I de la chaîne respiratoire qui oxyde le NADH en NAD⁺. Ainsi, on peut donc supposer que le complexe I pourrait être un des principaux modulateurs du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial et des voies de signalisation régulées par ce ratio.

Mon projet de thèse a eu pour but dans une première partie, d'étudier les conséquences de la variation du rapport NADH/NAD^+ sur le métabolisme énergétique mitochondrial, les voies de signalisation impliquées dans ces effets ainsi que d'évaluer le rôle du complexe I dans ces mécanismes de régulation. Comme décrit précédemment, l'une des principales cibles du rapport NADH/NAD^+ est la voie des sirtuines. Un premier travail a consisté à analyser l'impact de l'activation des sirtuines par une molécule pharmacologique (Resvératrol, RSV) sur le métabolisme énergétique mitochondrial. L'investigation des mécanismes à l'origine de l'activation des sirtuines (en particulier le lien entre le complexe I et la régulation du rapport NADH/NAD^+) a aussi été réalisée. Dans un deuxième travail, nous avons étudié les conséquences du déficit du complexe I (induit par des mutations dans des sous-unités de ce complexe) sur le rapport NADH/NAD^+ et la fonction mitochondriale. Nous avons déterminé plus précisément le rôle de la voie sirtuine dans ces effets. Enfin, nous avons analysé, dans ce modèle déficitaire, l'effet de la restauration du rapport mitochondrial NADH/NAD^+ (par traitement avec le Nicotinamide MonoNucléotide, NMN) sur les voies sirtuines dépendantes.

Au cours de notre premier travail, nous avons montré que, dans les mitochondries hépatiques d'un modèle murin traité durant 12 semaines, le RSV active le métabolisme énergétique mitochondrial sous la dépendance de l'isoforme mitochondriale SIRT3. Notre étude prouve en effet que le RSV à faible dose (1-5 μM) stimule indirectement l'activité de SIRT3 en diminuant le rapport NADH/NAD^+ au sein de la mitochondrie. La modulation de ce rapport par le RSV résulte de l'interaction directe entre cette molécule et le complexe I de la chaîne respiratoire. Cette étude souligne donc que le complexe I est un régulateur majeur du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial et de ce fait de l'activité de la protéine SIRT3.

Cependant, dans un deuxième travail mené sur des mitochondries de cerveau de souris jeunes et âgées, nous avons montré que cette interaction entre le RSV et le complexe I est également responsable d'une augmentation de la production de ROS pouvant conduire à un stress oxydant dans les tissus présentant peu de défenses anti-oxydantes notamment en lien avec le vieillissement. La balance entre les effets positifs et négatifs du RSV sur le métabolisme mitochondrial semble donc étroitement liée au type de tissu considéré ainsi qu'à la dose utilisée.

La deuxième partie de la thèse a été consacrée à l'étude menée à l'aide d'une série de lignées fibroblastiques de patients porteurs de mutations dans différentes sous-unités du complexe I. Cette étude a montré qu'un déficit du complexe I pouvait induire des dysfonctions majeures du métabolisme énergétique en lien direct avec l'assemblage de ce complexe I. Ainsi, lorsque la mutation provoque un défaut structurel (défaut d'assemblage), une forte diminution du taux d'ATP

cellulaire liée à la présence d'un stress oxydant est observée. Au final, le niveau d'assemblage du complexe I est étroitement associé à la production excessive de radicaux libres. A l'inverse, chez les patients où le complexe I est correctement assemblé, le déficit fonctionnel conduit principalement à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ mitochondrial. Chez ces derniers, nous avons montré une augmentation de l'acétylation des cibles de SIRT3 résultant de l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺. La normalisation de ce rapport grâce à l'utilisation d'un précurseur du NAD⁺ (le NMN) permet de stimuler la voie SIRT3 et d'activer ainsi le métabolisme mitochondrial. Notre étude place le rapport NADH/NAD⁺ comme cible thérapeutique potentielle dans les déficits du complexe I. De ce fait le NMN apparaît comme une molécule pharmacologique prometteuse dans les pathologies mitochondriales.

Résultats

Articles 1 et 2:

Resveratrol Induces a Mitochondrial Complex I Dependent Increase in NADH Oxidation Responsible for Sirtuin Activation in Liver Cells

Valérie Desquirit-Dumas, Naïg Gueguen, Géraldine Leman, Stéphanie Baron, Valérie Nivet-Antoine, Stéphanie Chupin, Arnaud Chevrollier, Emilie Vessieres, Audrey Ayer, Marc Ferre, Bonneau, Daniel Henrion, Pascal Reynier and Vincent Procaccio.

The Journal of Biological Chemistry

Resveratrol binds to mitochondrial comple I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice

Naïg Gueguen, Valérie Desquirit-Dumas, Géraldine Leman, Stéphanie Chupin, Stéphanie Baron, Valérie Nivet-Antoine, Emilie Vessières, Audrey Ayer, Daniel Henrion, Pascal Reynier, Vincent Procaccio.

Soumis à BBA

Introduction

Le Resveratrol (RSV) est un polyphénol appartenant à la classe des stilbènes. Très étudié ces dernières années pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, cardioprotectrices mais surtout anti-oxydantes, le RSV permettrait d'accroître l'espérance de vie de différentes espèces (Valenzano, Terzibasi et al. 2006) ainsi que d'améliorer les dysfonctions cellulaires dues au processus de vieillissement. Etant donné le rôle clef de la mitochondrie dans ces processus, un lien entre RSV et métabolisme énergétique a été envisagé (Howitz, Bitterman et al. 2003, Valenzano, Terzibasi et al. 2006, Rascon, Hubbard et al. 2012). Plusieurs études ont montré que la mitochondrie était en effet une cible privilégiée du RSV : induction de la consommation d'oxygène (Lagouge, Argmann et al. 2006), stimulation des défenses anti-oxydantes, activation de la biogénèse mitochondriale (Csiszar, Labinsky et al. 2009). L'étude des voies de signalisation, à l'origine de ces effets, souligne l'implication majeure de la protéine SIRT1, une histone déacetylase cytosolique et nucléaire qui possède de nombreuses cibles.

Le RSV a initialement été décrit comme un activateur direct de SIRT1 capable d'activer en aval le cofacteur transcriptionnel PGC-1 α induisant ainsi la biogénèse mitochondriale. Cependant, depuis 2005, cette interaction a été remise en question par plusieurs études (Borra, Smith et al. 2005, Kaeberlein, McDonagh et al. 2005, Beher, Wu et al. 2009) qui démontrent que le dosage fluorimétrique utilisé pour mettre en évidence l'activité deacetylase de SIRT1 en présence de RSV est biaisé par le fluorochrome.

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) a également été identifiée comme une cible potentielle du RSV pouvant conduire à une activation indirecte de SIRT1 puis de PGC-1 α (Dasgupta and Milbrandt 2007, Park, Kim et al. 2007, Um, Park et al. 2010). Dans ce cas, l'AMPK serait responsable pour certains auteurs d'une phosphorylation de SIRT1 (Lee, Wong et al. 2012) et pour d'autres d'une augmentation du taux de NAD⁺ intracellulaire, le cofacteur des sirtuines (Fulco, Cen et al. 2008, Canto and Auwerx 2009, Canto, Jiang et al. 2010, Um, Park et al. 2010). D'autres études décrivent SIRT1 en amont de l'AMPK (Ruderman, Xu et al. 2010, Price, Gomes et al. 2012) ou une régulation réciproque de SIRT1 et AMPK (Jiang, Wang et al. 2012). Enfin une étude de Tillu *et al.*, (2012) suggère que l'activation de l'AMPK par le RSV est totalement indépendante de SIRT1 (Tillu, Melemedjian et al. 2012). Les voies d'activation induites par le RSV restent débattues et semblent dépendre en grande partie de la dose utilisée (Price, Gomes et al. 2012).

Lors de la mise en place de nos travaux (2011), la majorité des études portant sur les effets mitochondriaux du RSV décrivaient une stimulation de la biogénèse mitochondriale par des concentrations élevées de ce polyphénol (de 100 à 250 μ M). Un effet anti-oxydant était également décrit pour cette molécule notamment par la stimulation de l'activité des enzymes de détoxification des ROS (Robb, Page et al. 2008, Robb, Winkelmolen et al. 2008, Shin, Cho et al. 2009). En

revanche, une autre partie de la littérature, plutôt centrée sur le rôle anti-cancéreux du RSV, soulignait des effets pro-oxydants de cette molécule (Azmi, Bhat et al. 2005, Gadacha, Ben-Attia et al. 2009, Martins, Coelho et al. 2014). Cette balance entre effets anti/pro-oxydant semble dépendante de l'environnement cellulaire (pH, composition ionique, (Fukuhara and Miyata 1998), présence ou non d'un stress oxydant (Ahmad, Clement et al. 2003)), du rythme circadien (Gadacha, Ben-Attia et al. 2009) mais surtout de la dose utilisée et du temps de traitement (Martins, Coelho et al. 2014). Au vu de toutes ces données bibliographiques, il semble admis que lors d'un régime enrichi en graisses ou lors du vieillissement, le RSV ait des effets positifs. Cependant, les voies de signalisations impliquées ainsi que les effets dose et tissu-dépendant restent encore peu caractérisés. Dans cette étude, débutée en 2011, nous avons donc choisi de nous intéresser aux effets directs du RSV sur le métabolisme mitochondrial de deux organes métaboliquement très actifs, le foie et le cerveau. Nous avons également étudié les voies de signalisation à l'origine de ces effets. Pour cette étude, nous disposons d'un modèle murin nourri pendant 12 semaines avec une alimentation enrichie en RSV (souris de 6 mois et 22 mois nourries avec 50mg/kg/jour de RSV) ainsi que d'un modèle cellulaire d'hépatocarcinome humain (cellules HepG2 traitées pendant 48 heures par 1, 5 et 50µm de RSV). Nos résultats ont montré que le traitement par RSV induit, à la fois pour les cellules HepG2 et le foie des souris, une stimulation des voies d'apport en substrats (cycle de Krebs et β -oxydation) par un mécanisme dépendant de la protéine SIRT3. Nous avons également identifié un effet direct (indépendant des sirtuines) du RSV sur le complexe I de la chaîne respiratoire. De manière intéressante, la stimulation de ce complexe par le RSV entraîne une augmentation du rapport NAD^+/NADH mitochondriale qui est un élément indispensable pour l'activation en aval de SIRT3 et des voies d'apport en substrats (Article 1). D'autre part, nous avons mis en évidence que le RSV se lie au complexe I de manière compétitive au niveau du site de fixation du NAD. Cependant, outre ces effets sur le rapport NADH/NAD^+ , cette fixation est responsable d'une fuite d'électrons au niveau de la FMN. Ceci induit un stress oxydant majeur, notamment pour les mitochondries de cerveau des souris âgées avec des défenses antioxydantes physiologiquement réduites, (Article 2). Nos résultats mettent donc en lumière le rôle prépondérant du complexe I de la chaîne respiratoire dans la balance entre les effets bénéfiques du RSV sur le métabolisme énergétique mitochondrial hépatique et les effets pro-oxydants de cette molécule. La dose ainsi que le statut redox intracellulaire semblent être des paramètres déterminants dans cette balance et doivent absolument être pris en compte dans les études qui s'intéressent aux effets thérapeutiques potentiels

du RSV.

Resveratrol Induces a Mitochondrial Complex I-dependent Increase in NADH Oxidation Responsible for Sirtuin Activation in Liver Cells*

Received for publication, June 5, 2013, and in revised form, October 30, 2013. Published, JBC Papers in Press, October 31, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.466490

Valérie Desquirit-Dumas^{‡§¶1}, Naïg Gueguen^{‡§¶1}, Géraldine Leman^{‡¶1}, Stéphanie Baron^{||}, Valérie Nivet-Antoine^{||}, Stéphanie Chupin^{‡§¶1}, Arnaud Chevrollier^{‡§¶1}, Emilie Vessières^{‡¶1}, Audrey Ayer^{‡¶1}, Marc Ferré^{‡§¶1}, Dominique Bonneau^{‡§¶1}, Daniel Henrion^{‡¶1}, Pascal Reynier^{‡§¶1}, and Vincent Procaccio^{‡§¶12}

From [‡]Angers Université, Angers F-49000, France, the [§]Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, Angers F-49000, France, [¶]UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers F-49000, France, and ^{||}EA 4466, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris F-75270, France

Background: The mechanism of action of resveratrol on sirtuin and mitochondrial metabolism remains elusive.

Results: Resveratrol increases the mitochondrial NAD⁺ level by direct stimulation of complex I, leading to a SIRT3-dependent increase in substrate supplies.

Conclusion: Our results link the direct stimulation by resveratrol of NADH oxidation to the SIRT3 activation.

Significance: Mitochondrial NAD⁺/NADH ratio is a critical parameter mediating resveratrol effect on mitochondrial function.

Resveratrol (RSV) has been shown to be involved in the regulation of energetic metabolism, generating increasing interest in therapeutic use. SIRT1 has been described as the main target of RSV. However, recent reports have challenged the hypothesis of its direct activation by RSV, and the signaling pathways remain elusive. Here, the effects of RSV on mitochondrial metabolism are detailed both *in vivo* and *in vitro* using murine and cellular models and isolated enzymes. We demonstrate that low RSV doses (1–5 μM) directly stimulate NADH dehydrogenases and, more specifically, mitochondrial complex I activity ($\text{EC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$). In HepG2 cells, this complex I activation increases the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. This higher NAD⁺ level initiates a SIRT3-dependent increase in the mitochondrial substrate supply pathways (*i.e.* the tricarboxylic acid cycle and fatty acid oxidation). This effect is also seen in liver mitochondria of RSV-fed animals (50 mg/kg/day). We conclude that the increase in NADH oxidation by complex I is a crucial event for SIRT3 activation by RSV. Our results open up new perspectives in the understanding of the RSV signaling pathway and highlight the critical importance of RSV doses used for future clinical trials.

Resveratrol (RSV),³ a natural polyphenolic antioxidant, possesses a wide range of biological properties, including protec-

tive effects on the nervous (1) and cardiovascular systems (2). RSV appears to be a major regulator of energetic metabolism, ameliorating the glucose homeostasis in obese mice (3, 4), increasing fatty acid oxidation (FAO) (5), and inducing the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis (4). Mitochondria, encompassing catabolic pathways (FAO and the tricarboxylic acid cycle (TCA)), providers of reduced substrates (NADH and FADH₂) from fatty acids and carbohydrates to the oxidative phosphorylation, appear to be a preferential target of RSV. The effects of high RSV doses (10–100 μM) on mitochondrial metabolism have been investigated in various models, and most of the studies have reported an increase in mitochondrial biogenesis through a sirtuin-dependent pathway. Sirtuins are a family of NAD-dependent deacetylases, among which three isoforms (SIRT3, -4, and -5) are located in the mitochondrial compartment (6). Computational studies have shown that up to 20% of mitochondrial proteins can be acetylated on their lysine residues and are therefore putatively regulated by sirtuins (7). SIRT3, the most extensively studied mitochondrial sirtuin, has been shown to regulate the activity of key enzymes of mitochondrial metabolic pathways, such as succinate dehydrogenase (SDH) and isocitrate dehydrogenase (TCA enzymes) and long-chain fatty acid dehydrogenase (FAO) in a nutrient-sensitive fashion (8–12). SIRT3 is also involved in the regulation of oxidative phosphorylation through the deacetylation of complex I and succinate dehydrogenase subunits (8, 9). The other mitochondrial sirtuins, SIRT4 and SIRT5, may target FAO and urea cycle enzymes. Although not found in the mitochondria, SIRT1 is considered as an important regulator of metabolism, able to activate both mitochondrial biogenesis by transcriptional activation of the PGC1-related signaling pathway (11, 13) and the energetic metabolic fluxes by allosteric post-translational modifications of key enzymes. In addition, SIRT1 is reported to be the main target of RSV (10, 12). However, the

mitochondrial transcription factor A; m-Cl-CCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone.

* This work was supported by grants from "Région Pays de la Loire," "Agence Nationale de la Recherche," "Fondation pour la Recherche Médicale," "Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels," "Retina France," "Ouvrir les Yeux," and "Association contre les Maladies Mitochondriales."

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Dépt. de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, 4 Rue Larrey, 49933 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-78-54; Fax: 33-2-41-35-58-83; E-mail: ViProcaccio@chu-angers.fr.

³ The abbreviations used are: RSV, resveratrol; FAO, fatty acid oxidation; SDH, succinate dehydrogenase; CS, citrate synthase; LDH, L-lactate dehydrogenase; FDH, formate:NAD⁺ oxidoreductase; ADH, aldehyde:NAD⁺ oxidoreductase; GDH, L-glutamate:NAD(P)⁺ oxidoreductase; AMPK, AMP-activated protein kinase; Ctl, control; NFR, NADH:FeKCN reductase; NUR, NADH:ubiquinone reductase; FMN, FMN dehydrogenase; TFAM,

direct interaction between RSV and SIRT1 has been increasingly challenged during the last few years (14–16), and the signaling pathways linking RSV and sirtuin activation remain to be clarified. The hypothesis of indirect activation of sirtuins through the modulation of NAD⁺ concentration is now favored (17, 18), and mitochondria concentrate a significant part of the cellular NAD⁺ pool (19). Thus, in this study, the effect of low RSV dose (1–5 μM) on mitochondrial metabolism and the signaling pathways involved were analyzed by using three different models (*in vitro* study on isolated enzymes, HepG2 cells treated with RSV, and an aging model of mice fed with RSV).

MATERIALS AND METHODS

Reagents—*trans*-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene), triacetyl-resveratrol (3,5,4'-triacetyl-*trans*-stilbene), and galloannin were purchased from Sigma-Aldrich. Compound C (6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-*a*]-pyrimidine), SIRT1 inhibitor III (6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide, alternatively named EX-527; IC_{50} = 98 nM, 19.6, and 48.7 μM for SIRT1, SIRT2, and SIRT3, respectively) was obtained from Merck. Quality and purity of *trans*-resveratrol was checked by spectrum analysis before use.

Cell Culture—Human hepatocarcinoma HepG2 cells (ATCC number HB-8065) were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM/F-12, JBOY Institute of Biotechnology, Reims, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine (PAA, Pasching, Austria) at 37 °C, 5% CO₂. The medium was supplemented with either vehicle (ethanol, 1:5000) or RSV (1, 5, or 50 μM) for 48 h. Cellular toxicity assays showed no toxicity or antiproliferative effect at up to 5 μM RSV. For knockdown experiments, cells were reverse-transfected with SIRT3 siRNAs or two different scrambled siRNAs (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) by incubation with LipofectamineTM RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen). 24 h after siRNA transfection, the medium was supplemented with either vehicle or RSV (1 μM) for 48 h. The expression of SIRT3 was decreased by 60% (quantitative PCR measurement; Fig. 1A), and the corresponding protein level was decreased by 80 ± 9% for SIRT3 siRNA (Fig. 1A), whereas scrambled siRNA had no effect on any SIRT isoform expression.

Animals—Male C57BL/6J strain mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a room at 24 ± 2 °C with a 12-h/12-h light/dark cycle, with diet and water *ad libitum*. Two groups were used: young (Y) (aged 6 months) and old mice (O) (aged 22 months). Twelve weeks before euthanasia, half of each group received a standard diet (M20 croquettes (SDS[®], Y Ctl and O Ctl groups), and the other half received a diet of M20 croquettes supplemented with 0.04% *trans*-resveratrol (Yvery[®], Y RSV and O RSV groups). After 12 weeks of RSV diet, mice were anesthetized with isoflurane before decapitation and dissection of the liver, in accordance with European Community guidelines (directive 86/609/CEE), and the Ethical Committee of the University of Paris-Descartes (CEEA34.SB.008.12). RSV accumulation in liver was checked according to Menet *et al.* (20); the concentration of RSV and its derivatives was 1.29 ± 0.19

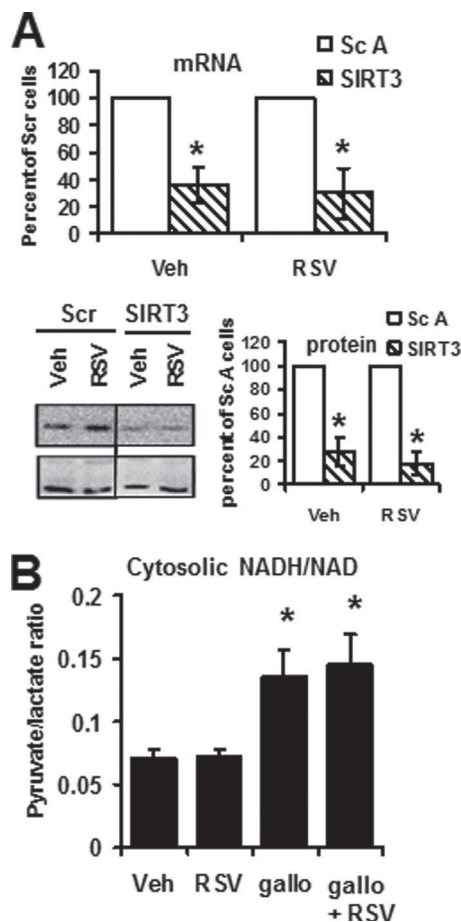


FIGURE 1. Control of SIRT3 silencing and of the effect of galloannin treatment in HepG2 cells. A, control of SIRT3 knockdown by siRNA. SIRT3 knockdown was determined at the mRNA level by qPCR (SIRT3/actin ratio calculated with the $-\Delta\Delta\text{Ct}$ method for these two genes with similar amplification efficiency) and at the protein level by Western blot (SIRT3 (upper panel)/HSP60 (lower panel) ratio). Results are expressed as a percentage of scrambled transfected cells and represent the mean ± S.E. (error bars) of six experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with scrambled-transfected cells. B, effect of galloannin versus RSV on the NAD⁺/NADH cytosolic ratio. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio was calculated as the ratio of pyruvate/lactate concentrations measured in the HepG2 cell culture medium after 48 h of incubation with vehicle (Veh; ethanol, 1:5000), RSV (RSV; 1 μM), galloannin (gallo; 1 mM) or galloannin + RSV (gallo + RSV). Results are expressed as the mean ± S.E. of eight experiments.

and 2.17 ± 0.46 $\mu\text{mol/kg}$ in young and old RSV mice, respectively (undetectable in control groups).

Determination of Cellular Concentrations of NADH and NAD⁺—NADH and NAD⁺ concentrations were measured using the NAD/NADH assay kit (Abcam, Paris, France) on lysates from 2 × 10⁶ cells filtered under a 10-kDa column according to the manufacturer's instructions. The cytosolic NAD(H)-redox state was determined using the metabolite indicator method (*i.e.* the lactate dehydrogenase reaction) (21, 22). Lactate concentration was measured using the lactate oxidase reaction (Lactate Assay Kit, Abbott), and pyruvate concentration was measured using a pyruvate assay kit (DiaSys, Condom, France) according to the manufacturers' instructions.

NAD(P)H Autofluorescence Imaging—HepG2 cells were grown in two-well glass chambers (Lab-TekTM Chamber SlideTM System, Nunc, Langensfeld, Germany) for 2 days and treated with vehicle (ethanol, 1:5000), RSV (1 μM), or rotenone

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

(10 nM). Before acquisition, the cells were thoroughly washed with medium without phenol red, with or without drugs. NAD(P)H autofluorescence signals were acquired with a Leica microscope (DMI6000B, Microsystems, Nanterre, France; excitation wavelength, 330 nm; emission wavelength, 450 nm) equipped with a Roper CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Tucson, AZ) and with a high sensitivity CCD camera for quantitative fluorescence microscopy. Metamorph® version 7.6 software (Molecular Devices, Saint-Grégoire, France) was used for acquisition driving (2 s) and image analysis. Measurements were performed at 37 °C. For quantitative analysis, 1×10^7 fresh HepG2 cells were resuspended in DMEM/F-12 without red phenol and placed in an UV quartz cuvette. Cell autofluorescence was measured on a fluorimeter by exciting the cell suspension at 340 nm and reading the fluorescence at 450 nm according to Ref. 23. To measure non-mitochondrial NAD(P)H autofluorescence, 10 μM m-Cl-CCP was added to the cuvette (0% autofluorescence). The 100% autofluorescence was obtained by adding 5 μM rotenone + 1 mM KCN to the cell suspension.

Isolation of Mitochondria from HepG2 Cells—Mitochondria were isolated from a pellet of 8×10^7 HepG2 cells treated for 48 h either with vehicle (ethanol, 1:5000) or with RSV (1 μM). Briefly, cells were harvested, washed once with cold PBS, and resuspended in isolation buffer (100 mM saccharose, 50 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM EGTA, pH 7.4). Cell membranes were disrupted using digitonin (10 $\mu\text{g}/10^6$ cells, 10 min at 4 °C), and mitochondria were pelleted by centrifugation (10,000 $\times g$, 10 min at 4 °C). Mitochondrial pellet was washed twice in isolation buffer and resuspended in respiration buffer (10 mM KH_2PO_4 , 300 mM mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, pH 7.4). Quality of the mitochondrial preparation was controlled by oxygraphic analysis; more precisely, cytochrome *c* was added to check membrane integrity, and the absence of NAD^+ leakage during the isolation procedure was checked by NAD^+ supplementation during maximal, ADP-stimulated, respiration.

Isolation of Mitochondria from Mouse Tissues—Liver and brain mitochondria were isolated as described elsewhere (24, 25). The entire operation was performed at 4 °C and completed in less than 1 h.

Mitochondrial Respiration Rates—Oxygen consumption was measured on isolated mitochondria as described previously (24, 25) at 37 °C on a high resolution oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria), using substrates of complexes I, I + III, II, IV, FAO, and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) shuttle as described elsewhere (24, 25): complex I substrate, 5 mM malate and 2.5 mM pyruvate; complex I and II substrate, 5 mM malate, 2.5 mM pyruvate, and 5 mM succinate; complex II substrate, 10 mM succinate supplemented with 10 μM rotenone; complex IV substrate, 5 mM N,N,N',N' -tetramethyl-*p*-phenylenediamine reduced with 50 mM ascorbate. 40 μM palmitoyl-L-carnitine + 2.5 mM malate was used to induce liver β -oxidation, and 20 mM glycerol 3-phosphate was used to initiate the GAPDH shuttle. The active state of respiration (coupled respiration) was initiated by the addition of a saturating ADP concentration (0.5 mM). Cytochrome *c* was added (8 μM) to check the integrity of outer mitochondrial membranes.

Mitochondrial Enzymatic Activities—The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes (I–IV) and TCA and FAO

enzymes were measured at 37 °C on a UV mc^2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) as described elsewhere (26–28). Activity of the NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinol cytochrome *c* reductase (complex III), cytochrome *c* oxidase (complex IV), and citrate synthase (CS) were measured according to the method described by Medja *et al.* (27). NADH ubiquinone reductase activity was assayed in KH_2PO_4 buffer (50 mM, pH 7.5), containing fatty acid-free BSA (3.75 mg/ml), 0.1 mM decylubiquinone, and 0.10 mM NADH was added to initiate the reaction. Parallel measurement in the presence of rotenone (5 μM) was used to determine the background rate. NADH dehydrogenase activity of complex I was measured in the same medium using 0.05 mM NADH as substrate, but decylubiquinone was replaced by ferricyanide (1 mM FeKCN) as electron acceptor. For the measurement of SDH, the electron acceptor decylubiquinone was replaced by phenazine methosulfate (1 mM), and the reduction of 2,6-dichloroindophenol (50 μM) in the presence of 30 mM succinate, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antimycin, and 10 μM rotenone was followed at 600 nm. GAPDH activity was measured in 50 mM KH_2PO_4 buffer, pH 7.5, supplemented with 2.5 mg/ml BSA, 1 mM phenazine methosulfate, and 50 μM 2,6-dichloroindophenol. The addition of 30 mM glycerol 3-phosphate activated the reaction. The same reaction medium was used for measurement of long-chain fatty acid dehydrogenase activity with palmitoyl-CoA as substrate. Isocitrate dehydrogenase activity was measured by following the appearance of NADH using 0.8 mM NAD^+ and NADP^+ and 10 mM isocitrate as substrates in a mixture containing 2 mM CaCl_2 , 0.2 mM EDTA, and 10 mM MgCl_2 , in 50 mM KH_2PO_4 buffer, pH 7.5 (26). For complex I and L-lactate dehydrogenase (LDH) activity on HepG2 cells, cell pellets were homogenized in cell buffer (250 mM saccharose, 20 mM Tris, 2 mM EGTA, 1 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.2). The activity of LDH was measured in a reaction mix comprising 100 mM KH_2PO_4 , pH 7.1, 0.25% Triton X-100, 2.5 mM pyruvate. The reaction was initiated in the presence of 0.1 mM NADH, and the NADH disappearance was recorded at 340 nm at 37 °C. For complex I measurement, cells were further disrupted by one freezing in liquid nitrogen followed by rapid thawing at 37 °C. Lysates were then enriched in mitochondria by centrifugation (16,000 $\times g$, 1 min at 4 °C), washed once in cell buffer (250 $\mu\text{l}/10^6$ cells), and sonicated (6 \times 5 s with a Branson Sonic Power sonicator (GlaxoSmithKline) on ice. Complex I (NADH ubiquinone reductase) activity was immediately assayed in KH_2PO_4 buffer (80 mM, pH 7.4), containing 1 mM KCN, 2 mM NaN_3 , 0.1 mM ubiquinone-1, and 75 μM 2,6-dichlorophenolindophenol. 0.10 mM NADH was added to initiate the reaction. Rotenone (5 μM) was used to determine the background rate. NADH:FMN dehydrogenase (FMNdh; EC 1.5.1.39), formate: NAD^+ oxidoreductase (FDH; EC 1.2.1.2), LDH (EC 1.1.1.27), aldehyde: NAD^+ oxidoreductase (ADH; EC 1.1.1.1), and L-glutamate: NAD(P)^+ oxidoreductase (GDH; EC 1.4.1.3) (Roche Applied Science) activities were measured according to the manufacturer's instructions. FMNdh and FDH activities were measured at 30 °C, GDH and LDH at 37 °C, and ADH at 25 °C. Initial rates (v_i) were determined using true initial tangent of the measured optic densities according to time.

UV-visible Spectroscopy—The UV-visible absorption spectra of RSV and BSA in the presence and absence of enzymes were recorded on a SAFAS UV mc^2 spectrophotometer equipped with 1.0-cm quartz cells with a slit of 2 nm and scan speed of 200 nm \cdot min $^{-1}$. The absorbance assessments were performed at pH 7.0 in KH $_2$ PO $_4$ 50 mM buffer, 25 °C. Each spectrum is an average of at least two scans.

Western Blotting—Mitochondrial proteins (20–50 μ g) solubilized in Laemmli buffer were resolved by 8 or 12.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane as described elsewhere (24), and incubated with primary monoclonal antibodies overnight at 4 °C (subunits of respiratory chain: mouse monoclonal antibodies (Mitosciences, Eugene, OR); mitochondrial biogenesis, rabbit monoclonal anti-PGC1 α and goat anti-TFAM antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); phospho-AMPK/total AMPK, rabbit antibodies against AMPK α 1/ α 2 and phospho-AMPK α (Cell Signaling Technology)).

Deacetylation Analysis—For immunoprecipitations, 50 \times 10 6 HepG2 cells were solubilized in Lysis Buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 1 mM dithiothreitol, 1% deoxycholate, 0.1% Triton X-100, antiproteases (Complete, Roche Applied Science), 1 mM PMSF, 10 mM nicotinamide, and 1 mM sodium butyrate). Complex II immunocapture kit and p53 immunocapture kit (MitoSciences) were used to purify complex II and p53 from HepG2 cells according to the manufacturer's instructions. The following antibodies were then used for immunoblotting: mouse monoclonal anti-complex II 70 kDa (Mitosciences), mouse monoclonal anti-p53 (Abcam), and rabbit polyclonal anti-acetyl-lysine (Abcam) antibodies.

Computational Modeling—The structures of *trans*-RSV and triacetyl-RSV were automatically docked into the NADH:FMNdh enzyme using FlexX software (part of the LeadIT software (Biosolve IT)) in the presence of cofactors (NADH and FMN).

Statistical Analysis—Statistical comparisons between Ctl and RSV mice were made with the Mann-Whitney *U* test. The Wilcoxon test for paired data was used for the analysis of the effects of inhibitors or drugs. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

In Vitro, RSV Inhibits NAD $^+$ Hydrogenases and Activates NADH Dehydrogenases—The inhibitory action of 20 μ M RSV on an NAD $^+$ -dependent enzyme, aldehyde dehydrogenase, has been previously reported (29). This inhibition of NAD $^+$:aldehyde reduction reaction at 5 μ M RSV is confirmed by the present results (Fig. 2A). The exact mechanism is currently not precisely known, but it is thought to imply the binding of RSV to the enzyme-NADH complex. Thus, we postulated that RSV could directly alter the kinetic parameters of other NAD $^+$ /NADH-metabolizing enzymes. One of the simplest examples of NAD $^+$ -dependent dehydrogenation is catalyzed by NAD $^+$ -dependent FDH. RSV inhibited the NAD $^+$ -dependent FDH reaction in the 1–5 μ M range (Fig. 2A, V_{\max} = 1.187 and 0.740 μ mol \cdot min $^{-1}\cdot$ mg protein $^{-1}$ with vehicle and 5 μ M RSV, respectively). The addition of RSV slightly increased the activity of LDH and directly stimulated GDH and FMNdh (Fig. 2A). The strongest increase was observed for FMNdh activity. Lineweaver-Burk plots of FMNdh activity according to NADH

concentrations (0.05–0.2 mM) indicated that the addition of RSV altered both the V_{\max} and the K_m of the enzyme for NADH (Fig. 2B, left). The increase in FMNdh activity was not observed using the triacetyl-RSV derivative (Ac; Fig. 2B, right), which possesses acetylated groups instead of the hydroxyl ones and a higher steric hindrance.

It has been shown previously that the biological activity of RSV and its metabolites depends on concurrent direct binding with its various molecular targets, as quinone reductase 2, COX-1/2, aldehyde dehydrogenase, and the mitochondrial F1-ATP synthase among others (30). The loss of potency using triacetyl-RSV, presenting a higher steric hindrance, also suggested a physical interaction of resveratrol with the enzyme. Computational modeling showed that *trans*-RSV could be located in the core of the FMNdh (Fig. 2, C1), whereas the triacetyl-RSV form would preferentially interact with an external site of the enzyme (Fig. 2, C2). Moreover, it was proposed that RSV and NAD $^+$ substrate mutually cooperate to increase their binding to enzymes (29). UV-visible measurements of RSV derivatives in the absence or presence of NAD $^+$ and FMNdh were realized to estimate the quenching of RSV absorption by the enzyme. The absorption spectrum of *trans*-RSV in 100% ethanol showed absorption peaks at 317 and 306 nm (Fig. 2, D1 and D2), in agreement with published results (31). In the presence of NAD $^+$, a significant increase in UV absorption was observed for *trans*-RSV, and the maximum absorbance shifted to 303–306 nm. The addition of the FMNdh resulted in a dose-dependent decrease in this UV absorbance (Fig. 2, D2), from 10 to 25% with 1 μ g to 20 μ g \cdot ml $^{-1}$ of the enzyme. By contrast, the enzyme addition did not change the absorbance of NAD $^+$ alone. A decrease in RSV absorption was also observed with bovine serum albumin (Fig. 2, D2 (inset)), known to bind to RSV (32). Only a slight reduction (5%) was observed upon the addition of FMNdh to RSV in the absence of NAD $^+$ (Fig. 2, D1). The addition of pyruvate kinase, which was not identified to bind to RSV by computational analysis, did not modify RSV absorption, either in the absence or in the presence of NAD $^+$. Overall, this suggested a direct binding of RSV to the enzyme in the presence of NAD $^+$.

Complex I of the mitochondrial respiratory chain is an essential NADH dehydrogenase for cell metabolism. This enzyme is a multimeric structure comprising an FMN moiety covalently linked to the complex at the active site for NADH oxidation. The mechanism of the complex I redox reaction comprises NADH oxidation by the flavin (NADH:FeKCN reductase (NFR) activity), followed by the transfer of two electrons to bound quinone (NADH:ubiquinone reductase (NUR) activity). On isolated, disrupted mitochondria, the addition of 0.05–5 μ M RSV both increased NUR and NFR activity in a dose-dependent manner (Fig. 2, E1), with an EC_{50} of 0.94 ± 0.087 μ M (Fig. 2, E2). A greater increase was observed for NFR than for NUR (Fig. 2, E1), suggesting that RSV directly modified the kinetic parameters of the dehydrogenase part of complex I. Here again, the triacetyl-RSV analog had no effect on enzyme activity (Fig. 2, E3).

In Situ, RSV Activates NADH Dehydrogenase Enzymes and Mitochondrial NADH Oxidation, Which Increases NAD $^+$ /NADH Ratio—We next investigated whether RSV modulated NUR activity *in situ* at the active dose determined by *in vitro*

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

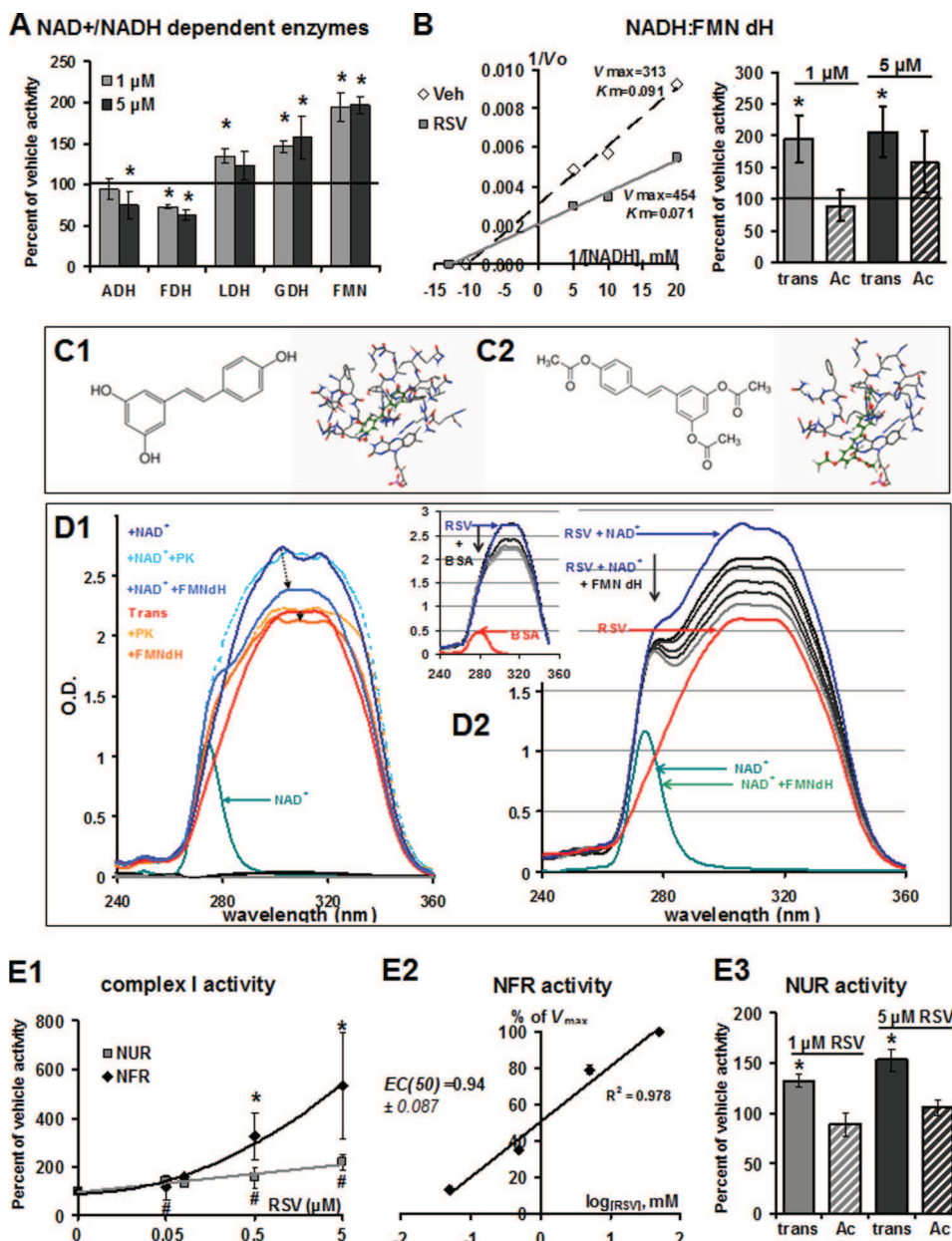


FIGURE 2. RSV *in vitro* inhibits NAD⁺ hydrogenases and activates NADH dehydrogenases. *A*, effect of RSV on activity of isolated ADH, FDH, LDH, GDH, and FMN dH. Activities of NAD⁺/NADH-dependent enzymes were measured at 30 °C for FMN and FDH, at 37 °C for GDH and LDH, and at 25 °C for ADH on purified enzymes incubated with vehicle (ethanol, 1:5000) or RSV at 1 or 5 μM . Results are expressed as a percentage of vehicle activity. Absolute values were 199 ± 5.69 , 1.18 ± 0.06 , 260 ± 15 , 2.97 ± 0.53 , and $0.31 \pm 0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹ for ADH, FDH, LDH, GDH, and FMN dH, respectively. Data represent the mean \pm S.E. (error bars) ($n = 5$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle. *B*, detailed effects of RSV on isolated FMN dH activity. FMN dH activity was monitored on purified enzyme after the addition of vehicle (Veh; ethanol, 1:1000) or RSV. *Left*, Lineweaver-Burk plot showing the effect of RSV on enzymatic activity in presence of different NADH, H⁺ (50, 100, or 200 μM), and RSV (0 and 5 μM) concentrations. V_{max} values are expressed in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹, and K_m is expressed in mM NADH. *Right*, effect of RSV on enzymatic activity in the presence of different RSV analogs (*trans*-RSV or triacetyl-RSV; 0, 1, or 5 μM). Results shown are representative of $n = 4$ independent preparations. *C*, *in silico* prediction of the binding of *trans*-RSV (*C1*) or triacetyl-RSV (*C2*) to the FMN dH in the presence of NAD⁺ using FlexX software. *D*, UV-visible adsorption spectra of RSV. *D1*, adsorption spectra of *trans*-RSV and triacetyl-RSV in the absence or presence of NAD⁺, FMN dH, or pyruvate kinase (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). *D2*, adsorption spectra of *trans*-RSV in the absence or presence of NAD⁺ and various concentrations of FMN dH (1, 2, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) or in the absence or presence of various concentrations of BSA (*top inset*; 50, 250, 375, 500, and 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). *E*, effect of RSV on complex I activity. *E1*, NUR (rotenone-sensitive) and NFR activities of complex I were measured on preparation of isolated, disrupted liver mitochondria after incubation with increasing RSV concentrations (0.05–5 μM ; *left*). Absolute values for NUR and NFR activities were 193 ± 30 and $573 \pm 81 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹, respectively, for vehicle conditions and 384 ± 19 and $3540 \pm 791 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹, respectively, for RSV 5 μM . *E2*, dose-response plot normalized to the maximal stimulation of NFR activity for EC₅₀ determination. *E3*, effect of either *trans*-RSV or triacetyl-RSV (0, 1, or 5 μM) on NUR activity. Data represented the mean \pm S.E. ($n = 5$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

study (*i.e.* roughly 1 μM). In HepG2 cells, the activity of NUR was increased by RSV (+82.4 \pm 25.0% for RSV 1 μM and +171.91 \pm 43.1% for RSV 5 μM compared with vehicle-treated cells; Fig. 3A, *left*). These data indicated that RSV also activated NUR *in situ*. The effect of RSV on cytosolic NADH dehydroge-

nases was also investigated. The LDH plays a central role in cellular metabolism and NADH/NAD⁺ equilibrium. Our results showed that RSV also stimulated LDH activity (+20.7 \pm 5.1% for 1 μM RSV and +56.9 \pm 10.3% for 5 μM RSV compared with vehicle-treated cells; Fig. 3A, *right*). However, this activity

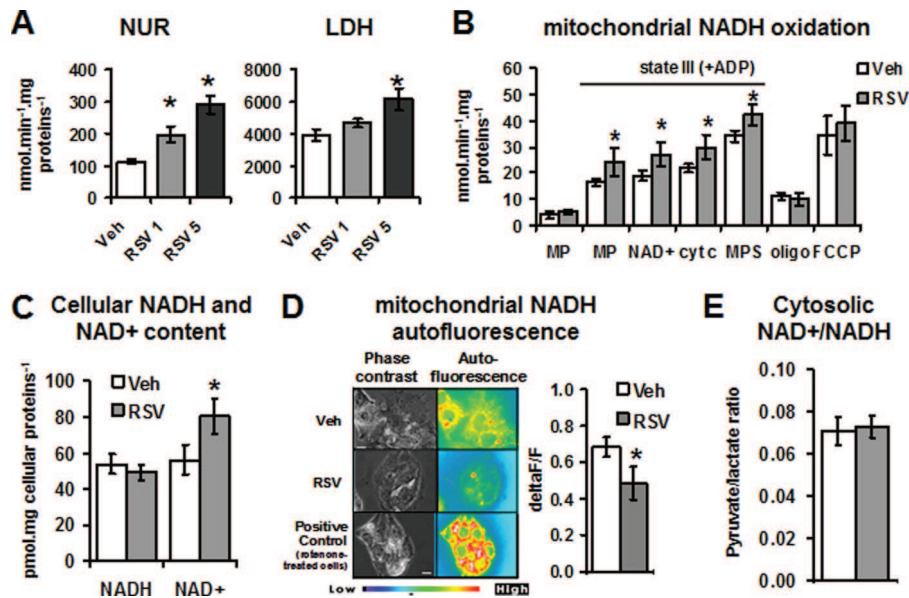


FIGURE 3. RSV stimulates NADH dehydrogenase activities in HepG2 cells and increases mitochondrial NAD⁺ content. *A*, effect of different RSV doses on two NADH dehydrogenases (NUR and LDH) activities on HepG2 cells. HepG2 cells were incubated for 48 h with vehicle (Veh; ethanol, 1:5000) or RSV (1 or 5 μ M). Maximal activities of NUR and LDH were measured on cell extracts. Results are expressed as the mean \pm S.E. (error bars) ($n = 4$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *B*, effect of RSV on NADH oxidation in isolated mitochondria. Respiration rates were measured on isolated mitochondria of RSV (48 h, 1 μ M)-treated or vehicle (Veh; ethanol, 1:5000)-treated HepG2 cells. *MP*, respiration rate with complex I substrates (i.e. 5 mM malate + 2.5 mM pyruvate; NAD⁺ addition of 0.5 mM NAD⁺; *cyt c*, the addition of 8 μ M cytochrome *c*; *MPS*, complex I and II substrates (i.e. malate, pyruvate, and 10 mM succinate); *SR*, the addition of 5 μ M rotenone. Results are expressed as the mean \pm S.E. ($n = 6$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *C*, effect of RSV treatment on cellular NADH and NAD⁺ levels in HepG2 cells. The cellular free NADH and NAD⁺ levels were determined on HepG2 cells incubated during 48 h with vehicle (Veh; ethanol, 1:5000) or RSV (1 μ M). Results are expressed as the mean \pm S.E. of eight experiments. *D*, effect of RSV treatment on NADH autofluorescence on HepG2 cells. *Left*, NADH autofluorescence was measured by fluorescent microscopy on HepG2 cells incubated with vehicle (Veh; ethanol, 1:5000) or RSV (1 μ M, 4 h). In positive control, rotenone (10 nM) was added 15 min before RSV treatment. Data are shown as a representative picture of $n = 3$. *Right*, NADH redox index measured in vehicle- and RSV-treated cells by recording the NADH autofluorescence in basal conditions, following the addition of an uncoupler (m-Cl-CCP, 10 μ M) and respiration inhibitors (KCN (1 mM) and rotenone (5 μ M)) in both vehicle- and RSV-treated cells. The NADH redox index is then calculated by expressing the basal autofluorescence as a ratio of this range and as the mean \pm S.E. of five experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *E*, effect of RSV on cytosolic NAD⁺/NADH ratio. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio was calculated as the ratio of pyruvate/lactate concentrations measured in culture medium of vehicle (Veh; ethanol, 1:5000)-treated or RSV (RSV, 1 μ M; 48 h)-treated cells. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells.

increased with RSV to a lesser extent than the NUR activity (+80 and +20% for NUR and LDH, respectively, at 1 μ M RSV). In isolated mitochondria, the stimulation of NUR activity was followed by a higher NADH oxidation by complex I (Fig. 3*B*), as shown by the increase in complex I-dependent respiration rates in mitochondria from RSV-treated cells.

An increase in NADH dehydrogenase activities accompanied by a stimulation of NADH oxidation could increase the NAD⁺/NADH ratio *in situ*. To test this hypothesis, the NADH and NAD⁺ levels were first determined on whole cell extracts. Results presented in Fig. 3*C* show that RSV significantly increased cellular NAD⁺ concentration by 56%. The total cellular NAD (NAD⁺ and NADH) was not significantly modified by RSV treatment. We then analyzed the NADH redox state by the measurement of NAD(P)H autofluorescence in HepG2 cells (Fig. 3*D*). We observed lesser NAD(P)H autofluorescence (i.e. higher NAD(P)⁺) in RSV-treated cells compared with vehicle (Fig. 3*D*, *left*). Pretreatment of cells with complex I inhibitor rotenone (10 nM) prevented the decrease in NAD(P)H, as evidenced by the similar autofluorescence level in RSV plus rotenone cells compared with vehicle plus rotenone cells. NAD(P)H autofluorescence rose in response to the blockade of the electron transport chain at the complexes I and IV using rotenone and KCN, respectively (+50 \pm 12% in vehicle-treated cells) and was reduced by fully stimulating oxygen consumption with

the uncoupler m-Cl-CCP (-40 \pm 7%; not shown). The NADH redox index was calculated by expressing the basal cellular autofluorescence as a percentage of the fully reduced (respiration inhibition; i.e. KCN + rotenone) and fully oxidized (i.e. m-Cl-CCP) conditions (23). In RSV-treated cells, NAD(P)H autofluorescence was decreased by roughly 30% ($p = 0.0423$) in RSV-treated cells (Fig. 3*D*, *right*), whereas the fluorescence signal with rotenone + KCN did not differ between vehicle- and RSV-treated cells (not shown). Thus, the NADH redox index was lower in RSV-treated cells compared with vehicle ones, indicating an increase in mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio (calculated from the pyruvate/lactate ratio) was also determined in HepG2 cell supernatants. The results presented in Fig. 3*E* show that the cytosolic NAD⁺/NADH ratio was not modified by RSV treatment. Taken together, these results indicate that complex I stimulation by RSV results in an increase in NADH oxidation, mainly in the mitochondrial compartment, responsible for an increase in mitochondrial NAD⁺/NADH ratio.

SIRT3 Activity Is Increased by RSV Treatment and Is Involved in the Stimulation of the Krebs Cycle Enzyme Activities but Does Not Stimulate Mitochondrial Biogenesis—We next further investigated the signaling pathways involved in RSV effects on mitochondrial metabolism. NAD⁺ is a central co-substrate for the sirtuin deacetylases. Thus, we hypothesized that the

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

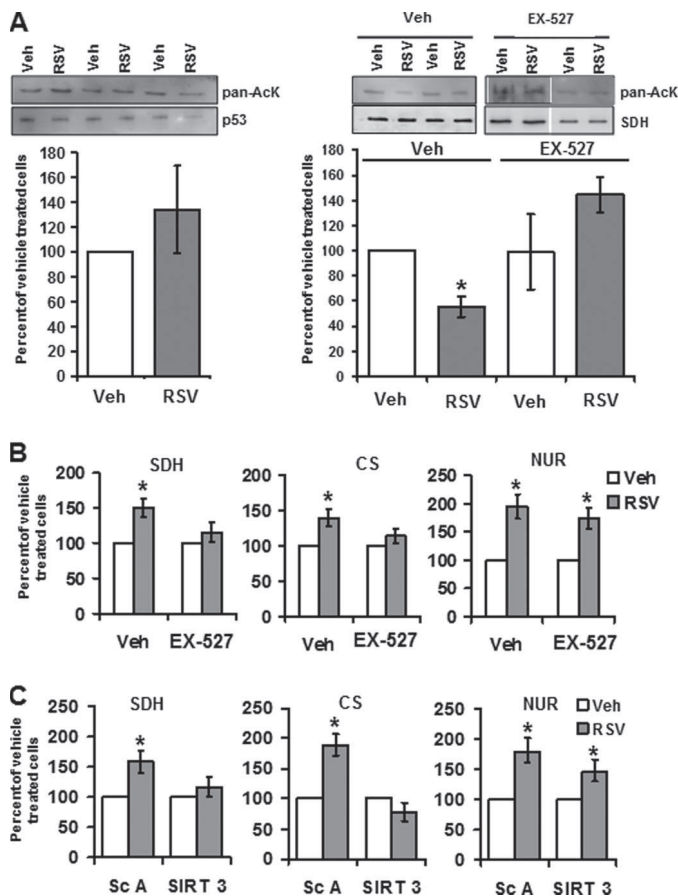


FIGURE 4. SIRT3 is involved in the effects of RSV on SDH and CS but not NUR activities. *A*, effect of RSV on acetylation status of sirtuin target proteins. *Left*, p53 was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 h, 1 μM). *Right*, SDH was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 h, 1 μM) and/or with EX-527 (100 μM). The graph represents the mean of the acetyl-lysine/SDH protein ratio of $n = 11$ experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *B*, effect of sirtuin inhibition on RSV-induced stimulation of SDH, CS, and NUR activities. HepG2 cells were incubated with EX-527 (100 μM) or without (vehicle, DMSO (1:1000)) before the addition of RSV (1 μM) or vehicle (Veh; ethanol (1:5000)). Enzymatic activities of SDH, CS, and NUR were measured. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. (error bars) ($n = 4$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *C*, effect of SIRT3 knockdown on RSV-induced stimulation of SDH, CS, and NUR activities. HepG2 cells were transfected with scrambled or SIRT3 siRNAs and incubated with vehicle (ethanol, 1:5000) or RSV (1 μM) for 48 h. Data represent the mean \pm S.E. of $n = 9$ SDH and CS measurements and $n = 6$ NUR measurements. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells.

increase in mitochondrial NAD^+ concentration could lead to sirtuin activation. This hypothesis was checked by determining the acetylation status of p53 and SDH, known targets of SIRT1 and SIRT3, respectively. Fig. 4A shows that the acetylation status of p53 was not significantly modified by RSV treatment (*left*). In contrast, SDH was hypoacetylated in RSV-treated HepG2 cells (Fig. 4A, *right*), a situation that was abolished with the SIRT inhibitor EX-527 preincubation. These results supported a SIRT3 activation by RSV treatment in HepG2 cells. Moreover, RSV treatment stimulated SDH (203.73 ± 18.49 nmol \cdot min \cdot mg of protein for vehicle-treated and 269.9 ± 14.6 nmol \cdot min \cdot mg of protein for RSV-treated cells) and CS (701.2 ± 57.2 nmol \cdot min \cdot mg of protein for vehicle-treated and 872.1 ± 29.0 nmol \cdot min \cdot mg of protein for RSV-treated cells)

activities, both targets of the mitochondrial SIRT3 isoform (Fig. 4B). In order to control the implication of SIRT3 in these effects, sirtuins were inhibited either by pharmacological inhibitor using a high dose of EX-527 (100 μM ; Fig. 4B) or by reducing SIRT3 expression using specific siRNAs (Fig. 4C). The inhibition of sirtuins using EX-527 prevented the increase in SDH and CS activities in RSV-treated cells (Fig. 4B) but did not prevent the increase in NUR activity. Moreover, the specific decrease of SIRT3 expression by siRNA also abrogated the increase in SDH and CS activities induced by RSV (without changing the NUR activity), whereas the enzymatic activity was not modified in scrambled-transfected cells (Fig. 4C). Neither the inhibition of SIRT by EX-527 nor the transfection of cells with scrambled siRNA changed the activity of SDH and CS (data not shown). Thus, the mechanism of SDH and CS activation was closely linked to SIRT3 activity, whereas the stimulation of NUR activity by RSV was sirtuin-independent.

RSV has been reported to activate the AMPK pathway in combination with SIRT1 or SIRT3, leading to mitochondrial biogenesis. In our model, SIRT3 activation did not lead to a stimulation of AMPK pathway, as evidenced by the unchanged phospho-AMPK/total AMPK ratio between vehicle and RSV-treated HepG2 cells (Fig. 5A). Pretreatment of cells with compound C (an AMPK inhibitor) did not modify the activity of SDH or CS (data not shown). AMPK inhibition did not prevent the stimulation of NUR, CS, or SDH activities by RSV (Fig. 5B), also suggesting that AMPK was not involved in the RSV effects on the mitochondrial respiratory chain. Moreover, RSV specifically targeted mitochondrial complex I because 1 μM RSV only increased the activity of complex I (96.6 ± 8.7 nmol \cdot min \cdot mg of protein $^{-1}$ for vehicle *versus* 155.1 ± 25.1 nmol \cdot min \cdot mg of protein $^{-1}$ for RSV 1 μM) but did not significantly modify the activities of complexes III and IV (Fig. 5C). Finally, at the dose of 1 μM used here, RSV increased neither the quantity of respiratory chain complexes (Fig. 5D) nor the mitochondrial yield nor the expression of proteins involved in mitochondrial biogenesis (*i.e.* the PGC1 α co-activator and the mitochondrial transcription factor TFAM) (Fig. 5E).

The Stimulation of NUR Activity Induced by RSV Increases the Mitochondrial NAD^+ content, a Prerequisite for Stimulation of SDH and CS Activities—RSV stimulated the activities of SDH and CS by activating SIRT3. To test whether the RSV-induced increase in mitochondrial NAD^+ was involved in these effects, the NAD^+ pool was experimentally depleted using 100 μM gallotannin (Fig. 6A). Cell incubation with gallotannin effectively reduced the cellular NAD^+ concentration (Fig. 6A), whereas the cytosolic NAD^+/NADH ratio was increased (Fig. 1B), suggesting that gallotannin preferentially depleted the mitochondrial NAD^+ pool. Fig. 6B shows that this NAD^+ depletion prevented the increase in SDH and CS activities induced by RSV, emphasizing the central role of NAD^+ in SIRT3-dependent effects of RSV. We then aimed at determining if activation of TCA enzymes by a mitochondrial NAD^+ increase could be linked to RSV effect on NUR activity. For this purpose, SDH and CS activities were measured after cell incubation with a low dose of rotenone (10 nM), a NUR inhibitor (NUR activity after rotenone treatment was decreased by 49% ($p = 0.0464$), whereas SDH and CS activities were not modified

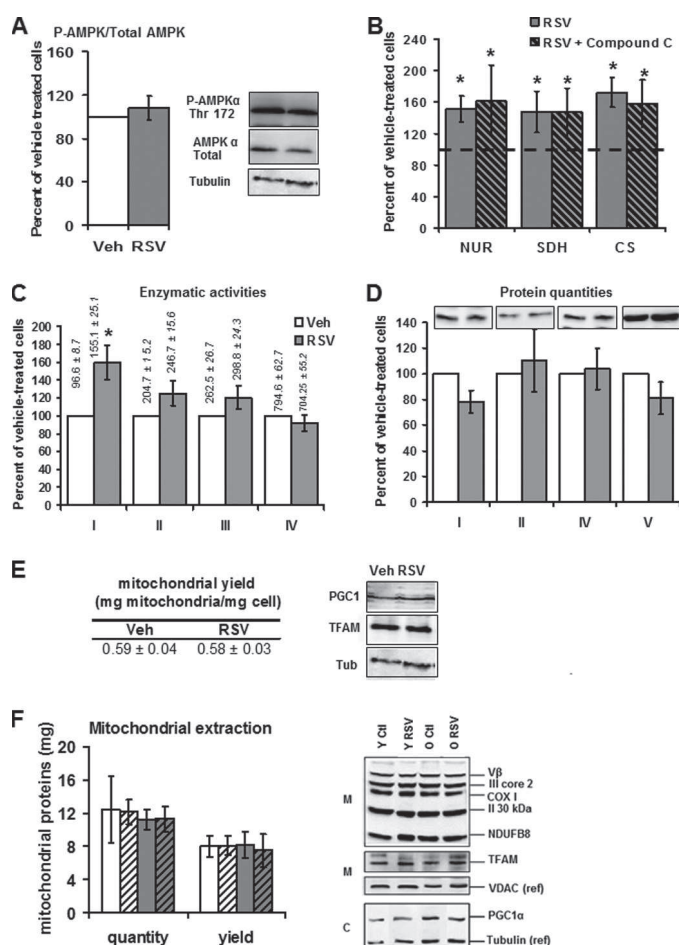


FIGURE 5. RSV treatment activates mitochondrial biogenesis pathways neither in HepG2 cells (1 μ M, 48 h) nor in mice liver (50 mg/kg/day). *A*, Western blot quantification phospho-AMPK/total AMPK ratio in HepG2 cells treated for 48 h with RSV (1 μ M). The blot on the left is a representative blot of eight experiments. *B*, effect of AMPK inhibition on RSV-induced activation of NUR, SDH, and CS activities. HepG2 cells were first treated with vehicle (ethanol, 1:5000) or compound C (10 μ M), an inhibitor of AMPK activity, and then incubated with 1 μ M RSV or vehicle (Veh; ethanol, 1:5000). Enzymatic activities of NADH ubiquinone reductase (NUR), succinate dehydrogenase (SDH), and citrate synthase (CS) were then measured on cell lysates. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and as the mean \pm S.E. of four experiments. The dotted line placed at 100% represents the vehicle value. *C–E*, mitochondrial biogenesis in HepG2 cells treated for 48 h with RSV (1 μ M). *C*, maximal activity of the complexes I, II, III, and IV ($n = 8 \pm$ S.E. (error bars)) on HepG2 cells after RSV treatment. Data represent the mean \pm S.E. of four experiments. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. ($n = 4$). The actual values of complex activities are shown on the top of the corresponding graph bar and are expressed in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *D*, Western blot analysis of one subunit of each mitochondrial respiratory chain complex after 48 h of RSV treatment: NDUFB8 (complex I), SDHB (complex II), COX2 (complex IV), and V α (Complex V). Shown are representative blots of four experiments. *E*, left, mitochondrial extraction yield in HepG2 cells treated for 48 h with RSV (1 μ M). The results presented are the ratio of mitochondrial versus cellular protein amount. Data represent the mean \pm S.E. of four experiments. Right, Western blot analysis of one PGC1 α and TFAM expression after 48 h of RSV treatment. Representative blots of four experiments. *F*, mitochondrial biogenesis in liver mitochondria of controls and RSV-treated mice. Left, mitochondrial protein amount was determined in young (Y) and old (O) mice fed on control (Ctl) and RSV-enriched (RSV) diets and expressed as a quantity of mitochondrial proteins (quantity) and normalized to the tissue weight (yield). $n = 6$ for each group; data represent the mean \pm S.E. (right) The protein expression of respiratory chain complex subunits was evaluated by Western blotting using antibodies directed against one subunit of each complex. Nuclear co-activator (PGC1 α), nuclear transcription factor NRF1, and TFAM protein expression was assessed by Western blot analysis. Loading was controlled by detection of VDAC (mitochondrial fraction; M) and tubulin (cytoplasmic fraction; C) proteins. Shown is a representative blot of four experiments.

by the rotenone treatment; not shown). Rotenone significantly decreased the cellular NAD⁺ content and prevented the increase in NAD⁺ concentration induced by RSV (Fig. 6C, left). In rotenone-treated cells, the deacetylation of SDH induced by RSV was no longer observed (Fig. 6C, right). Rotenone also prevented the RSV-induced stimulation of SDH and CS activities (Fig. 6D). Taken together, these data show that the RSV-induced increase in NAD⁺ production by complex I mediates the stimulation of TCA cycle enzyme activities by SIRT3.

High RSV Doses Display Heterogeneous Effects on NADH Dehydrogenases and No Longer Increase Mitochondrial Enzymatic Activities—Most of the studies looking at the mitochondrial effects of RSV used higher concentrations than in our work (above 10 and up to 100 μ M of RSV (18, 33–35)). To investigate if the results described in our model were still present at higher RSV concentration, we tested the effect of 50 μ M on isolated NAD⁺/NADH-dependent enzyme activities, on NUR activity, and on SDH and CS activities in HepG2 cells. At the higher dose of 50 μ M RSV, we did not see the same results on NAD⁺/NADH-dependent enzymes (Fig. 7A) compared with 1 and 5 μ M RSV (Fig. 2A). Indeed, whereas 50 μ M RSV still inhibited ADH and FDH activities, it no longer activated LDH, GDH, and FMNdh and even inhibited the latter two (Fig. 7A). Similarly, in HepG2 cells, a higher RSV dose (50 μ M) no longer significantly increased NUR, SDH, or CS activities (Fig. 7B). These results emphasize the importance of the RSV dose used in the study to obtain specific effects on mitochondrial respiratory chain.

RSV Also Stimulates Mitochondrial Metabolism in Liver Mitochondria of an RSV-fed Mouse Model—To confirm the results obtained on HepG2 cells, mice were fed during 12 weeks on an RSV-enriched diet (50 mg/kg/day). During aging, the complex I activity and the NAD⁺ content are reduced due to mitochondrial dysfunction and oxidative stress (36). Thus, two groups of mice were studied: young (6 months) and old mice (22 months). The maximal NUR activity (Fig. 8A) and respiration rate with complex I substrates (Fig. 8B) was about 60% lower in the old mice compared with the young mice ($p < 0.05$). First, the impact of RSV on NUR activity in mice was studied at different levels (Fig. 8C): on frozen, disrupted mitochondrial membranes following the addition of 1 μ M RSV (isolated NUR activity, Cx + RSV); on mitochondria of control mice incubated for 30 min with 1 μ M RSV (Mito + RSV); and in mice fed for 12 weeks with an RSV-enriched diet (Mice + RSV; RSV accumulation in liver, 1.29 μ mol/kg). We observed that RSV increased NUR activity on liver mitochondria of RSV-fed mice and on isolated mitochondria incubated with RSV but also directly on disrupted mitochondrial membranes, indicative of a direct effect of the molecule on complex I. This increase in NUR activity can be found both in young (Y) and old (O) RSV-fed mice. However, a subsequent increase in complex I-linked respiration (malate and pyruvate as substrates) was only evidenced in old RSV mice (Fig. 8D). The activity of the complexes oxidizing FADH₂, namely complex II and complex III, was also increased by RSV (Fig. 9A), in both groups (complex II), or only in the old one (complex III). The RSV diet also stimulated CS, SDH, and isocitrate dehydrogenase (TCA cycle enzymes; Fig. 9B); malate dehydrogenase and GAPDH (NADH and FADH₂ shuttles; Fig.

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

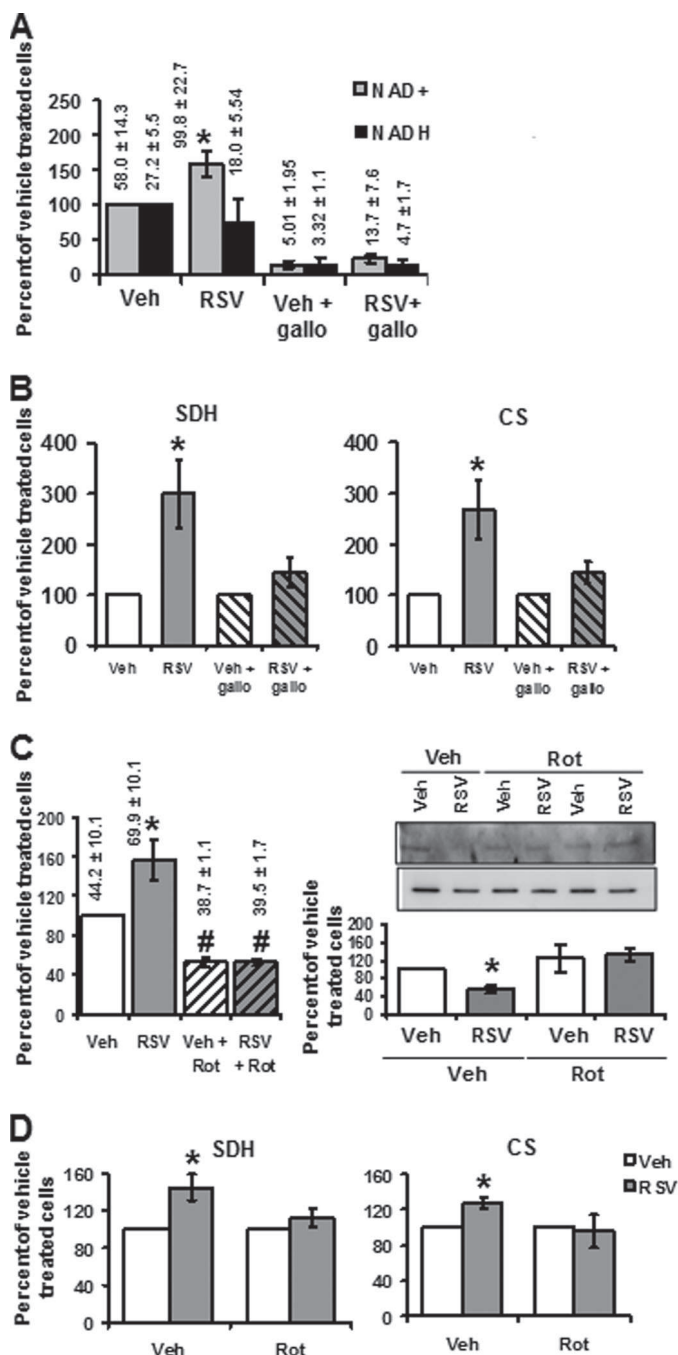


FIGURE 6. The mitochondrial NAD⁺ increase induced by RSV is responsible for SDH and CS activation. *A*, effect of gallothanin pretreatment on RSV-induced increase in the cellular level of NAD⁺. Cellular NADH and NAD⁺ levels were determined on HepG2 cells treated for 4 h with vehicle (Veh; ethanol, 1:5000), RSV (1 μ M), or gallothanin (Gallo; 1 mM). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. (error bars) of eight experiments. The actual values are shown on the top of the corresponding graph bar and are expressed in pmol·mg of protein⁻¹. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *B*, effect of NAD⁺ increase on SDH and CS activities. HepG2 cells were incubated with RSV (1 μ M) or gallothanin (1 mM) + RSV (1 μ M). Enzymatic activities of SDH and CS were measured. Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent as the mean \pm S.E. of four experiments. *C*, effect of rotenone pretreatment on RSV-induced increase in cellular NAD⁺ level and SDH acetylation status. *Left*, NAD⁺ content was determined in HepG2 cells preincubated with rotenone (10 nM) before RSV (1 μ M) or vehicle (Veh; ethanol, 1:5000) treatment. Data represent the mean \pm S.E. of four experiments and are expressed as a percentage of RSV-treated cells. The actual values of NAD⁺ content are shown on the top of the corresponding graph bar and are expressed in pmol·mg proteins⁻¹. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle; #, significant differences ($p < 0.05$) between vehicle and rotenone-treated cells. *Right*, SDH was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 h, 1 μ M) and/or with rotenone (10 nM). The graph represents the mean of the acetyl-lysine (upper panel)/SDH protein (lower panel) ratio of $n = 6$ experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *D*, effect of modulation of NAD⁺ concentration on SDH and CS activities. Enzymatic activities of SDH and CS were measured on HepG2 cells preincubated with rotenone (Rot; 10 nM) or compared with vehicle (V) before RSV treatment (1 μ M). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. of four experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

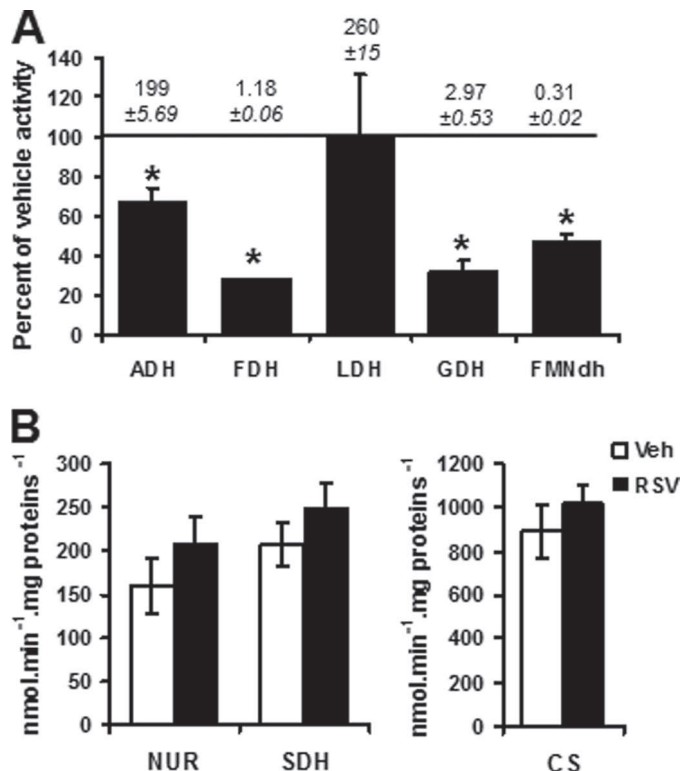


FIGURE 7. High RSV dose (50 μ M) inhibits dehydrogenase activities and does not increase the TCA cycle enzymatic activities. *A*, effect of high RSV dose on activity of isolated dehydrogenases: ADH, FDH, LDH, GDH, and FMN. Actual values of enzyme activities measured at 30 °C for FMNdH and FDH, at 37 °C for GDH and LDH, and at 25 °C for ADH are indicated at the top of the corresponding bar graph (data are expressed in μ mol·min⁻¹·mg of proteins⁻¹). *B*, effect of high RSV dose on TCA enzymatic activities. Enzymatic activities of NUR, SDH, and CS were measured on HepG2 cells (RSV, 5 or 50 μ M, 48 h). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. (error bars) ($n = 4$). *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

9C); and long-chain fatty acid dehydrogenase (FAO; Fig. 9D) activities, all key enzymes providing NADH and FADH₂ to the respiratory chain. In general, this increase was much higher in the old animals compared with the young ones (from 17% (CS; not significant) to 228% higher effect (GAPDH; $p = 0.017$) of RSV in old mice than in young ones). Oxygraphic analyses indicated a higher FADH₂ oxidation in RSV-treated groups with respect to the complex II-, palmitoyl-, or glycerol 3-phosphate-linked respirations (Fig. 9E). Similarly to the *in vitro* study on HepG2 cells, the stimulation of mitochondrial enzyme activities by RSV was not associated with greater mitochondrial biogenesis. Indeed, Western blotting did not increase subunits of the respiratory chain or factors responsible for mitochondrial biogenesis (*i.e.* PGC1 α and TFAM) (Fig. 5F).

pared with vehicle; #, significant differences ($p < 0.05$) between vehicle and rotenone-treated cells. *Right*, SDH was immunoprecipitated from HepG2 cells incubated with RSV (48 h, 1 μ M) and/or with rotenone (10 nM). The graph represents the mean of the acetyl-lysine (upper panel)/SDH protein (lower panel) ratio of $n = 6$ experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle-treated cells. *D*, effect of modulation of NAD⁺ concentration on SDH and CS activities. Enzymatic activities of SDH and CS were measured on HepG2 cells preincubated with rotenone (Rot; 10 nM) or compared with vehicle (V) before RSV treatment (1 μ M). Results are expressed as a percentage of vehicle-treated cells and represent the mean \pm S.E. of four experiments. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

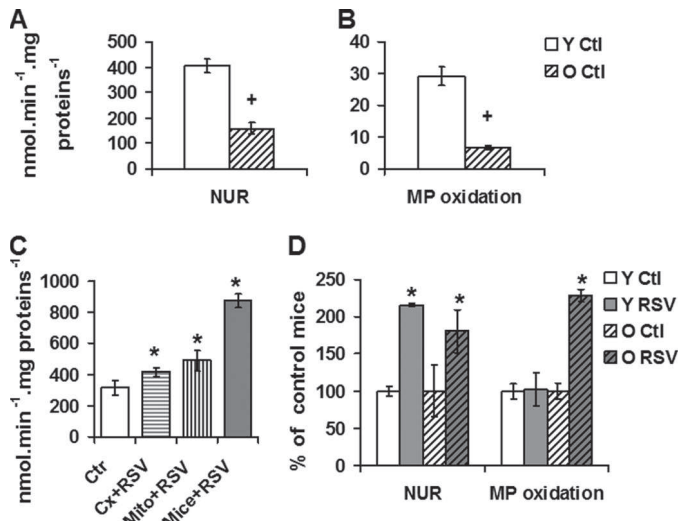


FIGURE 8. RSV induces an increase in complex I activity in liver. *A* and *B*, complex I activity and substrate oxidation by complex I measured on isolated liver mitochondria of young versus old mice. *A*, enzymatic activities of complex I (NUR). *B*, oxygraphic measurement of maximal, phosphorylating, complex I-linked respiration using malate and pyruvate (+ADP) as substrates. +, significant differences ($p < 0.05$) compared with old mice. *C* and *D*, effect of RSV on complex I properties of mice liver mitochondria. *C*, effect of RSV on NUR activity on control mitochondria. *Ctr*, isolated liver mitochondria of control young mice; *Cx + RSV*, activity of complex I measured on preparation of isolated, disrupted liver mitochondria after 1 μM RSV addition; *Mito + RSV*, activity of complex I measured on isolated intact mitochondria incubated (30 min) with 1 μM RSV; *Mice + RSV*, activity of complex I measured on isolated mitochondria from young mice with RSV diet (1.3 $\mu\text{mol/kg}$ in liver). *D*, effect of RSV diet on complex I properties in liver mitochondria of young and old mice. *Left*, NUR activity; *right*, oxygraphic measurement of maximal, phosphorylating, complex I-linked respiration using malate and pyruvate (+ADP) as substrates. Data represent the mean \pm S.E. (error bars) for each group. *, significant differences ($p < 0.05$) compared with control diet.

DISCUSSION

The crucial role played by sirtuins in the regulation of metabolism has been extensively studied over the last decade (37–41). The ability of polyphenols to activate SIRT1, and consequently to stimulate energetic metabolism, has opened up new therapeutic perspectives in various diseases involving energetic disorders (33, 37–44). However, numerous reports have challenged the hypothesis of the direct activation of SIRT1 by RSV (14, 16). Some of these recent publications describe the crucial role of the cofactor NAD^+ in sirtuin activation (18, 34, 35). However, the precise mechanism linking RSV treatment and the increase in the intracellular concentration of NAD^+ has yet to be elucidated. Mitochondria may sequester up to 70% of the NAD^+ pool, depending on the tissue considered (19), and mitochondrial redox status could therefore appear as a potential sirtuin regulator (44). However, to our knowledge, no study has yet focused on the direct effect of RSV on mitochondrial metabolism. Here, we examine the impact of RSV on mitochondrial metabolism and identify complex I as a novel direct target of RSV. We demonstrate that the activation of NADH dehydrogenases by RSV occurs *in vitro* using purified enzyme, excluding the involvement of sirtuins in this effect. We also show that complex I is a key component modulating the mitochondrial NAD^+/NADH ratio and then triggering SIRT3 activation and finally stimulating TCA enzyme activities. Several studies have presented AMPK as a signaling intermediate between RSV and

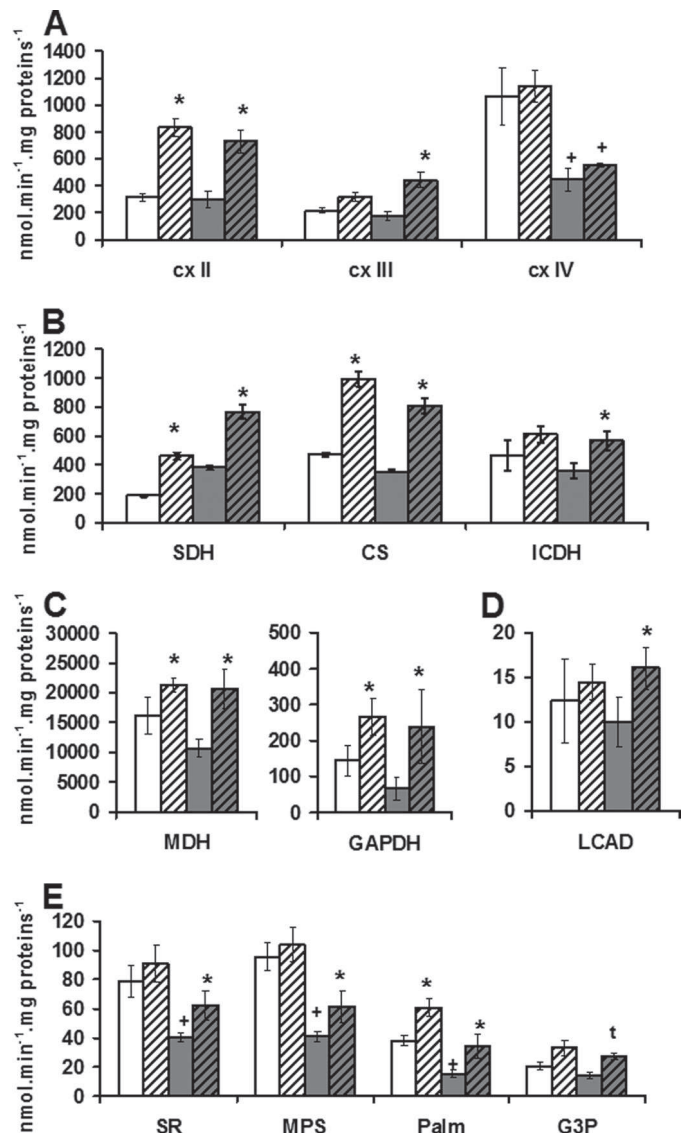


FIGURE 9. RSV induces an increase in the substrate supply in liver. *A*, maximal activities of respiratory chain complexes in controls and RSV-fed mice. Activity of complexes II (succinate ubiquinone reductase), III (ubiquinol cytochrome c reductase), and IV (cytochrome c oxidase) were measured on liver mitochondria of control (*Ctl*) and RSV-fed (*RSV*) young and old mice. *B*, maximal activities of enzymes involved in respiratory chain substrate supply pathways. Activity of Krebs cycle (SDH, CS, and isocitrate dehydrogenase (*ICDH*)), enzymes were measured on liver mitochondria of control (*Ctl*) and RSV-fed (*RSV*) mice. *C*, maximal activities of enzymes involved in GAPDH shuttle. Activities of malate dehydrogenase (*MDH*) and GAPDH were measured on liver mitochondria of control (*Ctl*) and RSV-fed (*RSV*) mice. *D*, maximal activities of enzyme involved in fatty acid oxidation. Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (*LCAD*) activity was measured on liver mitochondria of control (*Ctl*) and RSV-fed (*RSV*) mice. *E*, maximal coupled respiration in liver mitochondria. Coupled respiration measured on isolated liver mitochondria using complex I, II, or III or FAO substrates. White bars, control diet mice (*Y*); gray bars, RSV-fed groups. Shadings are used for old mice. Data represent the mean \pm S.E. (error bars) of five animals for each group. +, significant differences ($p < 0.05$) compared with old mice; *, significant differences ($p < 0.05$) compared with control diet.

the activation of SIRT1 (18, 33–35) and SIRT3 (45). In our study, effects of RSV on mitochondrial metabolism occur in the absence of mitochondrial biogenesis and are AMPK-independent at low dose (1 μM).

RSV Directly Activates Mitochondrial Complex I—Investigation of the interaction between RSV and NAD^+ metabolic

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

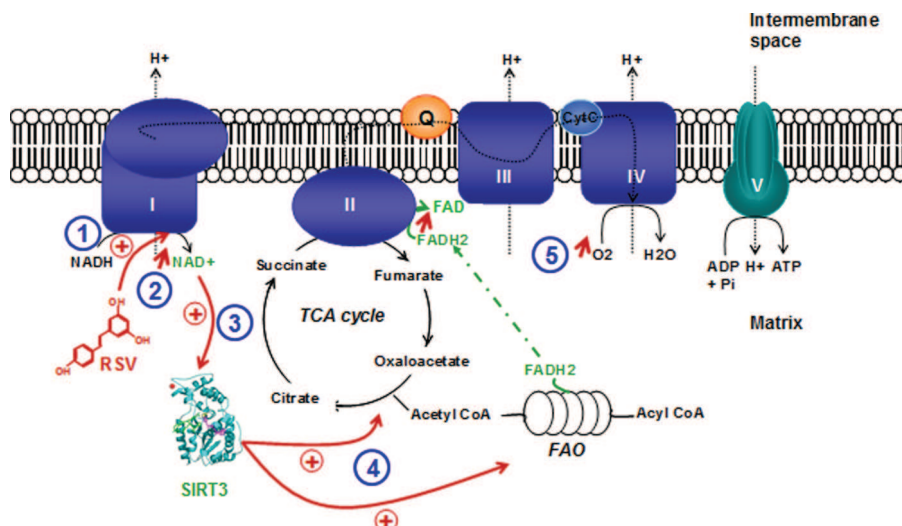


FIGURE 10. **Recapitulative scheme of the suggested resveratrol signaling pathway on mitochondrial metabolism.** RSV directly stimulates complex I activity (1), thus turning on the mitochondrial NAD⁺/NADH balance toward increasing NAD⁺ concentration (2). This favors sirtuin activation (3), which finally enhances substrates supply to respiratory chain by both tricarboxylic acid cycle and fatty acid oxidation (4). This increase in substrate supplies to the respiratory chain leads to an increase in respiration rates (5) after resveratrol treatment.

enzymes has demonstrated the competitive inhibitory effect of RSV on NAD⁺ hydrogenases (29). Mitochondria are the site of various enzymatic reactions that generate or consume NAD⁺ (including complex I of the respiratory chain). Our study shows that RSV was responsible for the direct increase of isolated NADH:FMN dehydrogenase activity and of complex I activity in mitochondrial membranes, in HepG2 cells, and in the liver mitochondria of RSV-fed mice. The RSV-induced increase in NADH-ferricyanide reductase activity was greater than the NADH ubiquinone reductase activity. This could indicate that the NADH dehydrogenase part of complex I, which binds the FMN moiety, can be the RSV target. In this study, we show that RSV can directly interact with an *in vitro* model of NADH dehydrogenase containing an FMN moiety at the catalytic center (Fig. 2, E and F). Further studies would determine if RSV can also directly interact *in vivo* with complex I of the respiratory chain (a multimeric enzyme), particularly near the FMN cofactor or at the NAD⁺ binding pocket. In our model, the stimulation of complex I activity was followed by NADH oxidation and electron transfer along the respiratory chain, leading to an increase in respiration rate in HepG2 cells and liver mitochondria of RSV-fed old mice. However, no increase in complex I-linked respiration can be evidenced in the young mice. The FMN moiety is presumed to be almost completely reduced during NADH-linked coupled respiration (46), and reoxidation of the terminal cluster N2 seems to be the rate-limiting step of the overall NADH oxidase (47). Here, electron transfer at the quinone site (NUR activity) effectively appears as a limiting factor; thus, the combined stimulation of complex I NADH dehydrogenase activity by RSV and limitation of reoxidation at the quinone-binding site would increase the reduced state of FMN (decrease FMN/FMNH₂ turnover). Fully reduced flavin (FMN) was evidenced as a significant source of superoxide (48, 49). Further studies should analyze if RSV treatment effectively favors “electron leakage” from complex I.

Stimulation of Complex I Activity by RSV Induces an Increase in NAD⁺ Level—As evidenced by the cellular NAD⁺ content, RSV treatment induces an increase in NADH oxidation on HepG2 cells. We measured cellular and cytosolic pools and NAD(P)H autofluorescence. In cells, fluorometric measurement of autofluorescence between 420 and 540 nm has been shown to detect mainly the mitochondrial NADH pool (50–53). In HepG2 cells, after 1 μM RSV treatment, the NAD(P)H autofluorescence decreases, suggesting an increase in NAD⁺. This is reinforced by the higher cellular NAD⁺ concentration found in HepG2 cells treated with RSV. A previous study demonstrated that complex I activity regulates cellular NAD⁺/NADH balance (54); a decrease in complex I activity by knock-down of the NDUFB1 subunit reduces the NAD⁺/NADH ratio, whereas a 25–30% increase in complex activity enhances by this ratio 30%. In our study, rotenone inhibition of complex I in HepG2 cells indeed induces a decrease in NAD⁺ content, whereas RSV stimulation of complex I activity by roughly 70% is paralleled by an increase in mitochondrial NADH oxidation that could trigger the increase in NAD⁺/NADH mitochondrial ratio. Pretreatment of HepG2 cells with rotenone abrogated the increase in NADH oxidation induced by RSV. Altogether, these results are consistent with a modulation of the NAD⁺/NADH ratio by complex I activity and indicate that the complex I is involved in the increase in mitochondrial NAD⁺ induced by RSV.

RSV Stimulates Mitochondrial Substrate Supply through the Activation of Sirtuins—In the HepG2 cellular model as well as in the liver mitochondria of RSV-fed mice, RSV stimulated the respiratory chain substrate supply pathways (TCA enzymes, SDH and CS activities). These results are in agreement with a recent report indicating increased citrate synthase activity and a higher fatty acid-supported respiration rate in the muscle mitochondria of obese men receiving an oral RSV supplementation (42). Interestingly, we identified that the activation of TCA cycle enzymes by RSV depends on sirtuin activity, since, in

HepG2 cells, preincubation with the EX527, a sirtuin inhibitor, prevented the activation of TCA enzymes. Moreover, a decrease in acetylation of SDH (a target of SIRT3) was observed in RSV-treated cells, underlying a stimulation of SIRT3 activity after RSV treatment. By contrast, SIRT1 activity did not appear to be modified after 1 μM RSV treatment because there was no difference in the p53 acetylation status between vehicle- and RSV-treated cells. The increase in NAD^+ level is involved in the SIRT3-dependent effects on mitochondrial metabolism that we observed with RSV treatment. Indeed, a decrease in NAD^+ synthesis induced by galloyltransferase, a potent inhibitor of the nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT1), suppressed the sirtuin-dependent effects of RSV on TCA enzyme activities. In addition, it has recently been shown that increasing the intracellular and mitochondrial NAD^+ by supplementation with the NAD^+ precursor, nicotinamide riboside, leads to the activation of both SIRT1 and SIRT3 (44).

The Sirtuin Activation Relies on the Increased NADH Oxidation by Complex I—Our study goes further by identifying the direct activation of complex I by RSV as a key mediator of the RSV-induced increase in NAD^+ content. We therefore postulate that RSV may activate the sirtuins by increasing mitochondrial NAD^+ content through the stimulation of complex I activity. This hypothesis is supported by our finding that the pretreatment of HepG2 cells by rotenone, a complex I inhibitor, prevents the RSV-induced increase in both the NAD^+ level and the TCA enzyme activities and abrogates the SDH deacetylation. It has been suggested that the control of the NAD^+/NADH ratio by complex I is at the center of the oxidative process that occurs during aging (55). During this process, mitochondrial dysfunction, responsible for a reduction of complex I activity associated with oxidative stress, leads to a reduction in NAD^+ content (36). The action of RSV on complex I activity should therefore help to maintain a high NAD^+/NADH ratio, thereby increasing sirtuin activity. Indeed, in the liver mitochondria of old mice, the effects of RSV on the enzymatic activity of TCA and FAO are more pronounced than in young mice.

The Effects of RSV Are Dose-dependent—The concentration of RSV seems to be a crucial parameter responsible for its metabolic effects. Indeed, whereas most studies focusing on the mitochondrial effects of RSV essentially report an increase in mitochondrial biogenesis, our study with RSV at low doses mainly indicates a functional increase in energetic metabolism without AMPK involvement. In our work, the effects of RSV on NUR and TCA enzymes were already seen after 4 h of exposure, a finding that does not support the hypothesis of the activation of mitochondrial biogenesis by RSV. Most of the other studies used moderate to high doses of RSV (ranging from 10 to 100 μM), and although the activation of the same key proteins (*i.e.* AMPK and SIRT1) was described (4, 33, 43, 56, 57), the signaling pathways leading to these events seem to differ according to the concentration of RSV used. In our study, contrary to the low concentrations of RSV (1–5 μM), a higher dose (50 μM) did not induce the activity of NUR, SDH, or CS anymore. Moreover, Price *et al.* (17) show that at high RSV dose (50 μM), AMPK activation was no longer coupled to the induction of SIRT1 and

that this concentration led to a sharp reduction in mitochondrial oxidative metabolism.

In conclusion, our study further characterizes the effects of RSV on mitochondrial bioenergetics and proposes an original pathway linking RSV, sirtuin activation, and the mitochondrial respiratory chain. This hypothesis is summed up in Fig. 10. Our work demonstrates that the mitochondrial NAD^+/NADH ratio is a critical factor of sirtuin activation and depends on complex I activity. Thus, the modulation of the NAD^+/NADH ratio appears to be a promising target in the prevention and treatment of metabolic diseases. Furthermore, the concentration of RSV could be a critical parameter and should therefore be taken into account in future clinical trials.

Acknowledgments—We are grateful to Marcia Haigis and Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript and to M. C. Menet for high performance liquid chromatography analysis of resveratrol. We also gratefully thank Corinne Boudier and Eric Surget for technical assistance during NAD^+/NADH measurements.

REFERENCES

- Richard, T., Pawlus, A. D., Iglesias, M. L., Pedrot, E., Waffo-Teguo, P., Merillon, J. M., and Monti, J. P. (2001) Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**, 103–108
- Petrovski, G., Gurusamy, N., and Das, D. K. (2011) Resveratrol in cardiovascular health and disease *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**, 22–33
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., and Sinclair, D. A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337–342
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* **127**, 1109–1122
- Mercader, J., Palou, A., and Bonet, M. L. (2011) Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and retinol-binding protein 4 expression in white adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 828–834
- Li, X., and Kazgan, N. (2011) Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 575–587
- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J., and Zhao, Y. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell* **23**, 607–618
- Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C. X., and Finkel, T. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14447–14452
- Cimen, H., Han, M. J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., and Koc, E. C. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* **49**, 304–311
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisilewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., and Sinclair, D. A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191–196
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Pinto, J. T., Ballabh, P., Zhang, H., Losonczy, G., Pearson, K., de Cabo, R., Pacher, P., Zhang, C., and Ungvari, Z. (2009) Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* **297**, H13–H20
- Bastin, J., Lopes-Costa, A., and Djouadi, F. (2011) Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

- acid oxidation-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2048–2057
- Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N., and Koya, D. (2011) Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes* **60**, 634–643
 - Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S. C., Atangan, L., and Wang, M. (2009) Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **74**, 619–624
 - Kaerberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A., and Kennedy, B. K. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280**, 17038–17045
 - Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrunchy, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., Thanabal, V., Varghese, A., Ward, J., Withka, J., and Ahn, K. (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **285**, 8340–8351
 - Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* **15**, 675–690
 - Park, S. J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A. L., Kim, M. K., Beaven, M. A., Burgin, A. B., Manganiello, V., and Chung, J. H. (2012) Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* **148**, 421–433
 - Di Lisa, F., and Ziegler, M. (2001) Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. *FEBS Lett.* **492**, 4–8
 - Menet, M. C., Cottart, C. H., Taghi, M., Nivet-Antoine, V., Dargère, D., Vibert, F., Laprèvote, O., and Beaudoux, J. L. (2013) Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight analysis for the identification and the determination of resveratrol and its metabolites in mouse plasma. *Anal. Chim. Acta* **761**, 128–136
 - Williamson, D. H., Lund, P., and Krebs, H. A. (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.* **103**, 514–527
 - Sun, F., Dai, C., Xie, J., and Hu, X. (2012) Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio. *PLoS One* **7**, e34525
 - Duchen, M. R., and Biscoe, T. J. (1992) Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J. Physiol.* **450**, 13–31
 - Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiret, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Martinou, J. C., and Reynier, P. (2011) Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB J.* **25**, 1618–1627
 - Flamment, M., Gueguen, N., Wetterwald, C., Simard, G., Malthièry, Y., and Ducluzeau, P. H. (2009) Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E1162–E1170
 - Goncalves, S., Paupe, V., Dassa, E. P., Brière, J. J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A. P., Bénit, P., and Rustin, P. (2010) Rapid determination of tricarboxylic acid cycle enzyme activities in biological samples. *BMC Biochem.* **11**, 5
 - Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J. P., and Lombès, A. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* **9**, 331–339
 - Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* **228**, 35–51
 - Kitson, T. M., Kitson, K. E., and Moore, S. A. (2001) Interaction of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase with quercetin, resveratrol and diethylstilbestrol. *Chem. Biol. Interact.* **130**, 57–69
 - Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M. G., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Santarsiero, B. D., and Mesecar, A. D. (2010) Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* **429**, 273–282
 - López-Nicolás, J. M., and García-Carmona, F. (2008) Aggregation state and pK_a values of (*E*)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7600–7605
 - Jiang, Y. G., Peng, T., Luo, Y., Li, M. C., and Lin, Y. H. (2008) Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione. *Chin. Med. J.* **121**, 1204–1209
 - Canto, C., and Auwerx, J. (2009) PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 98–105
 - Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060
 - Cantó, C., and Auwerx, J. (2012) Targeting sirtuin 1 to improve metabolism. All you need is NAD⁺? *Pharmacol. Rev.* **64**, 166–187
 - Braidy, N., Guillemin, G. J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., and Grant, R. (2011) Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in Wistar rats. *PLoS One* **6**, e19194
 - Bao, J., and Sack, M. N. (2010) Protein deacetylation by sirtuins. Delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 3073–3087
 - Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S. H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* **26**, 1913–1923
 - Rodgers, J. T., and Puigserver, P. (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12861–12866
 - Schenk, S., McCurdy, C. E., Philp, A., Chen, M. Z., Holliday, M. J., Bandyopadhyay, G. K., Osborn, O., Baar, K., and Olefsky, J. M. (2011) Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *J. Clin. Invest.* **121**, 4281–4288
 - Ungvari, Z., Sonntag, W. E., de Cabo, R., Baur, J. A., and Csiszar, A. (2011) Mitochondrial protection by resveratrol. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **39**, 128–132
 - Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. K., Kunz, I., Schrauwen-Hinderling, V. B., Blaak, E. E., Auwerx, J., and Schrauwen, P. (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* **14**, 612–622
 - Um, J. H., Park, S. J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M. W., Kim, M. K., Viollet, B., and Chung, J. H. (2010) AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* **59**, 554–563
 - Cantó, C., Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Youn, D. Y., Oosterveer, M. H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P. J., Yamamoto, H., Andreux, P. A., Cettour-Rose, P., Gademann, K., Rinsch, C., Schoonjans, K., Sauve, A. A., and Auwerx, J. (2012) The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* **15**, 838–847
 - Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., Ward, J. L., 3rd, Goodyear, L. J., and Tong, Q. (2009) Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle. *Aging* **1**, 771–783
 - Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P. C. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **263**, 17566–17575
 - Vinogradov, A. D. (2008) NADH/NAD⁺ interaction with NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 729–734
 - Kudin, A. P., Malinska, D., and Kunz, W. S. (2008) Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 689–695
 - Galkin, A., and Brandt, U. (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **280**, 30129–30135
 - Mayevsky, A., and Rogatsky, G. G. (2007) Mitochondrial function *in vivo*

Resveratrol Directly Stimulates NADH Oxidation by Complex I

- evaluated by NADH fluorescence. From animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C615–C640
51. Eng, J., Lynch, R. M., and Balaban, R. S. (1989) Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophys. J.* **55**, 621–630
52. Minezaki, K. K., Suleiman, M. S., and Chapman, R. A. (1994) Changes in mitochondrial function induced in isolated guinea-pig ventricular myocytes by calcium overload. *J. Physiol.* **476**, 459–471
53. Duchen, M. R., and Biscoe, T. J. (1992) Relative mitochondrial membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *J. Physiol.* **450**, 33–61
54. Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., Yagi, T., and Felding-Habermann, B. (2013) Mitochondrial complex I activity and NAD^+ /NADH balance regulate breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **123**, 1068–1081
55. Stefanatos, R., and Sanz, A. (2011) Mitochondrial complex I. A central regulator of the aging process. *Cell Cycle* **10**, 1528–1532
56. Dasgupta, B., and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7217–7222
57. Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Cohen, R. A., and Zang, M. (2008) SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **283**, 20015–20026

Resveratrol binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice

Naïg Gueguen^{1,2,3*}, Valérie Desquirit-Dumas^{1,2,3*}, Géraldine Leman^{1,3*}, Stéphanie Chupin^{1,2,3}, Stéphanie Baron⁴, Valérie Nivet-Antoine⁴, Emilie Vessières^{1,3}, Audrey Ayer^{1,3}, Daniel Henrion^{1,3}, Pascal Reynier^{1,2,3}, Vincent Procaccio^{1,2,3}.

* Authors contributing equally to the work

¹ Université d'Angers, Angers, F-49000, France

² Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, F-49000, France

³ UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, F-49000, France

⁴ EA 4466, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris F-75270, France

To whom correspondence should be addressed: Naïg Gueguen, Ph.D., Département de Biochimie et Génétique, CHU Angers. 4 rue Larrey, 49033 Angers, France. Phone : +33 2 41 35 77 04. Fax: +33 2 41 35 58 83. Email NaGueguen@chu-angers.fr

Abstract:

Resveratrol (RSV) is often described as a promising therapeutic molecule for numerous diseases but its molecular targets and its intracellular mechanism of action remain debated. A growing number of studies indicate that RSV interacts with the mitochondrial respiratory chain, and report opposite effects that depend on its concentration. In this study, we identified a direct interaction of RSV at the NAD⁺ binding site of complex I. This interaction results in a biphasic dose-response, inducing up to 5 μ M an increase, followed at 50 μ M by a reduction of complex I activity. This interaction is responsible for reactive oxygen species overproduction, triggering oxidative stress mainly in mitochondria with low antioxidant defences, as seen in brain mitochondria from aged mice. These results bring new insights into the mechanism of action of RSV and highlight the importance of the balance between pro- and antioxidant effects of RSV, depending on the dose and the age at the time of the treatment.

Highlights:

- RSV directly interacts with the NAD⁺ binding site of complex I

- In mitochondria, RSV can accept electrons from complex I increasing ROS production
- In brain mitochondria of aged animals, RSV generates oxidative stress
- Effects of RSV depend on its oxidation state and on the cell defences levels

Keywords: Complex I, resveratrol, oxidative stress, NADH dehydrogenase, NAD⁺

Abbreviations

Cu/Zn superoxide dismutase, Cu,ZnSOD; Cytochrome c, Cyt c; Diphenyleneiodonium, DPI; Potassium hexacyanoferrate(III), FeCN; Hexaammineruthenium(III) chloride, HAR; Horseradish peroxidase, HRP; Manganese Superoxide Dismutase, MnSOD; Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD⁺; Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate, NADH; NADH:(Decyl)Ubiquinone Reductase, NUR; Reactive Oxygen Species, ROS; Trans-resveratrol, RSV;.

INTRODUCTION

Resveratrol (RSV), a redox-active polyphenol found in various plants, has a wide range of biological properties, including anticancer, anti-inflammatory, cardio- and neuroprotective effects. Its potential beneficial effects on health have been mainly attributed to the antioxidant properties [1-3] and interactions with the sirtuins [4].

Mitochondria are also the main targets of RSV. Indeed, RSV modulates ROS production, energetic metabolism and mitochondrial biogenesis [5, 6] in particular via its interaction with sirtuins, NAD⁺ dependent- deacetylases [7, 8]. Mitochondrial SIRT3 is described as a main effector of these post-translational modifications, targeting more than a quarter of putative mitochondrial acetylation sites [9]. These acetylations are then responsible for functional changes in mitochondrial substrate supply pathways (tricarboxylic acids cycle, TCA, and fatty acid oxidation, FAO and urea cycle [10-13]) and in mitochondrial energetic metabolism such as complexes I [14-16], II [17, 18] or V [15]. Conversely, RSV can directly interact with respiratory chain complexes. Indeed, Zini et al. [19] have shown that RSV inhibited the F1-ATPase activity in brain tissue, even at very low concentrations (1 nM). Complex I was also recently identified as a direct target of RSV [20], thereby regulating the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio, a crucial parameter for the downstream sirtuin

activation and the induction of metabolic effects of RSV [21]. The direct interaction of RSV was described to either increase [21] or inhibit complex I activity [20], which may depend on the RSV dose used (from 1 to 50 μ M).

Complex I plays a crucial role in maintaining mitochondrial homeostasis. Indeed, it participates to the regulation of the NAD⁺/NADH ratio and to the energetic metabolism and reactive oxygen species (ROS) production [22]. The recent crystallization of the complex I structure [23] has enabled a better comprehension of the molecular mechanisms involved in the different activities of complex I. In this context, a precise characterization of the mechanism of RSV interaction with complex I [20, 21] will allow a better understanding of mitochondrial effects of RSV.

In this study, we highlight a direct, competitive binding of RSV at the NAD⁺ fixation site on the FMN moiety of complex I resulting in ROS overproduction. We also further describe the functional consequences of such interaction on mitochondrial respiratory chain and ROS production in brain mitochondria, a tissue highly sensitive to oxidative stress especially in aged mice. Our study shows that the RSV/FMN interaction leads to an oxidative stress especially in tissue from aged animals with physiologically low antioxidant defences. Thus, despite its well recognized antioxidant properties, RSV may act as a prooxidant, triggering oxidative damages. Moreover, the dose of RSV and the age at the time of the treatment appear as crucial parameters that must be taken into account when studying the cellular effects of RSV.

MATERIALS AND METHODS

Materials.

Trans-resveratrol (RSV), Diphenyleneiodonium (DPI), potassium hexacyanoferrate(III) (ferricyanide, FeCN), and hexaammineruthenium(III) chloride (HAR) were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). NAD⁺ and NADH (grade II) were from Roche Applied Sciences (Lyon, France). Stock solutions of Trans-Resveratrol were reconstituted at 50 mM in DMSO and stored at -20°C protected from light.

Animals

Male C57BL/6J strain mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a room at 24 \pm 2°C with a 12h/12h light-dark cycle, with diet and water *ad libitum*. Two groups were used: young (Y) (6 months), and old mice (O) (22 months). Twelve

weeks before euthanasia, half of each group received a standard diet (M20 croquettes, (SDS®, Y Ctl and O Ctl groups), and the other half a diet of M20 croquettes supplemented with 0.04% trans-resveratrol (Yvery®, Y RSV and O RSV groups). After 12 weeks of RSV diet, mice were anesthetized with isoflurane, before decapitation and dissection of the cerebral cortex, in accordance with European Community guidelines (directive 86/609/CEE), and the Ethical committee of University of Paris-Descartes (CEEA34.SB.008.12). RSV accumulation in brain was checked according to Menet et al. [24]; the concentration of RSV and its derivatives was 1.42 ± 0.10 and $8.72 \pm 3.47 \mu\text{mol/kg}$ in Y and O RSV mice, respectively (undetectable in control groups).

UV-Visible spectroscopy.

The UV-vis absorption spectra of RSV in the presence and absence of enzymes were recorded on a SAFAS UV-mc2 spectrophotometer (SAFAS Ltd., Monaco) equipped with 1.0 cm quartz cells with a slit of 2 nm and scan speed of $200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. The absorbance assessments were performed at specified pH in KH_2PO_4 100 mM buffer, 25°C . Each spectrum is a mean of three scans.

The quality of trans-resveratrol was checked before used by analyzing the absorption spectrum in KH_2PO_4 solution at pH 7.2 (Fig SI 1A). Trans-RSV spectrum shows a single absorption band with maxima centered between 304 and 310 nm (Lopez-Nicolas and Garcia-Carmona, 2008). The oxidation of RSV using the Horse Radish Peroxidase (HRP)/ H_2O_2 system was also checked by UV/vis spectroscopy. RSV incubated with $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ of HRP and 0.01 mM H_2O_2 undergoes a small shift toward the highest maximal wavelength and a decrease in absorbance (Fig SI 1A). Two isobestic points at 270 nm and around 330-340 nm can be observed. This profile was previously described as representative of the deprotonated 4'-hydroxyl group state [25].

Mitochondria isolation and complex I solubilisation

Mitochondria from mouse brain were isolated as described [26]. The entire operation was performed at 4°C and completed in less than an hour. Isolated mitochondria from bovine heart were obtained from Mitosciences (Abcam, Paris, France). Solubilized complexes were prepared using n-dodecyl- β -D-maltoside according to [27].

Mitochondrial enzymatic activities.

The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes were measured at 37°C on a UV m^2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco). Activity of the NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinol cytochrome C reductase (complex III), cytochrome C oxidase (complex IV) and citrate synthase (CS) were measured according to the method described by Medja *et al.* [28, 29]. NADH ubiquinone reductase activity was assayed in KH_2PO_4 buffer (50mM, pH 7.5), containing fatty acid-free BSA (3.75 mg/ml), 0.1mM decylubiquinone and 0.10 mM NADH were added to initiate the reaction. Parallel measurements in presence of Rotenone (5 μM) were used to determine the background rate. NADH:FeCN and NADH:HAR reductase activities were assayed in 20 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.5), with substrate and acceptor concentrations as previously described [30]. Background rates (without complex I) were controlled for each experiment and each RSV concentration. NADH:FeCN, NADH:HAR and NADH:Decylubiquinone oxidoreductions were monitored at 340 nm ($\epsilon=6.22\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). O_2 reduction was detected using a Clark electrode (Oroboros, Innsbruck, Austria) [31] in the presence of inhibitors of complexes III and IV (myxothiazol 1 μM and KCN 1 mM, respectively).

Mitochondrial respiration rates

Oxygen consumption was measured in Respiratory Buffer RB (225 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 , 1 mg/ml fatty acid-free BSA, pH7.4) at 37°C using a high-resolution oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria) on isolated brain mitochondria, (0.05 mg/ml) as described elsewhere [26, 32], using substrates of complexes I, I+III, II, IV and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) shuttle: complex I substrates: 5 mM malate and 2.5 mM pyruvate; complex I and II substrates: 5 mM malate, 2.5 mM pyruvate and 5 mM succinate; complex II substrate: 10 mM succinate supplemented with 10 μM rotenone; complex IV substrate: 5 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine reduced with 50 mM ascorbate. 20 mM glycerol-3-phosphate (G3P) was used to activate GAPDH shuttle. The active state of respiration (coupled-respiration) was initiated by the addition of a saturating ADP concentration (0.5 mM). Cytochrome c (Cyt c) was added (8 μM) to check the integrity of outer mitochondrial membranes.

The direct impact of RSV or of oxidative stress on mitochondrial functionality was analyzed on isolated brain mitochondria incubated during 30 min. (1 mg in 0.2 ml buffer RB) with either DMSO (vehicle, final concentration 1/2000), RSV (100 nM), H₂O₂ (10 nM, exogenous stress) or succinate without rotenone (10 mM, endogenous stress linked to reverse electron flow from complex II to complex I [33]).

Docking simulation

Docking calculations were carried out using DockingServer [34]. The MMFF94 force field was used for energy minimization of trans-resveratrol (ligand molecule) using DockingServer. Gasteiger partial charges were added to the ligand atoms. Docking calculations were carried out on Thermus thermophilus model of the N module of complex I (subunits Nqo1, Nqo2, Nqo3) in both oxidized or reduced crystal structure (PDB ID: 4HEA for oxidized structure and 3IAM for reduced one respectively). Essential hydrogen atoms, Kollman united atom type charges, and solvation parameters were added with the aid of AutoDock tools [34]. Affinity (grid) maps of 25×25×50 Å grid points and 0.375 Å spacing were generated using the Autogrid program (Bikadi, Z., and Hazai, E., 2009). AutoDock parameter set- and distance-dependent dielectric functions were used in the calculation of the van der Waals and the electrostatic terms, respectively. Docking simulations were performed using the Lamarckian genetic algorithm (LGA) and the Solis & Wets local search method [35]. Initial position, orientation and torsions of the ligand molecules were set randomly. Each docking experiment was derived from 100 different runs that were set to terminate after a maximum of 2500000 energy evaluations. The population size was set to 150. During the search, a translational step of 0.2 Å and quaternion and torsion steps of 5 were applied.

Western Blotting

SDS-PAGE electrophoresis and transfer to PVDF membrane were performed as described in [36]. Mouse anti-SOD2 (Mitochondrial matrix MnSOD, Abcam, Paris, France), Rabbit anti-SOD1 (Cu,ZnSOD, Abcam) and mouse anti-N(epsilon)-(hexanoyl)lysine (HEL, Cosmobio, Tokyo, Japan) antibodies were used for antioxidant enzymes and oxidation product detection, respectively.

Protein-SH content

Protein-SH content was measured on proteins from post-nuclear supernatant (50 μ g) using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB) as described in [37], and the amount of protein-SH was calculated using reduced glutathione as standard (ϵ 412nm=13.6 mM⁻¹·cm⁻¹).

Statistical analysis

Statistical comparisons between Ctl and RSV mice were made with the Mann–Whitney *U* test. The Wilcoxon test was used for the analysis of paired data. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

RSV increases complex I activity in brain mitochondria of RSV fed mice

The effect of RSV on respiratory chain function was first detailed *in vivo*, on brain mitochondria from young (Y) and old (O) mice (Fig 1) receiving a RSV-enriched diet. Old mice were used due to their higher susceptibility to oxidative stress (respiratory chain dysfunction and decreased anti-oxidant capacities, [38]). In brain mitochondria from aged mice, we did not observe any significant decrease in the ratio between maximal complexes activities and citrate synthase activities. However, the raw citrate synthase and complex IV, I and III activities were similarly reduced by roughly 25% in aged mice compared with the young animals (data not shown) which could explained that the complex/CS ratio was not different between both groups. The decrease in complex activities was in accordance with previous studies in brain mitochondria during aging [39-41]. RSV diet induced a significant increase in complex I activity in young mice and tended to increase complex I in old and complex II in young mice ($p=0.05$ and $p=0.06$ respectively). This result reinforced the previous observations that complex I activity was regulated by RSV in brain and liver mitochondria [20, 21]. Although described in several studies [20, 21, 42], the precise binding site of RSV on mitochondrial complex I is not yet identified.

Complex I is a direct target of RSV

To further characterize the effect of RSV on Complex I activity, RSV was added to frozen-thawed disrupted brain mitochondria from Young Control animals just prior enzymatic measurements. The results presented Fig 2 showed that 5 μ M RSV

FIGURE 1

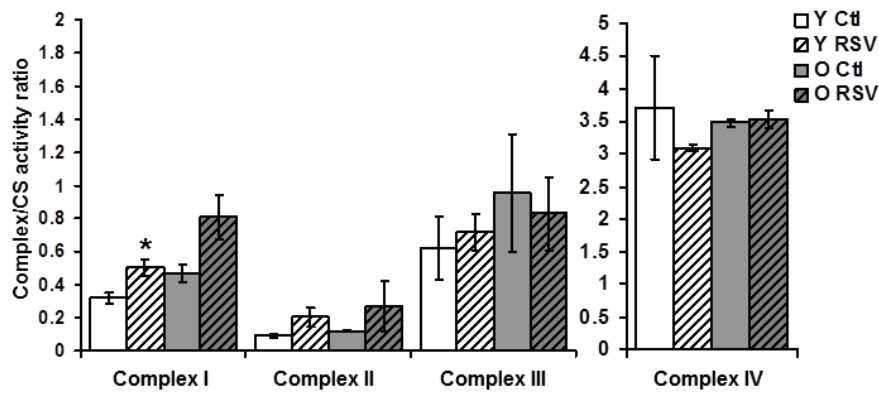


Figure 1: *In vivo*, complex I activity is increased in brain mitochondria of RSV fed mice. Maximal enzymatic activities of Complex I, II, III and IV were measured on isolated brain mitochondria from young (Y) and old (O) control (Ctl) and RSV-fed mice. Results are normalised to citrate synthase activity and represented as mean \pm *sem* of n=5 animals in duplicate. The (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between Ctl and RSV fed mice.

significantly increased complex I activity (+65%) as observed in RSV fed mice (Fig 1) thereby suggesting a direct interaction between RSV and complex I. This observation is in agreement with our previous results in liver mitochondria [21].

A higher RSV concentration (50 μM) no longer increased complex I activity but rather inhibited the activity of complex III. It should be noticed that this decrease in specific complex III activity was related to an higher antimycin-insensitive activity in RSV incubated brain mitochondria (data not shown). This suggested a non-specific interaction between RSV and the oxidized form of cytochrome c (cyt c) when RSV was used at a high dose (50 μM). Inhibitory effect of RSV on mitochondrial complex III has already been described [19, 42]. The different effects of both RSV concentrations used in our study (5 and 50 μM) shed light on the importance of the RSV doses used on the different studies for future clinical trials.

RSV binds to complex I at the nucleotide binding site

To further analyze the direct effect of RSV on complex I, solubilized mitochondrial complexes from bovine heart mitochondria were used (Fig 3). First, complexes were incubated with 5 nM to 50 μM RSV, and the full complex I activity, i.e. NADH Ubiquinone Reductase reaction (NUR, Fig 3A1) was measured. At low doses, RSV dose-dependently stimulated the NUR reaction with the maximal effect at 5 μM (+35%, $p < 0.05$, Fig 3A1). Then NUR activity progressively decreased and, at 50 μM , RSV weakly inhibited the NUR reaction compared to vehicle condition (RSV vs Veh: -15%, $p < 0.05$, Fig 3A1). The NUR reaction implies NADH oxidation at the flavin mononucleotide (FMN) site, followed by FMN re-oxidation by the FeS clusters and subsequent electron transfer to the quinone. Alternatively, the reduced FMN can be directly reoxidized by artificial electron acceptors including HAR (Fig 3A2) or FeCN (Fig 3C1). Both comprise NADH oxidation by the flavin, but not the rate-limiting iron-sulfur transfer of electrons to the ubiquinone. As described above for the NUR reaction, the HAR reaction (fig 3A2) was stimulated by low RSV concentration, up to 5 μM (+33%, $p < 0.01$), but significantly inhibited at higher doses (-30% at 50 μM RSV, $p < 0.05$). The HAR reaction is catalyzed by the flavoprotein module of complex I and does not imply FeS cluster chain or quinone reduction, thus RSV may act on this subcomplex.

Therefore, the binding of RSV on the flavoprotein part of complex was further analyzed by molecular docking using *T. thermophilus* complex I structure (PDB ID:

FIGURE 2

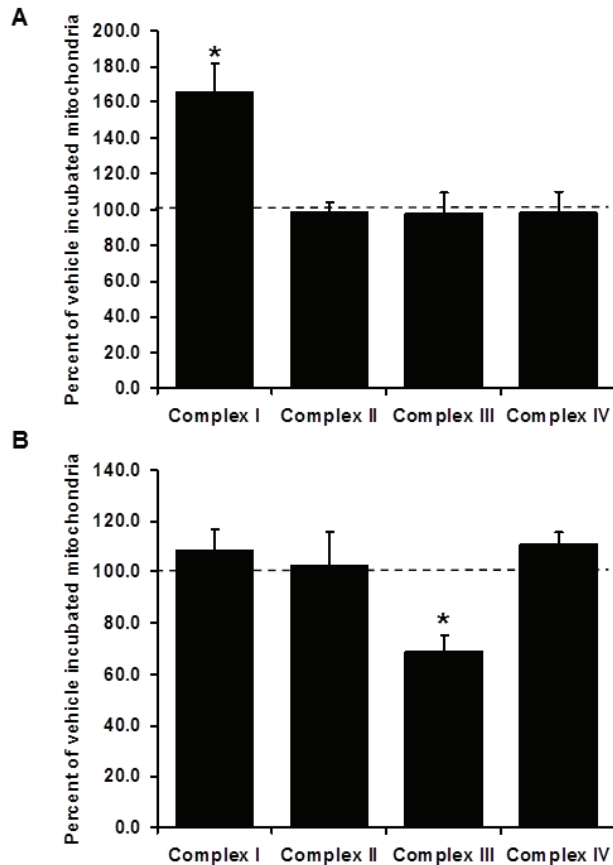


Figure 2: *In vitro*, RSV directly targeted Complex I activity in disrupted brain mitochondria. (A) Maximal activity of complexes in mitochondria incubated with 5 μ M RSV. Control young mice brain mitochondria disrupted by frozen/thawed cycle were incubated in respiratory buffer with either vehicle (DMSO 1/2000) or RSV (5 μ M) just prior analysing NADH ubiquinone Reductase (complex I), succinate ubiquinone reductase (complex II), ubiquinone cytochrome c reductase (complex III) and cytochrome c oxidase (complex IV) activity. **(B) Maximal activity of complexes in mitochondria incubated with 50 μ M RSV.** Control young mice brain mitochondria disrupted by frozen/thawed cycle were incubated in respiratory buffer with either vehicle (DMSO 1/2000) or RSV (50 μ M) just prior analysing complex I, complex II, complex III and complex IV activity. Data are expressed as the percentage of complex activity in vehicle treated mitochondria and are represented as mean \pm *sem* of n=5 animals in duplicate. The (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between vehicle and RSV treated mitochondria.

3IAM, subunits Nqo1, Nqo2 and Nqo3). Docked poses of RSV revealed its interactions at the FMN/nucleotide binding site (Fig 3B1). The obtained binding pattern of RSV indicated that hydrophobic / aromatic interactions with Phe78 and Phe205 were involved and that hydrogen bond(s) with Glu185 in the active site pocket were formed (Fig 3B2). We compared the crystallographic position of NADH from the X-ray structure [23] to RSV poses obtained by docking (Fig 3B2). The adenine ring of NADH/NAD⁺ is stabilized by stacking interactions with the aromatic rings of three conserved phenylalanines, i.e. Phe70, 78, and 205. The carboxyl group of conserved Glu185 interacts with the ribose of the molecule [23]. Altogether, these results argued for a direct binding of RSV at the nucleotide binding site of complex I. To further test the results of docking, the FeCN reaction was measured (Fig 3C1). While HAR reduces FMN bound to a nucleotide, FeCN only reacts with the free flavin [43]. The distribution of flavin in empty and occupied states is defined by the nucleotide concentrations and the distribution of oxidized and reduced states is set by the NADH/NAD⁺ ratio [44, 45]. In absence of NAD⁺, and optimal substrate concentration (i.e. 30 μ M NADH, [46]), RSV did not significantly increase the FeCN reaction (1 μ M RSV: $p=0.0947$, Fig 3C1). It should be noticed that the effect of high RSV doses (25 to 50 μ M RSV) could not be investigated due to a strong interaction between FeCN and RSV at doses higher than 10 μ M [46], leading to a direct stimulation of the NADH oxidation in absence of any enzymes (not shown). Then, the FeCN reaction was measured with or without prior incubation with 5 μ M RSV while increasing the NADH/NAD⁺ ratio (Fig 3 C2). NAD⁺ effectively inhibited the NADH:FeCN reaction, with an IC₅₀ of roughly 1.5 mM. This inhibition of the NADH:FeCN oxidoreduction by NAD⁺ was delayed in the presence of 5 μ M RSV, with the IC₅₀ value for NAD⁺ rising from 1.58 to 4.92 mM. This effect of RSV appeared to be competitive, since it was abolished at the higher NAD⁺ concentrations (>10 mM). Because RSV only interacted with the Phe78, Phe205 and Glu185, it may bind without occluding the flavin site for FeCN. Phe78, Phe205 stack the adenine ring and Glu185, the ribose of NAD⁺. While NADH is also stabilized by its nicotinamide head group, it was shown to have no effect or to be detrimental to NAD⁺ binding affinity [47]. Based on these results, our study suggest that RSV should not be able to prevent NADH fixation on its binding site but rather may compete with NAD⁺ binding to the flavin reactive site of complex I. Altogether, these

FIGURE 3

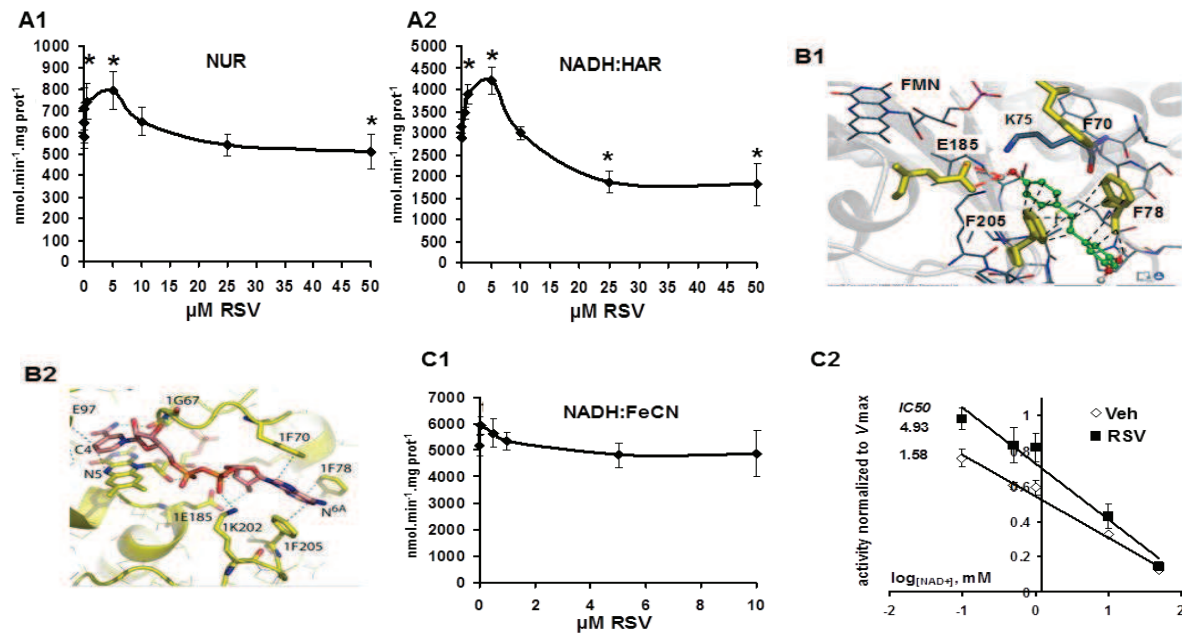


Figure 3: RSV binds to complex I at the nucleotide binding site. (A) Effect of trans-resveratrol (RSV) on the NUR and HAR enzymatic reactions catalyzed by complex I. The rates of (A1) NADH:Ubiquinone oxidoreduction (the NUR reaction) or (A2) NADH:HAR oxidoreduction (the HAR reaction) were measured in the presence of increasing RSV concentration (5 nM to 50 μM). Conditions were: pH 7.2, 37 °C, 0.1 mM NADH as substrates and 0.1 mM decylubiquinone (A1) or 3.5 mM HAR (A2) as acceptors. Reactions were started by the addition of NADH. Data are represented as mean ± *sem* of six independent experiments. The (*) indicates significant differences (p < 0.05) compared with vehicle. **(B) Occlusion of the flavin site through the binding of NAD(H) or RSV.** (B1) RSV bound to active, FMN site in complex I from *Thermus thermophilus* (Protein Data Bank ID: 3IAM). The flavin and bound nucleotide are shown as sticks. Trans-resveratrol is colored in green. Amino acids that interact with the bound nucleotide are colored yellow, with hydrogen bonding interactions shown by dashed red lines, hydrophobic stacking interactions by dashed dark lines. (B2) The flavin and bound NADH are shown from the same viewpoint. The bound NADH molecule is colored in pink. The flavin and amino acids that interact with the bound nucleotide are colored in yellow. The hydrophobic stacking interactions between the three phenylalanines and the adenosine moiety are represented by dashed gray lines. **(C) Effect of RSV on the FeCN reaction and competition with NAD⁺.** (C1) The rate of the NADH:FeCN reaction was measured in the presence of increasing RSV concentrations (50 nM to 10 μM). (C2) The rate of the FeCN reaction was measured in presence of either DMSO (vehicle) or 5 μM RSV and increasing NAD⁺ concentrations (0.1–50 mM). IC₅₀ values for the inhibition of FeCN reaction by NAD⁺ were calculated from the curves normalized to maximal oxidation rates. Conditions were: pH 7.2, 37 °C, 0.03 mM NADH as substrates and 1 mM FeCN as acceptors. Reactions were started by NADH addition. Data are represented as mean ± *sem* of six independent experiments. The (*) indicates significant differences (p < 0.05) compared with vehicle.

results argue for a binding of RSV at the flavoprotein site of the complex I, at/near the nucleotide binding site.

At mitochondrial matrix pH, RSV directly increases NADH oxidation leading to ROS overproduction

A number of compounds have been reported to undergo redox cycling reactions at complex I [48]. Thus, we further tested if RSV can be reduced by the flavin (NADH:O₂ reaction, i.e. in the absence of any electron acceptor). At pH 7.2, 5 μM RSV did not stimulate the NADH oxidation reaction (Fig SI 1B). However, the mitochondrial matrix pH is more alkaline than the cytosolic one (8.0 vs 7.2) [49]. Thus, the measurement of NADH:O₂ reaction was carried out in the presence of RSV preincubated at pH 8.0. In this case, NADH oxidation was 1.6 fold higher in the presence of RSV compared to DMSO (Fig 4A). To control this result, the O₂ reduction, with NADH as substrate, was also directly followed using a Clark-type electrode. The O₂ reduction was stimulated by 5 μM RSV (Fig 4B), indicating an increase in superoxide production after RSV incubation.

Previous studies have indicated that the protonation state of the different hydroxyl groups of RSV affects its biological activity [50], this protonation state depending on the pH in aqueous solution [51] with acidic dissociation constants (pKa) of 8.8, 9.8 and 11.4 for the groups in the 4', 3 and 5 position, respectively [25, 52]. Thus, the molecule that activated the NADH:O₂ reaction in mitochondria could be the deprotonated 4'-hydroxyl group state. Indeed, RSV enzymatically oxidized (RSVox) to hydroxyl radicals by HRP, known to oxidize the hydroxyl group of the phenoxyl ring of RSV [53], also increased NADH oxidation by complex I (Fig SI 1B). Moreover, the absorption spectrum of RSV incubated for 30 minutes at pH 8.0 also showed a drop in absorbance and a shift toward the higher maximum (310 nm), as did oxidized RSV (Fig SI 1A).

Our results indicated that the reduced form of RSV stimulated NUR and NADH:HAR activities at low doses (inhibiting it at high ones), but did not seem to increase the NADH:O₂ reaction. By contrast, RSVox can be a direct electron acceptor from NADH oxidation and appears to be able to increase the ROS production in an *in vitro* complex I model. Due to differential pH conditions and / or peroxidase activity within mitochondria, the active form of RSV could differ between the cytoplasmic and mitochondrial compartments, and could exert different action according to protonation states.

FIGURE 4

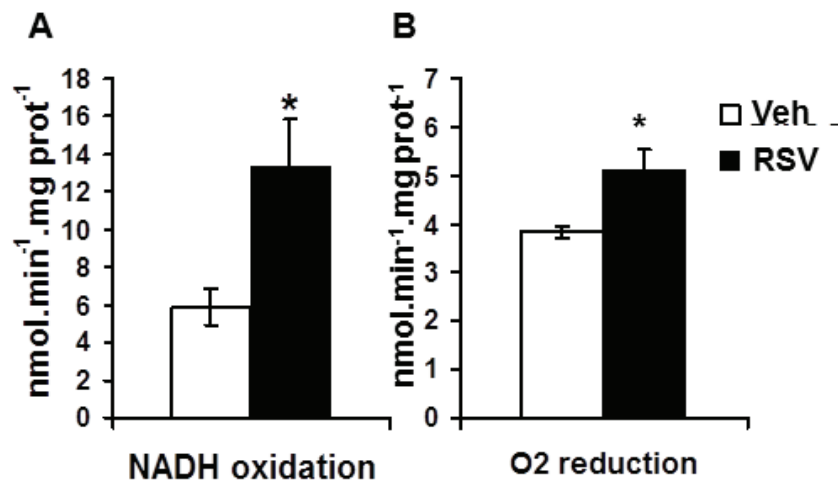


Figure 4: RSV increases the NADH:O₂ reaction. The rates of NADH:O₂ oxidoreduction was measured by following NADH disappearance (A) or O₂ disappearance (B) without any acceptor in the presence of DMSO or 5 μ M RSV. Reactions were started by NADH (0.03 mM) addition. RSV was pre-incubated before measurement in 100 mM KH₂PO₄ solution at pH 8.0, in accordance with the mitochondrial matrix pH value. Data are represented as means \pm *sem* of three independent experiments. The (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared with vehicle.

***In vivo*, Complex I stimulation by RSV does not increase respiratory chain functioning**

We then sought to determine if RSV also altered complex I function *in vivo*. The effect of RSV on respiratory chain function was detailed on brain mitochondria from young and old mice fed on RSV (Fig 6). In our model, old mice showed a significant reduction of complex I-linked respiration rate (Fig 6A, O Ctl vs Y Ctl: - 47 %, $p < 0.05$). While RSV diet increased or tended to increase complex I activity in young and old mice, respectively (Fig 1A), this stimulation of complex I activity was not correlated with an increase in respiration rate (Fig 6).

RSV diet increases electron leak and oxidative stress

Oxygraphic analysis revealed that the RSV diet modified the complex IV catalytic properties in Old mice. Indeed, while the maximal activity of complex IV was not higher in Old-RSV mice (Fig 1A), complex IV-linked respiration dramatically increased (+300 %, $P < 0.01$, Fig 5A).

Complex IV reaction transformed O_2 to H_2O by accepting four electrons, furnished by the cytochrome c. Cyt c mainly acts as an electron chain carrier, however, under stress conditions, cyt c may also be involved in ROS detoxification, eliminating $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 generated by electron leakage ([54]). Thus, two pathways of oxygen consumption can be found in mitochondria, a KCN sensitive complex IV-respiration supported by the transferred electrons coupled with ATP synthesis and a KCN insensitive respiration being achieved by the leaked electrons and related to the ROS generation. Therefore, the effect of RSV on the complex IV catalytic properties was further analyzed. To assess the complex IV-linked respiration response to oxidative stress, control mitochondria were incubated either with H_2O_2 (10 nM) or with RSV (100 nM) (Fig 5B). As expected, H_2O_2 induced a drastic increase in complex IV-linked respiration. This increase in complex IV-linked respiration was also reproduced by direct incubation of mitochondria with RSV (Fig 5B), and mimicked the one observed in old RSV-treated mice (Fig 5A). These increases can be counteracted by the addition of N-AcetylCysteine (NAC, an antioxidant molecule) (Fig 6C). These results suggested that high complex IV-linked O_2 consumptions relied on leaked electrons scavenged by cyt c rather than to physiological electron transfer, which would mean a higher electron leak in brain mitochondria of aged RSV-treated mice.

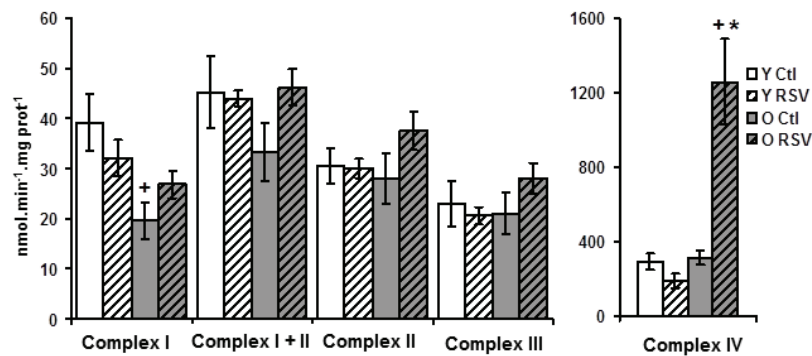
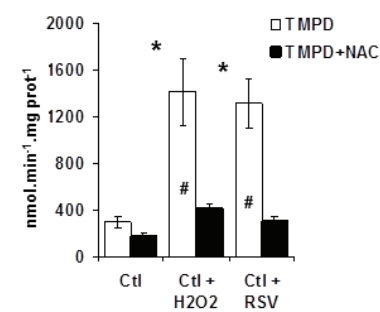
FIGURE 5**A****B**

Figure 5: Functional consequences of RSV treatment on mitochondrial energetic metabolism in brain mitochondria. (A) Respiration rates measured on brain mitochondria of young (Y) and old (O) Ctl (open bars) and RSV (hatched bars) treated-mice using different substrates of the respiratory chain and saturating ADP concentration (0.5 mM): complex I, malate + pyruvate; complex II, succinate (+rotenone); complex III: glycerol 3 Phosphate dehydrogenase and complex III using glycerol 3 phosphate; and complex IV: TMPD + ascorbate. Data are represented as mean \pm *sem* of n=6 (young) or n=5 (old) animals for each group. The (+) indicated a significant effect of ageing ($p < 0.05$). (B) Measurement of TMPD-induced respiration rates in stress conditions. TMPD-induced respiration rates were measured in control brain mitochondria incubated during 30 minutes with RSV or 10 nM H₂O₂. N-Acetylcysteine (NAC, 2 mM) was added as an antioxidant molecule. Data are represented as mean \pm *sem* of five animals. The (*) indicated a significant effect of the treatment (H₂O₂ or RSV) and (#) a significant effect of NAC addition ($p < 0.05$).

RSV induced anti-oxidant defences in brain mitochondria

To test the hypothesis of an higher ROS production in mitochondria from mice fed with RSV, anti-oxidant enzymes were then semi-quantitatively assessed by western blot in mitochondrial fractions (Fig 6).

Previous studies noticed a compromised antioxidant enzyme status in aged rat brain mitochondria as compared to that in young controls [38, 55]. Our results also indicated that aging severely reduce the protein expression of mitochondrial superoxide dismutase (Cu,ZnSOD) (Fig 6). RSV diet increased the Cu,ZnSOD protein expression in the young mice, and both Cu,ZnSOD and MnSOD in aged animals. These results indicated the activation of mitochondrial anti-oxidant defences in RSV fed mice, particularly in the older ones.

RSV was previously proposed to increase the expression of MnSOD, the superoxide dismutase of the mitochondrial matrix. Thus, long-term exposure to 50-100 μ M RSV strongly and specifically upregulated MnSOD in human lung fibroblasts *in vitro* [56] In mouse under high fat diet, RSV also elevated both MnSOD protein level and activity in brain without increasing the mitochondrial mass [57]. The authors suggested that MnSOD was a downstream target of RSV, but the mechanism of MnSOD induction by the molecule was not known. The stimulation of MnSOD by RSV is thought to play a role in the neuroprotective and anti-ageing effects of this polyphenol [56-59]. However, while RSV reduced lipid peroxidation levels in muscles from old animals after hindlimb suspension (HLS), it was unable to attenuate apoptosis following HLS [60]. Likewise, in aged mouse, long-term, preventive RSV diet failed to counteract sarcopenia [61]. RSV diet increased MnSOD expression and reduced lipid peroxidation levels in muscle samples, but was unable to decrease protein carbonyl levels. Thus, the induction of MnSOD by RSV could indicate a protective, preventive effect of RSV by stimulating the defences against oxidative stress, but could also reflect an adaptative response to an increase in ROS production.

This increase in anti-oxidant defences does not protect against oxidative stress

To test these hypotheses, isolated mitochondria were subjected to two different oxidative injuries, either using H₂O₂ (generating an exogenous oxidative stress) or with succinate without rotenone as substrate (generating endogenous electron leak

FIGURE 7

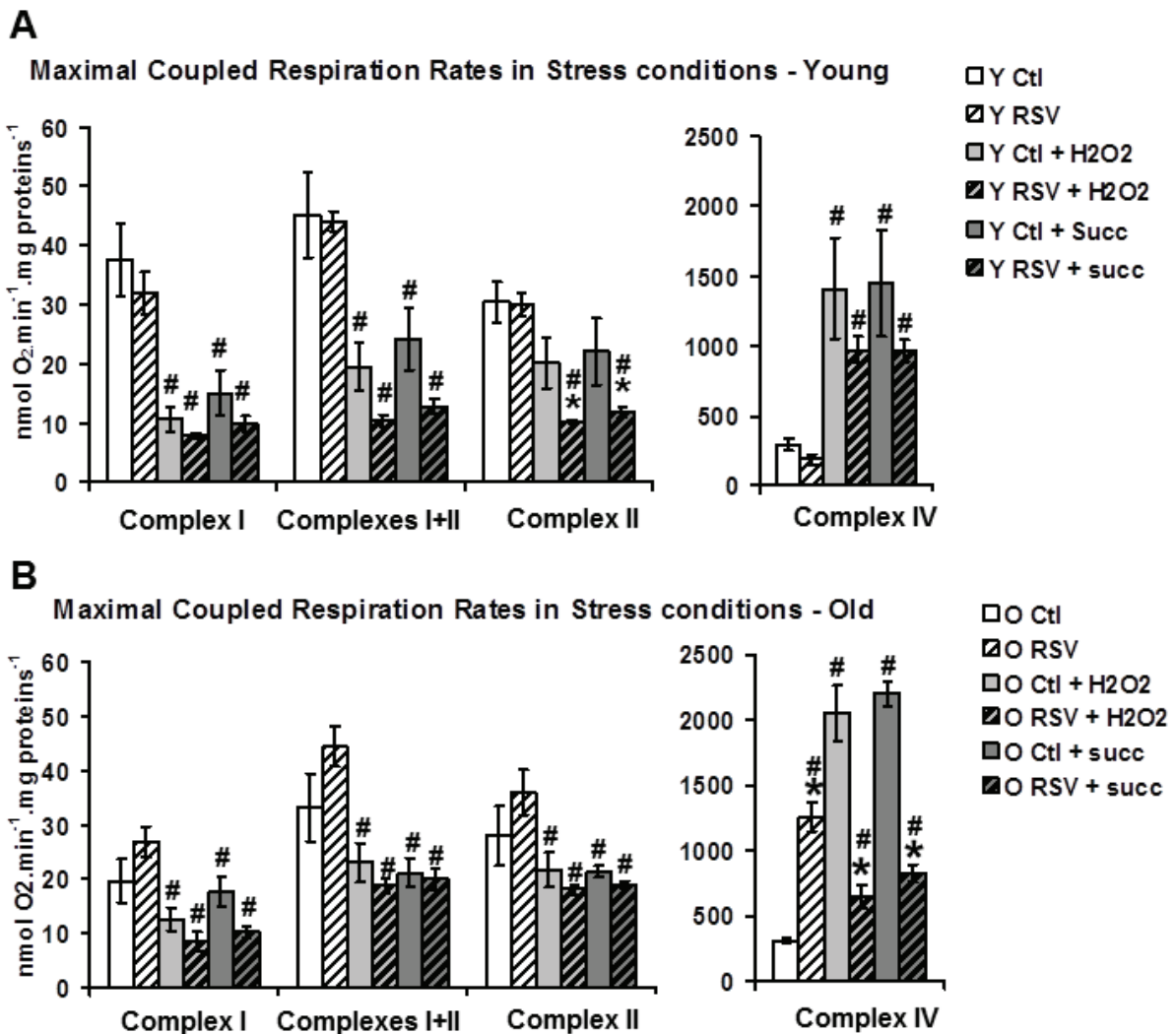


Figure 7: RSV does not prevent stress-induced inhibition of the respiratory chain. Brain mitochondria of young (A) and old (B) Ctl (open bars) and RSV treated (hatched bars) mice were incubated 30 minutes with 10 nM H₂O₂ (light grey) or 10 mM succinate (dark grey) without rotenone. Respiration rates were then after measured using different substrates of the respiratory chain and saturating ADP concentration (0.5 mM): MP, malate+pyruvate (complex I); succinate (+rotenone: complex II); G3P, glycerol 3 phosphate (glycerol 3 Phosphate dehydrogenase and complex III) and TMPD+ascorbate (complex IV). Data are represented as mean \pm *sem* of five animals for each group. The (#) indicated a significant effect of H₂O₂ or succinate treatment, the (*) indicated a significant effect of RSV diet ($p < 0.05$).

by a reverse electron flux) (Fig 7). As expected, in mitochondria from young control mice, this exposure to H₂O₂ induced a drastic inhibition of complex I-linked respiration, and a slight decrease in complex II-linked respiration. Similar effects were observed with succinate without rotenone (Fig 7A). In O mice, the inhibition of respiration by oxidative injuries was less pronounced, due to a lower basal respiration level (Fig 7B). In O RSV mice, the H₂O₂ or succinate without rotenone induced a decrease in Complex IV-linked respiration (Fig 7B). We could hypothesize that stress induction in mitochondria with physiologically low antioxidant defences (Fig 6) could lead to an inhibition of Complex IV-driven respiration rate.

RSV diet did protect mitochondria from the acute oxidative stress neither in Y nor in O mice (Fig 7A, B, hatched gray bars): the inhibition of respirations when incubating mitochondria with H₂O₂ or succinate without rotenone was not prevented in mitochondria from mice receiving a RSV-diet. The inhibition of complex II-linked respiration with H₂O₂ or succinate incubation was even significantly higher in mice receiving a RSV-diet.

We further investigated the consequences of this electron leak by analyzing the level of oxidative cellular damages (Fig 8). Two markers of oxidation, protein thiol (SH) content, as a sensitive target of H₂O₂ oxidation, and N(epsilon)-(hexanoyl)lysine (HEL) expression, a biomarker for initial stage of peroxidation, were quantified. While protein-SH was slightly decreased in O RSV-treated mice (p=0.058, Fig 8A), HEL was significantly increased in RSV-treated mice, particularly in the O animals (Fig 8B, p<0.05).

Taken together, these results indicated that the RSV diet induced a higher electron leak from the respiratory chain leading to oxidative damages in the O mice despite an increase in MnSOD and Cu,Zn SOD expression.

Recent literature describes hormetic effects of RSV, displaying a biphasic dose-response curve [62]. At low doses (below 10 µM), RSV appears as an antioxidant [5], stimulating the cellular proliferation and the antioxidant system, while at higher concentration (50 to 100µM), it becomes pro-oxidant [63-68], decreasing cell viability and inducing cellular damages. In a study examining the effects of RSV on sodium arsenite-induced cytotoxicity [69], resveratrol was found to exert beneficial effect up to 5 µM, promoting cell viability and proliferation, while it inhibits cell survival at 20 µM. Lower concentrations reduced the level of oxidative stress, while higher concentration was responsible for ROS overproduction. In mice, high RSV

FIGURE 8

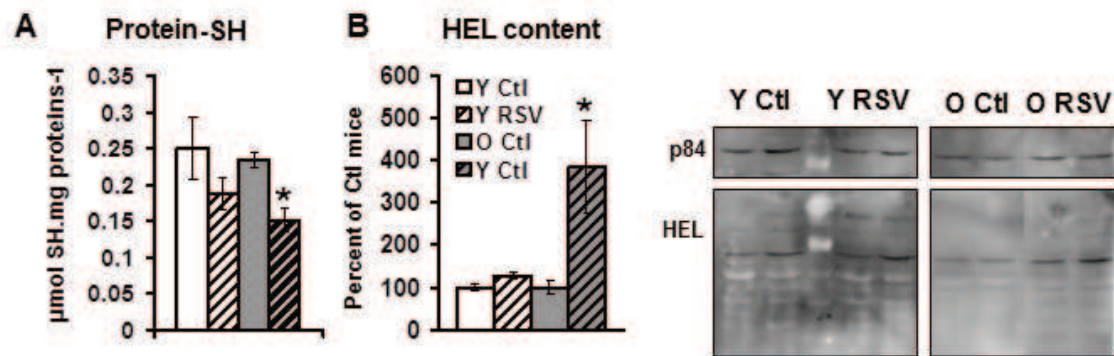


Figure 8: RSV increases oxidative stress marker. (A) Protein thiols content was measured on brain homogenate of young (Y) and old (O) control (Ctl) and RSV-treated mice. **(B) HEL content** was determined by western blotting on brain homogenates of young (Y) and old (O) control (Ctl) and RSV-treated mice. Right, representative blot of two duplicate experiments on n= 4 animals. Data are represented as means \pm *sem* of four animals. The (*) shows a significant effect of the RSV-diet ($p < 0.05$).

concentration increased superoxide production in aorta of aged mice with a metabolic stress [70] and in liver after ischemia-reperfusion [71]. Because of high oxygen consumption, its special membrane lipid composition and its relatively low antioxidant defences, brain tissue is highly sensitive to oxidative damages [72]. Looking at the effects of RSV on brain represents a critical issue because of the potential therapeutic application of RSV in neurodegenerative diseases. Most of the studies describe protective effects of RSV on neuronal damages related to ageing, Alzheimer and Parkinson diseases or to ischemia [56, 73, 74]. However, in brain, pro-oxidant effects of the molecule were also observed at high doses (250 μ M of RSV decreased glutamate uptake in cortical astrocytes culture [75] while 50-100 μ M exacerbated ethanol toxicity and 20 mg/kg of RSV increased lipid peroxidation on rat striatum [76]). In this study, we showed that in brain of aged mice, RSV diet induced a higher electron leak from the respiratory chain which, in the context of reduced antioxidant defences commonly observed in ageing, seems to overwhelm antioxidant defences. The mechanisms underlying these pro-oxidant effects of RSV are not fully understood but most of the studies incriminate the high reactivity of the molecule. Complex I appears as an important player in the mitochondrial hormetic response to stress, by controlling the concentration of the main signaling intermediates (ie NAD⁺/NADH ratio and ROS production, [77]). Our study indicated that the RSV induced mitochondrial hormetic response to stress may be –at least partly- linked to the direct effect of RSV on complex I. The respiratory chain complexes were previously described as a target of RSV [19, 21, 42], among which complex I [20, 21]. Low RSV doses (1-5 μ M) stimulated complex I activity [21], while high doses (25-50 μ M) specifically inhibited complex I linked respiration and activity as seen in our results and in another study [20]. In parallel, an increase in ROS production was detected using the substrates of complex I (glutamate and malate; [20]). Sassi et al [42] also noticed an increase H₂O₂ production upon accumulation of mitochondria-targeted resveratrol derivatives into the organelle. Our study go further on the mechanism of interaction and indicated that RSV can interact with the nucleotide binding site of complex I, thus modifying the catalytic properties of the enzyme, and directly increasing superoxide production by complex I when oxidized.

In summary, in the present study we show that resveratrol binds to complex I likely at the nucleotide binding site (Fig 9), which either stimulates or inhibits complex I activity according to the RSV dose. If oxidized, the binding of RSV to complex I can

FIGURE 9

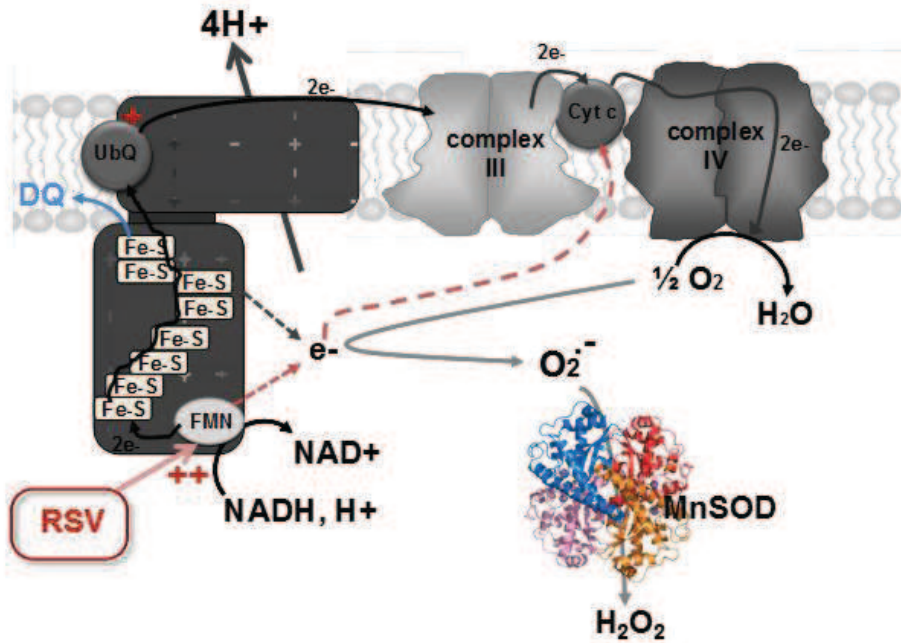


Figure 9: Schematic representation of RSV effect on complex I in brain mitochondria and the subsequent electron transfer along the mitochondrial respiratory chain. In brain mitochondria; RSV stimulates complex I activity by direct interaction with the nucleotide binding site of the NADH dehydrogenase. At matrix pH, RSV can also accept electrons from complex I thereby increasing ROS production. To counteract this increase, in mitochondria form RSV fed mice antioxidant defences are increased (MnSOD) but, in old mice with physiologically reduced antioxidant defences, this electron leak from complex I induced by RSV leads to oxidative stress.

also induce an increase in oxygen reduction to superoxide. We propose that the targeting of complex I by RSV may stimulate signaling pathways, including those related to antioxidant defenses. While the increase in ROS production would participate to the hormetic effects of RSV, in a context of reduced antioxidant capacity as observed in aged brain, this could also induce oxidative stress. Thus, this study emphasized the importance of key parameters such as the dose, the tissue considered and the age at the time of treatment which can modulate the intracellular and mitochondrial redox status switching from beneficial to deleterious effects of RSV. This also shed light on the importance of a thorough characterization of the molecular targets of RSV for further clinical studies.

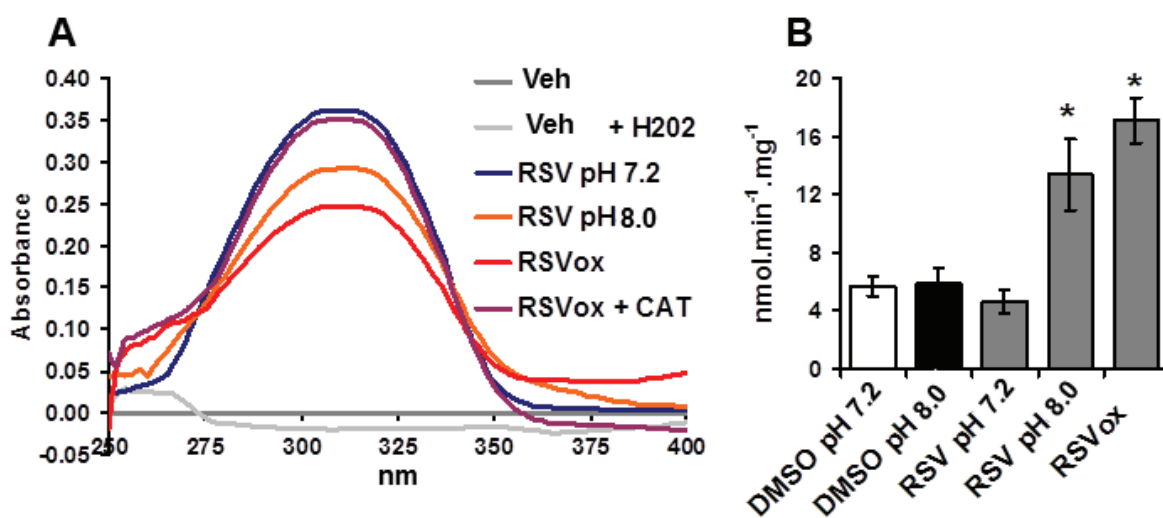
ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to MC Menet for high performance liquid chromatography analysis of resveratrol. This work was supported by grants from the following research institutions : "*Région Pays de la Loire*", "*Agence Nationale de la Recherche*", "*Fondation pour la Recherche Médicale*", "*Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels*", "*Retina France*", "*Ouvrir les Yeux*", and "*Association contre les Maladies Mitochondriales*".

REFERENCES

1. Leifert, W. R. & Abeywardena, M. Y. (2008) Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity, *Nutr Res.* **28**, 842-50.
2. Leifert, W. R. & Abeywardena, M. Y. (2008) Cardioprotective actions of grape polyphenols, *Nutr Res.* **28**, 729-37.
3. Vingtdeux, V., Dreses-Werringloer, U., Zhao, H., Davies, P. & Marambaud, P. (2008) Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease, *BMC Neurosci.* **9 Suppl 2**, S6.
4. Kaerberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P. S., Fields, S., Bedalov, A. & Kennedy, B. K. (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol, *J Biol Chem.* **280**, 17038-45.
5. Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N. & Koya, D. (2011) Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway, *Diabetes.* **60**, 634-43.
6. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. & Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha, *Cell.* **127**, 1109-22.

Figure SI 1



Supplemental figure legends:

Figure SI1: oxidized resveratrol is a complex I acceptor and increases ROS production

(A) Absorption spectra of 5 μM Trans-RSV (RSV) at pH 7.2 or 8.0 in 0.1M KH₂PO₄ solution supplemented with 2U.ml⁻¹ of Horse Raddish Peroxidase (HRP). When indicated, 0.01 mM to 0.1 mM H₂O₂, and 10U.ml⁻¹ of catalase (CAT) were added. RSVox corresponds to a condition where RSV was previously oxidized by 0.01 mM H₂O₂ (B) Effect of oxidized RSV on NADH:O₂ reaction. The rates of NADH:O₂ oxidoreduction was measured by following NADH disappearance without any acceptor in the presence of DMSO or 5 μM RSV. RSV was incubated before use in 0.1M KH₂PO₄ solution at pH 7.2 or 8.0 or oxidized by 0.01 mM H₂O₂ (RSV ox).

7. Bastin, J., Lopes-Costa, A. & Djouadi, F. (2011) Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts, *Hum Mol Genet.* **20**, 2048-57.
8. Csiszar, A., Labinskyy, N., Pinto, J. T., Ballabh, P., Zhang, H., Losonczy, G., Pearson, K., de Cabo, R., Pacher, P., Zhang, C. & Ungvari, Z. (2009) Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **297**, H13-20.
9. Sol, E. M., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Kumar, A., Kim, H. S., Deng, C. X. & Choudhary, C. (2012) Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase sirt3, *PLoS One.* **7**, e50545.
10. Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Jr., Alt, F. W., Kahn, C. R. & Verdin, E. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation, *Nature.* **464**, 121-5.
11. Shimazu, T., Hirschey, M. D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K. E., Schwer, B., Lombard, D. B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F. W., Denu, J. M., Jacobson, M. P. & Verdin, E. (2010) SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production, *Cell Metab.* **12**, 654-61.
12. Yu, W., Lin, Y., Yao, J., Huang, W., Lei, Q., Xiong, Y., Zhao, S. & Guan, K. L. (2009) Lysine 88 acetylation negatively regulates ornithine carbamoyltransferase activity in response to nutrient signals, *J Biol Chem.* **284**, 13669-75.
13. Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. & Guan, K. L. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation, *Science.* **327**, 1000-4.
14. Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C. X. & Finkel, T. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **105**, 14447-52.
15. Bao, J., Scott, I., Lu, Z., Pang, L., Dimond, C. C., Gius, D. & Sack, M. N. (2010) SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity, *Free radical biology & medicine.* **49**, 1230-7.
16. Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X. & Gius, D. (2010) SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress, *Cancer Cell.* **17**, 41-52.
17. Cimen, H., Han, M. J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H. & Koc, E. C. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria, *Biochemistry.* **49**, 304-11.
18. Finley, L. W. & Haigis, M. C. (2012) Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis, *Trends Mol Med.* **18**, 516-23.
19. Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A. & Tillement, J. P. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain, *Drugs Exp Clin Res.* **25**, 87-97.
20. Moreira, A. C., Silva, A. M., Santos, M. S. & Sardao, V. A. (2013) Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: investigation of the role of gender, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* **53**, 18-26.
21. Desquiret-Dumas, V., Gueguen, N., Leman, G., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Chupin, S., Chevrollier, A., Vessieres, E., Ayer, A., Ferre, M., Bonneau, D., Henrion, D., Reynier, P. & Procaccio, V. (2013) Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells, *J Biol Chem.* **288**, 36662-75.
22. Mourier, A. & Larsson, N. G. (2011) Tracing the trail of protons through complex I of the mitochondrial respiratory chain, *PLoS Biol.* **9**, e1001129.

23. Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S. & Sazanov, L. A. (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I, *Nature*. **494**, 443-8.
24. Menet, M. C., Cottart, C. H., Taghi, M., Nivet-Antoine, V., Dargere, D., Vibert, F., Laprevote, O. & Beaudeau, J. L. (2013) Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight analysis for the identification and the determination of resveratrol and its metabolites in mouse plasma, *Anal Chim Acta*. **761**, 128-36.
25. Lopez-Nicolas, J. M. & Garcia-Carmona, F. (2008) Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption, *J Agric Food Chem*. **56**, 7600-5.
26. Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiret, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Martinou, J. C. & Reynier, P. (2011) Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation, *Faseb J*. **25**, 1618-27.
27. Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schagger, H. & Brandt, U. (2000) Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochimica et biophysica acta*. **1459**, 230-8.
28. Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J. P. & Lombes, A. (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis, *Mitochondrion*. **9**, 331-9.
29. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M. & Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **228**, 35-51.
30. Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. (2008) The production of reactive oxygen species by complex I, *Biochem Soc Trans*. **36**, 976-80.
31. Johnson, J. E., Jr., Choksi, K. & Widger, W. R. (2003) NADH-Ubiquinone oxidoreductase: substrate-dependent oxygen turnover to superoxide anion as a function of flavin mononucleotide, *Mitochondrion*. **3**, 97-110.
32. Flamment, M., Gueguen, N., Wetterwald, C., Simard, G., Malthiery, Y. & Ducluzeau, P. H. (2009) Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **297**, E1162-70.
33. Batandier, C., Guigas, B., Detaille, D., El-Mir, M. Y., Fontaine, E., Rigoulet, M. & Leverve, X. M. (2006) The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin, *J Bioenerg Biomembr*. **38**, 33-42.
34. Bikadi, Z. & Hazai, E. (2009) Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock, *J Cheminform*. **1**, 15.
35. Solis, F. J. & Wets, R. J.-B. (1981) Minimization by Random Search Techniques
doi:10.1287/moor.6.1.19, *Mathematics of Operations Research*. **6**, 19-30.
36. Guillet, V., Chevrollier, A., Cassereau, J., Letournel, F., Gueguen, N., Richard, L., Desquiret, V., Verny, C., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Reynier, P. & Bonneau, D. (2010) Ethambutol-induced optic neuropathy linked to OPA1 mutation and mitochondrial toxicity, *Mitochondrion*. **10**, 115-24.
37. Le Quoc, D., Le Quoc, K. & Gaudemer, Y. (1976) Energy-dependent variation of thiol groups reactivity or accessibility in rat liver mitochondria, revealed by measurements of labelled thiol reagents incorporation, *Biochemical and biophysical research communications*. **68**, 106-13.
38. Chakrabarti, S., Munshi, S., Banerjee, K., Thakurta, I. G., Sinha, M. & Bagh, M. B. (2011) Mitochondrial Dysfunction during Brain Aging: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidant Supplementation, *Aging Dis*. **2**, 242-56.

39. Benzi, G., Pastoris, O., Marzatico, F., Villa, R. F., Dagani, F. & Curti, D. (1992) The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging, *Neurobiology of aging*. **13**, 361-8.
40. Manczak, M., Jung, Y., Park, B. S., Partovi, D. & Reddy, P. H. (2005) Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging, *Journal of neurochemistry*. **92**, 494-504.
41. Srividhya, R., Zarkovic, K., Stroser, M., Waeg, G., Zarkovic, N. & Kalaiselvi, P. (2009) Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate, *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. **27**, 223-31.
42. Sassi, N., Mattarei, A., Azzolini, M., Szabo, I., Paradisi, C., Zoratti, M. & Biasutto, L. (2014) Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase, *Biochimica et biophysica acta*. **1837**, 1781-9.
43. Birrell, J. A., King, M. S. & Hirst, J. (2011) A ternary mechanism for NADH oxidation by positively charged electron acceptors, catalyzed at the flavin site in respiratory complex I, *FEBS Lett*. **585**, 2318-22.
44. Kushnareva, Y., Murphy, A. N. & Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state, *The Biochemical journal*. **368**, 545-53.
45. Kussmaul, L. & Hirst, J. (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 7607-12.
46. Gulcin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M. H., Bilsel, M. & Goren, A. C. (2010) Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. **48**, 2227-38.
47. Birrell, J. A., Morina, K., Bridges, H. R., Friedrich, T. & Hirst, J. (2013) Investigating the function of [2Fe-2S] cluster N1a, the off-pathway cluster in complex I, by manipulating its reduction potential, *Biochem J*. **456**, 139-46.
48. King, M. S., Sharpley, M. S. & Hirst, J. (2009) Reduction of hydrophilic ubiquinones by the flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and production of reactive oxygen species, *Biochemistry*. **48**, 2053-62.
49. Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G. & Tsien, R. Y. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 6803-8.
50. Lopez-Nicolas, J. M., Perez-Gilabert, M. & Garcia-Carmona, F. (2009) Effect of protonation and aggregation state of (E)-resveratrol on its hydroperoxidation by lipoxygenase, *J Agric Food Chem*. **57**, 4630-5.
51. Corduneanu, O., Janeiro, P. & Brett, A. M. O. (2006) On the Electrochemical Oxidation of Resveratrol, *Electroanalysis*. **18**, 757-762.
52. <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Oc2cc%28\C%3DC\c1ccc%28O%29cc1%29cc%28O%29c2>
53. Hirano, Y., Kondo, R. & Sakai, K. (2002) 5 α -Reductase inhibitory compounds produced by polymerization of resveratrol with horseradish peroxidase, *J Wood Sci*. **48**, 64-68.
54. Zhao, Y., Wang, Z. B. & Xu, J. X. (2003) Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O₂⁻ and H₂O₂ in mitochondria, *J Biol Chem*. **278**, 2356-60.
55. Bagh, M. B., Thakurta, I. G., Biswas, M., Behera, P. & Chakrabarti, S. (2011) Age-related oxidative decline of mitochondrial functions in rat brain is prevented by long term oral antioxidant supplementation, *Biogerontology*. **12**, 119-31.
56. Robb, E. L. & Stuart, J. A. (2010) trans-Resveratrol as a neuroprotectant, *Molecules*. **15**, 1196-212.

57. Robb, E. L., Winkelmoen, L., Visanji, N., Brotchie, J. & Stuart, J. A. (2008) Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain, *Biochemical and biophysical research communications*. **372**, 254-9.
58. Agarwal, B., Camara, A. K., Stowe, D. F., Bosnjak, Z. J. & Dash, R. K. (2012) Enhanced charge-independent mitochondrial free Ca(2+) and attenuated ADP-induced NADH oxidation by isoflurane: Implications for cardioprotection, *Biochimica et biophysica acta*. **1817**, 453-65.
59. Fukui, M. & Zhu, B. T. (2010) Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells, *Free radical biology & medicine*. **48**, 821-30.
60. Jackson, J. R., Ryan, M. J., Hao, Y. & Alway, S. E. (2010) Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats, *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. **299**, R1572-81.
61. Jackson, J. R., Ryan, M. J. & Alway, S. E. (2011) Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice, *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. **66**, 751-64.
62. Calabrese, V., Cornelius, C., Mancuso, C., Lentile, R., Stella, A. M. & Butterfield, D. A. (2010) Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration, *Methods Mol Biol*. **610**, 285-308.
63. Heiss, E. H., Schilder, Y. D. & Dirsch, V. M. (2007) Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells, *J Biol Chem*. **282**, 26759-66.
64. Azmi, A. S., Bhat, S. H., Hanif, S. & Hadi, S. M. (2006) Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties, *FEBS Lett*. **580**, 533-8.
65. de la Lastra, C. A. & Villegas, I. (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications, *Biochem Soc Trans*. **35**, 1156-60.
66. Fukuhara, K., Nagakawa, M., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Urano, S., Fukuzumi, S., Ozawa, T., Ikota, N., Mochizuki, M., Miyata, N. & Okuda, H. (2006) Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II), *Bioorg Med Chem*. **14**, 1437-43.
67. Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U. & Ullah, M. F. (2007) Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties, *Semin Cancer Biol*. **17**, 370-6.
68. Nemeikaite-Ceniene, A., Imbrasaite, A., Sergediene, E. & Cenas, N. (2005) Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple, *Arch Biochem Biophys*. **441**, 182-90.
69. Chen, C., Jiang, X., Zhao, W. & Zhang, Z. (2013) Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. **59**, 8-17.
70. Baron, S., Bedarida, T., Cottart, C. H., Vibert, F., Vessieres, E., Ayer, A., Henrion, D., Hommeril, B., Paul, J. L., Renault, G., Saubamea, B., Beaudeux, J. L., Procaccio, V. & Nivet-Antoine, V. Dual effects of resveratrol on arterial damage induced by insulin resistance in aged mice, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. **69**, 260-9.
71. Hassan-Khabbar, S., Cottart, C. H., Wendum, D., Vibert, F., Clot, J. P., Savouret, J. F., Conti, M. & Nivet-Antoine, V. (2008) Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery, *Liver Transpl*. **14**, 451-9.
72. Friedman, J. (2011) Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? in *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology* (Gadoth, N. & Göbel, H. H., eds) pp. 19-27, Humana Press.
73. Han, Y. S., Zheng, W. H., Bastianetto, S., Chabot, J. G. & Quirion, R. (2004) Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C, *Br J Pharmacol*. **141**, 997-1005.

74. Lu, K. T., Chiou, R. Y., Chen, L. G., Chen, M. H., Tseng, W. T., Hsieh, H. T. & Yang, Y. L. (2006) Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation, *J Agric Food Chem.* **54**, 3126-31.
75. Vieira de Almeida, L., Piñeiro, C., Leite, M., Brolese, G., Tramontina, F., Feoli, A., Gottfried, C. & Gonçalves, C.-A. (2007) Resveratrol Increases Glutamate Uptake, Glutathione Content, and S100B Secretion in Cortical Astrocyte Cultures, *Cell Mol Neurobiol.* **27**, 661-668.
76. Venturini, C. D., Merlo, S., Souto, A. A., Fernandes Mda, C., Gomez, R. & Rhoden, C. R. (2010) Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes, *Oxid Med Cell Longev.* **3**, 434-41.
77. De Haes, W., Froninckx, L., Van Assche, R., Smolders, A., Depuydt, G., Billen, J., Braeckman, B. P., Schoofs, L. & Temmerman, L. (2014) Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **111**, E2501-9.

Résultats et Discussion des articles 1 et 2 :

Dans le foie, le RSV induit une augmentation des voies d'apport en substrats, cycle de Krebs et β -oxydation, de façon SIRT3-dépendante.

Le RSV semble être un régulateur majeur du métabolisme énergétique, entraînant une amélioration de l'homéostasie du glucose chez les souris obèses (Baur, Pearson et al. 2006, Lagouge, Argmann et al. 2006), augmentant l'oxydation des acides gras (Mercader, Palou et al. 2011), ou encore le métabolisme oxydatif et l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la biogenèse mitochondriale dans un modèle murin soumis à un régime riche en graisses (Lagouge, Argmann et al. 2006). Le métabolisme mitochondrial comprend deux voies majeures d'apport en substrats : l'oxydation des acides gras (ou β -oxydation) et la voie des acides tricarboxyliques (ou cycle de Krebs), qui produisent des substrats réduits de type NADH FADH₂, oxydés par la chaîne respiratoire. Dans notre étude sur les modèles murin et cellulaire (HepG2), un des effets majeurs du RSV observés sur les mitochondries de foie est une stimulation des voies d'apport en substrats de la chaîne respiratoire, NADH et FADH₂. Ainsi, sur ce modèle murin, le régime enrichi en RSV entraîne une augmentation de l'activité d'enzyme de la β -oxydation (LCAD), du cycle de Krebs (ICDH, SDH, CS) ou encore des navettes malate/aspartate (MDH) ou glycérol phosphate (G3PDH). Une telle augmentation de la β -oxydation par le RSV a récemment été mise en évidence chez l'homme, sur un modèle de fibroblastes présentant un déficit en CPT2 ou en VLCAD (Aires, Delmas et al. 2014). Cette augmentation des enzymes clés des voies d'apports en substrats est suivie d'une augmentation de la capacité de la chaîne respiratoire. Une augmentation de la respiration phosphorylante liée aux complexes I et II, ou une augmentation de la respiration en présence de glycérol-3-phosphate ou de palmitoylCoA, accompagnée d'une augmentation de l'activité des complexes I, II et III a été observée particulièrement chez les souris âgées. Cette action du régime enrichi en RSV semble être un effet direct de la molécule, puisque celui-ci peut être mimé sur un modèle cellulaire d'hépatocarcinome (HepG2), incubé durant 48h avec 1 μ M de RSV. Une augmentation à la fois des voies d'apports en substrats et de l'activité de trois des complexes de la chaîne respiratoire pourrait indiquer une augmentation de la biogenèse mitochondriale et de la voie AMPK-SIRT1. De plus, SIRT1 semble être un régulateur majeur du métabolisme mitochondrial, ciblant notamment les gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique (Rodgers, Lerin et al. 2005). Cependant, dans notre modèle, aucune modification de l'acétylation de p53, une des cibles de SIRT1 n'a été observée. De plus la biogenèse mitochondriale ne semble pas modifiée dans ce modèle. En effet, nous n'avons pu mettre en évidence d'augmentation de la quantité de protéines mitochondriales (rapport protéines

mitochondriales/protéines cellulaires, analyse par western blot de sous-unités de la chaîne respiratoire) ni d'augmentation de l'expression de facteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Tfam, PGC1). Nous n'avons pas non plus constaté d'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK que ce soit chez les souris nourries avec un régime enrichi en RSV ou dans les cellules HepG2 traitées à 1 μ M RSV. La voie AMPK/SIRT1 ne semble donc pas intervenir dans les effets du RSV sur le métabolisme mitochondrial, aux faibles doses de RSV utilisées (1 μ M sur cellules). D'autre part, ces voies métaboliques peuvent également être contrôlées par le biais de déacétylations dépendantes de SIRT3 : cette isoforme possède de nombreuses cibles mitochondriales (Giralt and Villarroya 2012), parmi lesquelles la SDH, l'ICDH ou la LCAD (Hallows, Lee et al. 2006, Schlicker, Gertz et al. 2008, Hirschey, Shimazu et al. 2010, Finley, Haas et al. 2011). Notre étude confirme que l'activation des enzymes du cycle de Krebs et de la β -oxydation par le RSV dépend de déacétylation induite par SIRT3. En effet, sur le modèle cellulaire HepG2, nous avons pu observer que la SDH est hypoacétylée en présence de RSV. Cette déacétylation engendre ainsi une augmentation de l'activité de cette enzyme. L'activité de deux autres cibles de SIRT3, la CS et l'ICDH est augmentée en présence de RSV. L'utilisation d'un inhibiteur des sirtuines ainsi que d'un siRNA dirigé contre SIRT3 confirme que l'induction de l'activité CS et SDH est dépendante de SIRT3. De plus, l'hypoacétylation de la SDH n'est plus observée suite à l'inhibition soit pharmacologique (par l'inhibiteur ex-527) soit par siRNA dirigé contre SIRT3.

Le complexe I est une cible directe du RSV, qui se lie au niveau du site de fixation du NAD⁺.

Ainsi, les résultats obtenus dans nos études sur nos modèles cellulaires et animaux montrent que le RSV possède une action directe au sein du compartiment mitochondrial, notamment par l'activation de SIRT3. D'après notre travail, le complexe I est l'enzyme qui subit l'une des augmentations les plus fortes et les plus robustes lors du traitement au RSV. En effet, l'analyse menée sur les cellules HepG2 confirme que le RSV (1-5 μ M) est capable d'induire l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. Ces effets cellulaires sont reproduits *in vivo* chez l'animal. En effet, le RSV augmente l'activité du complexe I pour les deux populations murines étudiées (jeunes et âgées). Cependant, contrairement à la stimulation des enzymes du cycle de Krebs ou de la β -oxydation, l'inhibition de SIRT3 ne reverse pas les effets du RSV sur l'activité du complexe I. Ceci indiquerait un effet direct du RSV sur ce complexe. Cette hypothèse est confirmée par le fait que le RSV augmente également l'activité du complexe I : 1) sur mitochondries isolées incubées 30 minutes en présence de RSV, 2) sur mitochondries dont les membranes sont préalablement rompues (congélation/décongélation) ou 3) sur complexes solubilisés à partir des membranes mitochondriales ; et ce, de façon dose-

dépendante de 10nM à 5µM. Au-delà de cette dose, le RSV n'augmente plus l'activité du complexe I (mitochondrie de cerveau) voire inhibe l'activité de celui-ci (complexe I solubilisé à partir de mitochondries de cœur). Zini *et al.*, avaient déjà indiqué une action directe du RSV sur la chaîne respiratoire, notamment sur l'activité des complexes I, III et V (Zini, Morin et al. 1999). Plus récemment Moreira *et al.*, (2013), ont également pu mettre en évidence une inhibition directe de l'activité de complexe I à forte dose de RSV (25µM) sur mitochondries de foie ou de cerveau (Moreira, Silva et al. 2013). Cependant, le mécanisme d'action de cette molécule sur ce complexe restait méconnu.

Une étude menée par Kitson *et al.*, avait précédemment montré que le RSV était capable d'interagir physiquement avec l'aldéhyde déshydrogénase (Kitson, Kitson et al. 2001). D'après, cette étude le RSV serait capable d'inhiber l'activité catalytique de cette enzyme (conversion des aldéhydes en acides carboxyliques en présence de NAD⁺) suggérant ainsi une compétition entre le RSV et le NAD⁺ au niveau du site actif de l'enzyme. Nous avons donc étudié l'action du RSV sur divers enzymes dépendantes du NAD⁺. Ces analyses menées sur enzymes isolées montrent que le RSV (5µM) inhibe l'activité d'enzymes NAD⁺ dépendantes comme que la formate déshydrogénase, mais peut également stimuler l'activité d'enzymes oxydant le NADH (LDH, NADH:FMN déshydrogénase), appuyant ainsi notre hypothèse. Ces expériences menées sur enzymes isolées ont mis en évidence que le RSV se liait directement au site actif de la NADH:FMN déshydrogénase et induisait son activité. Le complexe I est formé d'une FMN liée au niveau de la sous-unité NDFUV1 responsable de l'oxydation du NADH (Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013), ce qui le rapproche de la structure de la NADH:FMN déshydrogénase.

L'analyse *in silico* de l'interaction entre le RSV et le module N du complexe I, à partir de la structure du module N de *Thermus thermophilus*, a montré que le RSV était capable de se fixer au niveau des phénylalanines 78 et 205 et de la glutamine 185 du site actif, trois résidus clef impliqués dans la fixation des nucléotides, en particulier le NAD⁺, sans obstruer complètement l'accès à la FMN. Afin de confirmer *in vitro*, la liaison du RSV au site de fixation des nucléotides, l'activité catalytique NADH déshydrogénase du complexe I a été analysée en présence d'accepteurs d'électrons spécifiques de la FMN, tels que le HAR ou le FeCN. En présence de HAR, le RSV stimule l'activité du complexe I jusqu'à 5µM, puis inhibe son activité, tout comme pour la réaction NADH:Ubiquinone Réductase, ce qui circonscrit bien l'effet du RSV au module-N. D'autre part, l'oxydation du NADH par le complexe I est activée en présence de NADH et inhibée en présence de NAD⁺ (Birrell, King et al. 2011). Cette inhibition de l'activité NADH déshydrogénase du complexe I (dosée en présence de FeCN) par le NAD⁺ est diminuée en présence de RSV. Ces résultats confirment que le RSV peut se lier au site de fixation du NAD⁺. L'inhibition de la fixation

du NAD^+ par le RSV semble être compétitive puisque cette inhibition est levée en présence de forte quantité de NAD^+ .

Nos deux études ont ainsi permis de démontrer que le RSV interagit directement avec le site actif du complexe I, et module ainsi son activité, induisant une stimulation de l'oxydation du NADH à faibles doses (i.e. inférieure à $5\mu\text{M}$) ou l'inhibant à plus fortes doses. Cette interaction entre le RSV et le complexe I pourrait donc être à l'origine d'une modulation du rapport NADH/NAD^+ .

La modulation du ratio NADH/NAD^+ par le complexe I est indispensable à l'activation de SIRT3.

L'utilisation de faibles doses de RSV ($1-5\mu\text{M}$), *in vitro* sur enzymes isolées, *in situ* sur modèle cellulaire et *in vivo* sur modèle murin, stimule l'activité NADH déshydrogénase du complexe I. Dans le modèle HepG2, nous avons pu montrer que cette stimulation induit une diminution du ratio NADH/NAD^+ mitochondrial, liée à une hausse du taux NAD^+ et une diminution de celui en NADH (article 1, Figure 3).

Les sirtuines apparaissent comme des déacétylases dont l'activité est dépendante du NAD^+ (Li and Kazgan 2011). Des modulations de la concentration en NAD^+ ont déjà été montrées comme pouvant activer ou inhiber leur activité. Aussi, la stimulation de l'activité du complexe I induite par le RSV, pourrait être responsable de l'activation de SIRT3 mise en évidence sur cellules HepG2 et dans les mitochondries hépatiques de souris nourries par un régime enrichi en RSV. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, sur cellules HepG2, l'inhibition du complexe I par la roténone bloque les effets du RSV : l'augmentation de l'activité de la CS et de la SDH par le traitement au RSV ($1\mu\text{M}$) et l'hyppoacétylation de cette dernière ne sont plus observées (article 1, Figure 6). Ce résultat place bien la modulation de l'activité du complexe I par le RSV en amont de l'activation de SIRT3. Le traitement des cellules à la roténone inhibe également l'augmentation du NAD^+ induite par le RSV (article 1, Figure 6). D'autre part, les effets du traitement par le RSV sur l'activité de la SDH et de la CS sont également perdus lorsque le pool de NAD (NAD^+ et NADH) cellulaire est préalablement déplété (par traitement des cellules à la gallotannine, article 1, Figure 4). Ces résultats indiquent donc que la diminution du ratio NADH/NAD^+ est nécessaire à l'activation de SIRT3. Une étude menée par Magnifico *et al.*, a montré dans un modèle de dégénérescence axonale induite (utilisation de KCl), que le RSV était capable de prévenir la dégénérescence (Magnifico, Saias et al. 2013). En accord avec nos résultats, cette action du polyphénol est dépendante du taux de NAD^+ et semble liée à l'isoforme SIRT3. En effet, la surexpression de cette isoforme inhibe la dégénérescence axonale, tandis que l'augmentation du ratio NADH/NAD^+ induite par inhibition du complexe I par la roténone entraîne une

dégénérescence axonale. Les auteurs concluent que le RSV inhibe la dégénérescence axonale via SIRT3 et cela de manière NAD^+ dépendante. Ces résultats indiquent donc que SIRT3 est une cible indirecte du RSV. Certaines études décrivent SIRT3 comme une cible directe du RSV (Gertz, Nguyen et al. 2012). Ceux-ci ont montré à partir de la structure cristallographique de SIRT3 que le RSV pouvait interagir physiquement avec cette enzyme. Le RSV aurait alors une action inhibitrice envers SIRT3. Cependant, cette inhibition n'est observée qu'à partir de 0.2mM de RSV. Une telle dose n'est pas atteinte sur notre modèle animal (la dose de RSV et de ses métabolites retrouvée chez nos souris en fin de traitement est de 1 à 5 μM dans le foie).

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans nos deux articles indiqueraient un rôle crucial du complexe I dans la médiation des effets mitochondriaux du RSV (article 1, Figure 10). Ainsi, le RSV se lierait au complexe I au niveau du site de fixation du NAD^+ , entraînant ainsi, à faible dose, une stimulation du renouvellement de ce complexe. Cette stimulation de l'oxydation du NADH, en diminuant le rapport NADH/NAD^+ , entraînerait l'activation de SIRT3 et la déacétylation de ses cibles (SDH, ICDH, LCAD), augmentant au final le métabolisme oxydatif.

Cependant, un certain nombre de composés sont connus pour subir des réactions de "redox cycling" au niveau du complexe I (King, Sharpley et al. 2009). Aussi, l'interaction du RSV avec le site actif du complexe I pourrait s'accompagner de réactions délétères, notamment d'espèces réactives de l'oxygène.

Sous sa forme oxydée, le RSV stimule la production de ROS et induit un stress oxydant dans le cerveau des souris âgées.

Cette question a été abordée dans notre deuxième article, en analysant tout d'abord in vitro, sur complexe I solubilisé, les effets du RSV sur l'oxydation du NADH par le complexe I et la production de ROS (activité $\text{NADH}:\text{O}_2$ réductase du complexe). Chacun des 3 groupes hydroxy (-OH) de la molécule est électro-actif. Aussi, le RSV peut être oxydé (déprotoné) en composé phénoxy ou hydroxyl par de nombreuses peroxydases parmi lesquelles la glutathion peroxydase présente au sein de la mitochondrie ou la NQO1 réductase dans le cytosol (Espin, Soler-Rivas et al. 2000, Pinto Mdel, Garcia-Barrado et al. 2003). L'oxydation du RSV sur ses différents groupements hydroxyls est également très sensible au pH en solution aqueuse, avec un pKa de 8.1, 9.8 et 11.4 pour les groupes en positions 4', 3 et 5, respectivement (Lopez-Nicolas and Garcia-Carmona 2008). Or l'état de protonation de la molécule affecte fortement son activité biologique (Lopez-Nicolas, Perez-Gilabert et al. 2009).

Nous avons étudié dans nos analyses *in vitro* les effets du RSV sous sa forme réduite (étude à pH=7.2) mais également sous sa forme oxydée (oxydation catalysée expérimentalement par la « horse radish peoxidase » en présence d'H₂O₂ (Hirano, Kondo et al. 2002, Corduneanu, Janeiro et al. 2006).

Nos résultats montrent que sous sa forme réduite, le RSV ne constitue pas un accepteur direct d'électrons. En effet, en absence de tout autre accepteur d'électrons au niveau du site quinone ou au niveau du site FMN, l'ajout du RSV ne stimule pas l'oxydation du NADH. Cependant, sous sa forme oxydée, le RSV stimule l'activité NADH:O₂ réductase (Article 2, Figure 4), avec une stimulation de l'oxydation du NADH de plus de 100% et une augmentation de la production de superoxydes d'environ 30%. Sous cette forme oxydée, le RSV semble donc être un accepteur d'électrons du complexe I, mais cette réaction entraîne également des effets délétères en augmentant la réduction de l'oxygène en superoxyde.

En raison des conditions de pH différentes entre la matrice mitochondriale et le cytosol (~8.0 vs 7.2) (Llopis, McCaffery et al. 1998) et/ou de l'activité peroxydase (glutathion peroxydase) dans les mitochondries, la forme active du RSV pourrait différer entre les compartiments cytoplasmique et mitochondrial et ainsi cette molécule pourrait exercer une action différente selon son état de protonation. Cependant, une telle action du RSV sur la production de ROS reste à démontrer *in vivo*.

Dans un modèle de vieillissement, le RSV n'est pas protecteur voire pro-oxydant.

Le vieillissement se caractérise par une diminution de la fonction mitochondriale (Kong, Trabucco et al. 2014, Lin, Coman et al. 2014) avec notamment une diminution de l'activité et de la respiration liée au complexe I (Lenaz, Bovina et al. 1997, Hur, Stork et al. 2014). Dans notre étude, les souris âgées présentent dans les mitochondries de foie une diminution de l'activité NADH:Ubiquinone réductase (NUR) ainsi que de la respiration liée à ce complexe. Dans cet organe, le traitement par RSV induit chez les souris jeunes ou âgées, une augmentation de l'activité NUR ainsi qu'une restauration de la respiration liée au complexe I pour les souris âgées. L'activité du complexe IV est également diminuée par le vieillissement dans notre modèle murin mais le RSV ne permet pas d'améliorer cette activité (Article 1). En raison de son métabolisme très oxydatif, associé à des défenses antioxydantes relativement faibles (Yamamoto, Shibata et al. 2002), le tissu cérébral apparaît être très sensible au stress oxydant notamment lors du vieillissement. En outre, dans les neurones, la production de superoxydes semble principalement liée au complexe I (Kudin, Bimpong-Buta et al. 2004). Aussi, le tissu cérébral apparaît comme un tissu de choix pour analyser les effets du RSV sur la production de ROS. Dans cet organe, on observe une diminution de la

respiration liée au complexe I chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes. Le RSV ne permet pas de restauration de cette respiration. Le RSV induit également chez les souris âgées une augmentation non physiologique de la respiration liée au complexe IV non corrélée à une augmentation de l'activité maximale de ce complexe (Article 2). Ces résultats nous laissent suggérer que le cytochrome c pourrait être réduit non pas par des électrons issus du complexe III de la chaîne respiratoire mais par des électrons qui se seraient échappés lors de l'interaction RSV/complexe I comme discuté dans le paragraphe précédent. Cet effet antioxydant du cytochrome c a déjà été décrit (Zhao, Wang et al. 2003) et semble jouer un rôle non négligeable dans la détoxification des ROS. Pour étudier le potentiel rôle anti-oxydant du RSV, nous avons incubé les mitochondries isolées de cerveau de souris jeunes en présence d' H_2O_2 ou de succinate sans roténone (deux conditions qui sont reconnues pour augmenter la production de ROS) et nous avons ajouté le RSV. Nos résultats confirment que l'induction d'un stress oxydant est bien responsable d'une diminution de la respiration liée au complexe I ainsi qu'une forte augmentation de la respiration liée au complexe IV. Le RSV ne protège pas contre un stress oxydant induit par H_2O_2 ou succinate sans roténone puisque l'ajout de RSV ne permet pas de corriger les variations de respiration induites par un stress. De manière intéressante, les résultats sont identiques pour les mitochondries incubées en présence d' H_2O_2 et celles incubées en présence de RSV, ce qui suggère que le RSV, dans notre modèle, non seulement ne protège pas d'un stress oxydant mais est lui-même inducteur d'un stress. Ces résultats sont appuyés par la mesure de l'expression des enzymes de détoxification des ROS (MnSOD et Cu/ZnSOD) dans les mitochondries de cerveau de souris jeunes et âgées traitées par RSV. En effet, on observe une diminution de la quantité de Cu/ZnSOD dans les mitochondries des souris âgées et le RSV semble réverser partiellement cet effet. Ce résultat pourrait indiquer un rôle bénéfique, antioxydant de la molécule cependant, lorsqu'on mesure les conséquences d'un stress oxydant tels que la peroxydation lipidique (contenu en HEL) ou la quantité de protéines-SH, on constate que les mitochondries des souris traitées par le RSV présentent un stress oxydant supérieur (Article 2).

Les effets médiés par le RSV dépendent du statut redox cellulaire et de la dose utilisée.

Ainsi, le rôle anti/pro-oxidant du RSV pourrait dépendre du statut redox cellulaire et/ou du niveau de production de radicaux libres, avec, chez les souris jeunes une stimulation des défenses anti-oxydantes, mais chez les souris âgées, une production de ROS qui dépasse les capacités anti-oxydantes cellulaires, entraînant un stress oxydant (mitohormesis). De même, dans une situation de surproduction de radicaux libres, le RSV, au lieu d'agir en tant que molécule anti-oxydante, pourrait augmenter le stress oxydant. Ainsi, une étude menée par Baron *et al.*, (Baron, Bedarida et al. 2014)

a montré que les artères de souris âgées nourries avec un régime enrichi en acide gras, mais traitées par RSV, présentaient un stress oxydant. De même, le RSV serait capable d'induire un stress oxydant dans le foie, lors d'une ischémie/reperfusion (Hassan-Khabbar, Cottart et al. 2008). Les effets différents observés en fonction du tissu analysé dans nos deux études pourraient s'expliquer par un niveau différent de protection contre le stress oxydant. En effet, d'après la littérature, le foie semble posséder des capacités de défenses anti-oxydantes plus importantes que le cerveau, tout en présentant une activité du complexe I plus faible.

Ces effets bénéfiques/délétères semblent également dépendre de la dose utilisée. En effet, la plupart des études décrivent des effets protecteurs du RSV contre les dommages neuronaux associés au vieillissement, ou contre les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Han, Zheng et al. 2004, Pasinetti, Wang et al. 2011). Toutefois, des effets pro-oxydants et délétères de la molécule ont été également observés à des doses élevées (50 à 100 μM de RSV (Vieira de Almeida, Pineiro et al. 2008, Mukherjee, Dudley et al. 2010, Venturini, Merlo et al. 2010)). Notre étude suggère que la réponse hormétique au stress induite par le RSV pourrait être – au moins en partie - liée à l'effet direct, dépendant de la dose du RSV sur le complexe I. Ainsi, à faibles doses (1-5 μM), l'activité du complexe I est stimulée par le RSV, tandis que de fortes doses (25 à 50 μM) inhibent spécifiquement l'activité de ce complexe, et la respiration liée à celui-ci. Une telle inhibition à forte dose a également été observée par Moreira *et al.*, (2013). En parallèle, une augmentation de la production de ROS par le complexe I est également détectée (Moreira, Silva et al. 2013, Sassi, Mattarei et al. 2014).

Au travers de ces études, le complexe I apparaît comme un acteur majeur dans la réponse hormétique mitochondriale au stress, en contrôlant la concentration des principaux intermédiaires de signalisation (c'est à dire le rapport NAD^+/NADH et la production de ROS). Cette conclusion est appuyée par deux études récentes sur l'effet de la metformine et du pioglitazone sur l'activité du complexe I, ces deux molécules interagissant directement avec ce complexe (Garcia-Ruiz, Solis-Munoz et al. 2013, De Haes, Frooninckx et al. 2014). Ainsi, Garcia-Ruiz *et al.*, (2013) ont montré que le pioglitazone se fixait au niveau des sous-unités NDUFA9, NDUFB6, et NDUFA6 du complexe I (Garcia-Ruiz, Solis-Munoz et al. 2013). A faible dose, cette interaction induit une petite inhibition du complexe, entraînant une diminution du ratio ATP/AMP, et une stimulation de la voie PGC-1 α . Cependant, à plus forte dose, le pioglitazone entraînerait un désassemblage du complexe I et une inhibition majeure de son activité. L'étude de De Haes *et al.*, (2014) appuie ces résultats, et montre que la metformine induit une légère augmentation de la production de ROS par le complexe I, laquelle, en augmentant l'activité de la peroxyredoxine 2, induit la voie de signalisation MAPK et la mise en place d'une résistance au stress (De Haes, Frooninckx et al. 2014).

A la vue de nos deux études, l'utilisation du RSV comme molécule thérapeutique est sujet à débat. En effet, son action semble dépendante du tissu (inducteur d'un stress ou stimulant du métabolisme énergétique), du statut redox cellulaire, et de la dose utilisée ; ces éléments sont donc à prendre en compte avant d'envisager le RSV comme une molécule thérapeutique. Ces deux constats pourraient expliquer l'hétérogénéité des résultats obtenus lors d'essais cliniques menés chez l'homme (Tome-Carneiro, Larrosa et al. 2013).

- **Manuscrits 3 et 4:**

Assembly defects induce oxidative stress in mitochondrial complex I deficiency.

Géraldine Leman, Naïg Gueguen, Valérie Desquirit-Dumas, Mariame Selma Kane, Céline Wetterwald, Stéphanie Chupin, Arnaud Chevrollier, Anne-Sophie Lebre, Jean-Paul Bonnefont, Magalie Barth, Patrizia Amati-Bonneau, Christophe Verny, Daniel Henrion, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, Vincent Procaccio.

Soumis à The International journal of biochemistry and cell biology

NADH/NAD⁺ ratio is a key parameter in complex I deficiency: potential therapeutic target?

Géraldine Leman, Valérie Desquirit-Dumas, Naïg Gueguen, Stéphanie Chupin, Guillaume Geffroy, Arnaud Chevrollier, Magalie Barth, Patrizia Amati-Bonneau, Christophe Verny, Daniel Henrion, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, Vincent Procaccio.

Manuscrit préparé pour FEBS Letters

Introduction

Au sein du laboratoire INSERM 1083 - CNRS 6214 de biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée (BNMI), l'équipe "Mitolab" étudie les mécanismes physiopathologiques des maladies mitochondriales ainsi que l'élaboration de nouveaux traitements. Mon projet de thèse s'inscrit dans ce cadre et vise à identifier les acteurs intracellulaires clés impliqués dans ces pathologies dans le but de proposer des molécules thérapeutiques. En effet, quasiment aucun traitement curatif n'existe à ce jour pour les pathologies mitochondriales.

Les pathologies mitochondriales sont un groupe de maladies impliquant un déficit de la chaîne respiratoire, parmi ces déficits, le déficit du complexe I est le plus fréquent (environ 30% des cas (Fassone and Rahman 2012)). De par sa double origine génétique, les mutations dans des sous-unités de ce complexe peuvent toucher soit le génome mitochondrial ou nucléaire. Les présentations cliniques, tout comme les symptômes associés à ce déficit sont très hétérogènes. Ainsi, certaines pathologies ne touchent qu'un seul organe, notamment le syndrome de Leber ou LHON (« Leber Hereditary Optic Neuropathy ») qui atteint essentiellement les cellules ganglionnaires de la rétine alors que d'autres maladies sont dites multisystémiques, comme le syndrome de Leigh considéré comme un désordre neurologique grave aboutissant au décès du patient dans la petite enfance.

Le complexe I peut-être divisé en 3 modules catalytique : le module N responsable de l'oxydation du NADH, le module Q responsable du transfert d'électrons et de la réduction de la quinone et le module P impliqué dans le transfert de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (Lazarou, Thorburn et al. 2009). Malgré des progrès dans la compréhension de la structure et des fonctions du complexe I, les conséquences biochimiques et métaboliques induites lors d'une mutation au sein de ce complexe restent encore mal caractérisées. Ainsi, certaines mutations du complexe I n'affectent pas l'activité NADH:Ubiquinone réductase (Majander, Huoponen et al. 1991). Du fait de son activité de pompage de protons, certaines mutations peuvent induire une diminution de la quantité d'ATP synthétisée (Saada, Bar-Meir et al. 2004). Les mutations dans le complexe I peuvent aussi impacter l'assemblage de ce complexe. Ainsi, dans une étude menée en 2004, Assouline *et al.*, (Assouline, Jambou et al. 2012) ont observé un défaut d'assemblage commun aux patients porteurs de mutations dans la sous-unité NDUFS4 (présence d'un intermédiaire d'assemblage d'environ 830kDa). Cet intermédiaire d'assemblage a également été observé chez des patients porteurs de mutations touchant d'autres sous-unités, telle que NDUFS1 (Iuso, Scacco et al. 2006).

Enfin, le complexe I apparaît comme le principal producteur de ROS mitochondrial (Turrens 2003, Brand, Affourtit et al. 2004, Kudin, Bimpong-Buta et al. 2004) et une étude menée par Verkaart *et al.*, (Verkaart, Koopman et al. 2007) a montré que les fibroblastes de patients porteurs

d'un déficit isolé du complexe I d'origine nucléaire présentaient un stress oxydant (Verkaart, Koopman et al. 2007). Une seconde étude a permis de corrélérer la production de superoxydes à la sévérité du déficit enzymatique induit par la mutation (Verkaart, Koopman et al. 2007). Cependant d'autres études ne retrouvent pas cette corrélation : certains fibroblastes de patients mutés ne présentent pas de stress oxydant malgré une activité NADH:Ubiquinone Réductase très diminuée (Distelmaier, Koopman et al. 2009, Moran, Rivera et al. 2010).

Il paraît donc difficile d'établir une corrélation nette entre l'atteinte biochimique du complexe I et la présence d'un stress oxydant chez les patients.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de traitement curatif qui puisse être proposé aux patients porteurs d'une atteinte du complexe I. De nombreuses études se sont attachées à identifier des molécules thérapeutiques éventuelles mais, là encore, les résultats semblent hétérogènes. La plupart des traitements proposés lors d'un déficit du complexe I sont des molécules antioxydantes. Ainsi, l'idébénone, un analogue du coenzyme Q10, a montré des effets contradictoires au niveau clinique (Carelli, Barboni et al. 1998, Barnils, Mesa et al. 2007), mais aussi au niveau biochimique (Angebault, Gueguen et al. 2011). En effet, l'idébénone ne permet pas toujours un retour de la fonctionnalité de la chaîne, malgré une augmentation de l'activité maximal du complexe I (Angebault, Gueguen et al. 2011). De même, le Trolox, un dérivé de la vitamine E peut augmenter la quantité de complexe I (à la fois correctement assemblé mais aussi désassemblé), augmenter le potentiel de membrane et réduire la production de ROS chez des patients (Koopman, Verkaart et al. 2008, Distelmaier, Visch et al. 2009). Cependant, tous les patients ne semblent pas répondre à ce traitement (Koopman, Verkaart et al. 2008). A l'image du Trolox, le traitement de cinq patients LHON par un dérivé tocotriénol modifié en quinone (EPI743) s'est avéré prometteur (récupération visuelle significative) pour seulement quatre de ces patients (Sadun, Chicani et al. 2012). D'autres voies thérapeutiques basées sur les modulations nutritionnelles et métaboliques sont à l'étude. Par exemple, Schiff *et al.*, (Schiff, Benit et al. 2011) ont démontré que l'utilisation chez la souris Harlequin (souffrant d'un déficit du complexe I) d'un régime enrichi en palmitate réduisait la progression de la maladie. Finalement, la modulation des cofacteurs vitaminiques semble également une piste prometteuse. Ainsi, la supplémentation en précurseur du NAD⁺ (vitamine B3) est de plus en plus étudiée. En effet, la concentration du cofacteur NAD⁺ semble être liée à l'activité du complexe I (Desquirit-Dumas, Gueguen et al. 2013). Le NAD⁺ pourrait être un modulateur essentiel du métabolisme mitochondrial, notamment en tant que cofacteur d'une famille de déacétylases, les sirtuines (Li and Kazgan 2011). L'isoforme mitochondriale SIRT3 régulerait par déacétylation le métabolisme énergétique, la quantité de radicaux libres et l'autophagie (Giralt and Villarroya 2012). L'administration de précurseurs du NAD⁺ (nicotinamide riboside) semble augmenter la fonctionnalité de la chaîne respiratoire (Canto, Houtkooper et al. 2012) et pourrait

corriger les effets d'une myopathie mitochondriale induite chez la souris (Khan, Auranen et al. 2014). La modulation de ces cofacteurs pourrait donc représenter un moyen thérapeutique intéressant pour corriger les déficits du complexe I.

Ces différentes études démontrent ainsi une grande hétérogénéité parmi les patients, à la fois biochimique mais aussi de réponse face aux différentes thérapies proposées. Il semble donc important d'établir une caractérisation biochimique complète de fibroblastes de patients porteurs de différentes mutations du complexe I (aussi bien dans le génome nucléaire que mitochondrial) avant d'envisager l'utilisation de molécules thérapeutiques visant à corriger ces déficits.

Dans une première étude, nous avons investigué les conséquences biochimiques (impact de la mutation sur les différentes activités catalytiques du complexe, fonctionnalité de la chaîne respiratoire, oxydation du NADH, production d'ATP et de ROS) des mutations en fonction de leur localisation au sein des modules fonctionnels (modules N, Q et P). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la production de ROS et à la présence éventuelle d'un stress oxydant, le site de production des radicaux libres dans ce contexte pathologique restant encore largement débattu. Pour cela, nous avons utilisé 11 lignées fibroblastiques issues de biopsie de peau de patients porteurs de mutations mitochondriales et nucléaires au sein des différents modules du complexe I. L'étude fonctionnelle de la chaîne respiratoire a été réalisée par oxygraphie sur cellules perméabilisées et par dosages spectrophotométriques de l'activité maximale du complexe. L'oxydation du NADH a été analysée par la mesure du rapport NAD^+/NADH sur cellules entières ainsi que dans le cytosol (rapport lactate/pyruvate). La quantité cellulaire d'ATP a été mesurée par HPLC. La production de ROS par le complexe I a été évaluée *in vitro* sur fractions enrichies en complexe et la présence d'un stress oxydant, *in vitro* et *in vivo*, a été étudiée en analysant les défenses anti-oxydantes et les dommages liés à ce stress par western blot et dosages du glutathion et des thiols.

Dans notre deuxième étude, les conséquences de l'augmentation du rapport NADH/NAD^+ , observée lors d'un déficit du complexe I ont été évaluées. Tout d'abord, l'acétylation cellulaire et mitochondriale a été estimée par western Blot, tandis que l'acétylation spécifique de certaines cibles de SIRT3 a été déterminée par immunoprécipitation. Un précurseur du NAD^+ , le nicotinamide mononucléotide (NMN), a ensuite été utilisé pour tenter de restaurer le rapport NADH/NAD^+ dans les cellules des patients présentant une mutation dans une sous-unité mitochondriale du complexe I. Les conséquences sur la phosphorylation oxydative et l'activité des complexes I et II, d'une telle restauration, ont ensuite été analysées.

Notre première étude démontre que l'atteinte biochimique du complexe I (activité NADH déshydrogénase, NADH:Ubiquinone réductase ou la respiration liée à ce complexe) diffère en fonction du module muté (modules N, Q ou P). De plus, notre cohorte de fibroblastes peut être dissociée en deux groupes en fonction de la présence ou non d'un stress oxydant. Le premier groupe se caractérise par la présence d'un stress oxydant (révélée par une augmentation des voies de détoxification et une production accrue de ROS lors de la mesure sur complexe isolé). L'analyse par BN-Page montre que le stress oxydant est corrélé à la présence d'un défaut d'assemblage. En effet, dans ces fibroblastes l'oxydation du NADH n'est plus couplée à l'oxydation de la quinone du fait du défaut d'assemblage, générant ainsi un échappement d'électrons et une augmentation du stress oxydant.

Le deuxième groupe se caractérise par l'absence de stress oxydant, un complexe I correctement assemblé et une concentration en ATP cellulaire comparable aux cellules contrôles. Cependant, ces cellules présentent une augmentation du rapport NADH/NAD^+ , notamment dans le compartiment mitochondrial, reflet d'une diminution de l'oxydation du NADH. Ce rapport étant un élément clé dans la régulation du métabolisme mitochondrial, il nous a paru intéressant dans notre seconde étude, d'analyser les conséquences fonctionnelles d'une telle modification. Nous avons ainsi démontré que l'augmentation du rapport NADH/NAD^+ induit par un déficit du complexe I (soit dû à une mutation soit lié à l'inactivation pharmacologique de ce complexe (roténone)) entraîne une hyperacétylation des protéines mitochondriales et plus particulièrement des cibles de sirt3. La correction du rapport NADH/NAD^+ chez ces patients par l'utilisation d'un intermédiaire du NAD^+ , le NMN, réduit le niveau d'acétylation des cibles de sirt3 et augmente ainsi la phosphorylation oxydative. L'activité du complexe I, et la respiration maximale liée à ce complexe sont particulièrement stimulées sous traitement. Le NMN apparaît comme une molécule prometteuse sur le plan thérapeutique dans les déficits du complexe I.

Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency

Géraldine Leman^{1,3}, Naïg Gueguen^{1,2,3}, Valérie Desquirit-Dumas^{1,2,3}, Mariame Selma Kane^{1,3}, Céline Wettervald^{1,2}, Stéphanie Chupin^{1,2,3}, Arnaud Chevrollier^{1,2,3}, Anne-Sophie Lebre⁴, Jean-Paul Bonnefont⁵, Magalie Barth^{1,2,3}, Patrizia Amati-Bonneau^{1,2,3}, Christophe Verny^{1,2,3}, Daniel Henrion^{1,3}, Dominique Bonneau^{1,2,3}, Pascal Reynier^{1,2,3}, Vincent Procaccio^{1,2,3}.

¹ Angers University, Angers, France

² Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers Hospital, F-49000, France

³ UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, F-49000, France

⁴ Genetics Department, CHU Reims, 51092 Reims cedex, France

⁵ Genetics Laboratory, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

To whom correspondence should be addressed: Vincent Procaccio M.D., Ph.D. Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone 33 2 41 35 78 54. Fax 33 2 41 35 58 83. Email ViProcaccio@chu-angers.fr

Word count:

Title: 88 characters (including spaces)

Abstract: 253

Text including figure legends: 5203 words

66 References, 6 figures, 1 table, 2 supplemental figures

Abbreviations

Complex I, CI; Oxidative Phosphorylation, OXPHOS; NADH Dehydrogenase, ND; Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate, NADH; Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD⁺; Flavin MonoNucleotide, FMN; NADH Dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein; NDUFV, NADH Dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein, NDUFS; Adenosine Triphosphate, ATP; Reactive oxygen species, ROS; Leber's optic hereditary neuropathy, LHON; Leigh Syndrome, LS; Adenosine Diphosphate, ADP; polymerase chain reaction, PCR; Reduced glutathione, rGSH; Manganese Superoxide Dismutase, MnSOD; Full Assembly, FA; Assembly Defect, AD; Decylubiquinone, DeQ; Kilo Dalton, kDa; Blue Native Page, BN-Page.

ABSTRACT

Complex I (CI) deficiency is the most common respiratory chain defect representing more than 30% of mitochondrial diseases. CI is a L-shaped multi-subunit complex with a peripheral arm protruding into the mitochondrial matrix and a membrane arm. CI is subdivided into three functional modules relative to their catalytic function: the N, Q and P-modules. In this study, we analysed an array of 11 fibroblast cell lines derived from patients with inherited CI deficiency resulting from mutations in either the nuclear or mitochondrial DNA and impacting these different modules. There was a significant overproduction of reactive oxygen species (ROS) in a subset of mutant cell lines. No relationship between oxidative stress and the level of residual CI enzymatic activity or CI-supported respiration was established. In contrast, blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) revealed a significant reduction of fully assembled CI enzyme on the mutant cell lines with an oxidative stress. Most patients with an assembly defect carried a mutation in the N-module. In addition, we found that ROS production was linked to the oxidation of NADH at the flavin mononucleotide site and not to the quinone-binding site of CI. Indeed, in cell lines with oxidative stress, NADH dehydrogenase activity was partly functional, even though CI was not fully assembled. These findings not only highlight the relationship between CI assembly and oxidative stress, but also show the suitability of BN-PAGE analysis in evaluating the consequences of CI dysfunction. Moreover, these data suggest that the use of antioxidants may be particularly relevant for patients displaying a CI assembly defect.

Keywords: Mitochondria; Mitochondrial diseases; Complex I; FMN site; Oxidative stress; Assembly defects

INTRODUCTION

Complex I (CI) is an L-shaped multi-subunit complex with two major arms, the peripheral segment that protrudes into the mitochondrial matrix and the membrane segment (Hirst, 2013). The enzyme comprises three functional modules: N, Q and P (Hunte et al. , 2010). The N-module is responsible for the oxidation of NADH into NAD⁺. The two electrons generated by this reaction reduce the flavin mononucleotide (FMN), which is non-covalently bound to the N-module (Zu et al. , 2003). In the N-module, the NDUFV1 subunit (responsible for NADH reduction and FMN binding) and the NDUF54 subunit are considered as hot-spots for CI mutations (Pagniez-Mammeri et al. , 2012). The Q-module comprises seven iron-sulphur clusters that ensure electron transfer and the quinone binding/reduction site (Tocilescu et al. , 2010). The proposed quinone-binding site would be at the interface between the hydrophilic (Q-module) and hydrophobic (P-module) domains, with the NDUF52, NDUF57 and NDUF58 subunits at the bottom of the hydrophilic domain, sitting on top of ND1. The NDUF57 subunit, which contains the terminal cluster Fe/S, would be engaged in the quinone reduction, while ND1 would be involved in quinone binding (Sazanov, 2014). The P-module uses the energy released by the electron transfer to pump protons across the inner mitochondrial membrane (Zickermann et al. , 2009). ND2, ND4 and ND5 subunits have been considered as the unique sites of proton transfer; until the recent addition of another site composed of ND4L and ND6 (Hirst, 2013).

CI is also described as the main ROS producer in mitochondria. Several sites have been suggested to be involved in ROS production by CI (Hunte, Zickermann, 2010). Under physiological conditions, the reduced FMN appears as the consensus site of ROS generation (Hirst et al. , 2008, Kussmaul and Hirst, 2006, Pryde and Hirst, 2011). ROS production has also been proposed to take place at the N1a or N2 clusters and at the Q-site (Hunte, Zickermann, 2010). Through its central role in the regulation of the redox state (NADH oxidation), energetic production (ATP synthesis) and ROS production, CI appears as a key regulator of cell metabolism.

Inherited CI deficiencies occur in up to 30% of cases of mitochondrial diseases. The most frequent clinical phenotypes are Leigh syndrome (LS) and Leber's optic hereditary neuropathy (LHON)

(Distelmaier et al. , 2009, Nouws et al. , 2012). The dependence of CI on both mtDNA (mitochondrial) and nDNA (nuclear), the number of subunits as well as its structural complexity, make it difficult to establish a clear relationship between the clinical outcome and the severity of inherited CI deficiency. So far, the majority of studies on CI deficiency have been focused on either nDNA (Breuer et al. , 2013, Distelmaier, Koopman, 2009, Scacco et al. , 2006) or mtDNA mutations in CI subunits (Majander et al. , 1996). However, the cellular or mitochondrial consequences of CI deficiency are still debated. The oxidative stress is also thought to be involved in the disease process (Pitkanen and Robinson, 1996). However, currently, the conditions in which CI deficiency leads to ROS production remains to be clearly determined. Moreover, the mechanisms and the site of ROS production in CI deficiency have not yet been established (Gonzalo et al. , 2005, Valsecchi et al. , 2013).

In our study, we first investigated the impact of nDNA or mtDNA mutations in subunits of the three main modules on enzyme activity, ROS production and structure of CI in a series of 11 patient cell lines. We then analysed the biochemical consequences of CI deficiency by measuring key factors associated with CI activity (NADH/NAD⁺ ratio and ATP content) and by analysing oxidative stress. Hence, a thorough analysis of cellular and mitochondrial metabolism in CI deficiency would provide a better understanding of the consequences of primary CI deficiency on cell physiology, thus allowing the identification of key pathways and candidate molecules for future clinical trials.

MATERIAL AND METHODS

Patients. Prior written informed consent was obtained from patients participating in the study. The presence of the mtDNA mutation and nDNA mutations was analyzed according to (Sarzi et al. , 2007) and (Assouline et al. , 2012). The molecular data of the patients are summarized in Table 1.

Cell culture. Primary skin fibroblasts from 11 patients with inherited CI deficiency and 5 healthy controls were cultured in a medium consisting of 2/3 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM-F12, Jacques Boy Institute of Biotechnology, Reims, France), 1/3 Amniomax (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA, Pasching, Austria), 100µg/ml

sodium pyruvate, and 50 µg/ml uridine (Sigma Aldrich, Lyon, France) at 37°C, 5% CO₂. All experiments were conducted on control and patient fibroblast cultures between passages 6 and 25 so as to avoid artefacts due to senescence (Hutter et al. , 2004).

Mitochondrial isolation and solubilisation of OXPHOS complexes. Mitochondria were isolated from patients and control fibroblasts using digitonin (70µg/10⁶ cells) and differential centrifugations according to (Wittig et al. , 2006). Isolated mitochondria were washed twice in a buffer (Mannitol 220mM, Sucrose, 75mM, Tris-base 10mM, KCl 150mM, EGTA 1mM; pH=7,2), incubated with β-D-Dodecyl maltoside (2g/g protein, 10 minutes, 4°C) and centrifugated at 20,000g (20 minutes, 4°C). Solubilized OXPHOS complexes were collected in the supernatant.

Mitochondrial respiration rate measurements. Respiration rates were measured on permeabilized cells using digitonin at 15 µg/million cells. Cellular oxygen consumption was measured at 37°C on a high-resolution oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria), as described elsewhere (Flamment et al. , 2009, Guillet et al. , 2011).

Mitochondrial enzymatic activities. The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes were measured at 37°C on an UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco). NADH Ubiquinone Reductase activity (NUR reaction) was measured as described (Angebault et al. , 2011, Medja et al. , 2009). NADH dehydrogenase activity was measured following NADH oxidation at 340nm using hexammineruthenium (HAR) as an electron acceptor (NADH:HAR reaction) (Gavrikova et al. , 1995). Assays were realized in a KH₂PO₄ buffer (20mM, pH 7.5) with 50µM NADH, 3.5mM HAR, 4µg of solubilized OXPHOS proteins. Rotenone (10 µM) and Diphenyleneiodonium (DPI, 5µM) were used to control the specificity of the NUR and NADH:HAR reactions, respectively. Citrate synthase activity was measured as described (Kirby et al. , 2007).

Measurements of ROS production. The hydrogen peroxide level was measured on solubilized OXPHOS complexes using the Amplex red-horseradish peroxidase (HRP) method (reading at 572nm).

SOD was used to convert O_2^- to H_2O_2 . Assays were performed in 20 mM KH_2PO_4 (pH 7.5), 30 μ M NADH, 2 units/ml HRP, 10 μ M Amplex red, 6 units/ml of SOD, and 75 μ g of solubilized mitochondrial complexes. Decylubiquinone (100 μ M) and rotenone (5 μ M) were added when indicated (Keeney et al. , 2006)

Western Blotting and BN-PAGE analysis: Cellular proteins (30 μ g) solubilized in a denaturing buffer were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (GE Healthcare) as described elsewhere (Guillet, Gueguen, 2011) and incubated with primary monoclonal antibodies : voltage-dependent anion channel (VDAC) or manganese superoxide dismutase (MnSOD) (MitoSciences, Abcam). CI assembly was analyzed using Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) according to (Nijtmans et al. , 2002) using monoclonal antibodies raised against NDUFV1 (Eurogentec), NDUFS1 (SantaCruz) and NDUFB6 with complex II 70kDa subunit (Mitosciences, Abcam) as loading control.

Reduced and total glutathione (GSH) and thiol measurements: The total and reduced glutathione were measured as described (Desquiret-Dumas et al. , 2012).

NADH/NAD⁺ ratio measurements: Cellular NADH and NAD⁺ concentrations and the cytosolic NADH/NAD⁺ was determined as described in (Desquiret-Dumas et al. , 2013).

Determination of ATP level: adenylate was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on 4.10^6 cells according to (Benarbia Mel et al. , 2013).

Statistical analysis: At least two biological replicates of each fibroblast cell line were analysed. Statistical comparisons between control (Ctl) and mutant fibroblasts or between fully assembled (FA) and assembly defect (AD) were performed with the Mann–Whitney U test and considered statistically

Module	Cell lines	Mutation				Clinical phenotype	Reference
		Genome	Genes	% Mutation	Nucleotide Position		
Q-Site	P1	mtDNA	<i>MT-ND1</i>	Homop	m.3460G>A	LHON	This study
	P2			Homop	m.3697G>A	LS	This study
	P11	nDNA	<i>NDUFS7</i>	Homoz	c.17-1167C>G	LS	(Lebon et al. , 2007)
P-Module	P3	mtDNA	<i>MT-ND4</i>	Homop	m.11778G>A	LHON	(Angebault, Gueguen, 2011)
	P4			Homop	m.11778G>A	LHON	This study
	P5		<i>MT-ND6</i>	Homop	m.14484T>C	LHON	(Angebault, Gueguen, 2011)
	P6			Homop	m.14487T>C	LS	This study
N-Module	P7	nDNA	<i>NDUFV1</i>	Compound Heteroz	c.156-2A>G, c.731A>G	LS	This study
	P8			Compound Heteroz	c.1162+4A>C, c.1156C>T	LS	This study
	P9		<i>NDUFS4</i>	Homoz	c.291delG	LS	(Assouline, Jambou, 2012)
	P10			Homoz	c.178-528del	LS	(Assouline, Jambou, 2012)

TABLE I. Clinical and molecular description of patients with inherited CI deficiency.

Homop: Homoplasmic; Heteroz: Heterozygous; LHON: Leber Hereditary Optic Neuropathy; LS: Leigh syndrome.

Results were represented as men \pm SEM. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05^*$, $p < 0.001^{**}$, $p < 0.0001^{***}$.

Figure 1

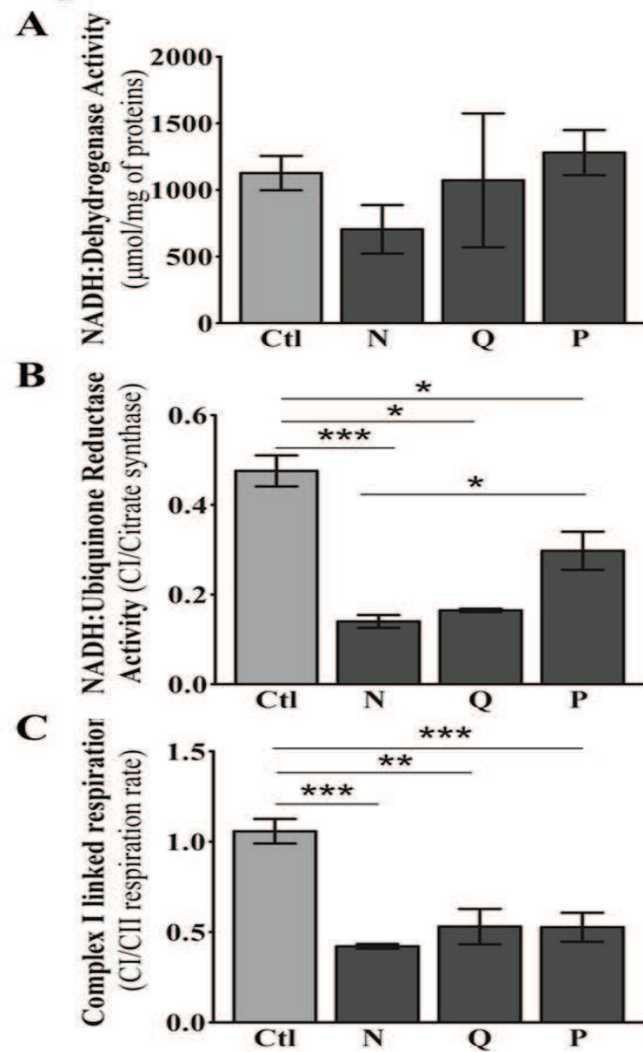


FIGURE 1. Complex I functionality.

A: NADH dehydrogenase activity (NADH:HAR) in CI-deficient and control cell lines. NADH:HAR activity was determined by spectrophotometric analysis using HAR as electron acceptor. Results are expressed as nmol of NADH per mg of protein and per minute.

B: NADH Ubiquinone Reductase (NUR) in CI-deficient cell lines. Maximal CI and citrate synthase activities were determined by spectrophotometric analysis. Data are expressed as the ratio of CI/citrate synthase activity.

C: Functional analysis of CI-linked respiration in CI-deficient cell lines. CI and complex II-supported respiratory rates were determined by oxygraphic measurements. Results are expressed as ratios of CI/complex II-linked respiration.

RESULTS

Mutation in each module alters differently CI activity:

CI is subdivided into three different modules with their own catalytic activities: the N-module (NADH oxidation), the Q-module (quinone reduction) and the P-module (proton pumping (Hunte, Zickermann, 2010)). We hypothesized that mutations targeting different CI subunits will differently alter CI function depending on the module considered. Based on this hypothesis, a total of 11 mutant cell lines were selected: four cell lines carried a mutation within the N-module (NDUFV1 or in NDUFS4 subunit, P7 to P10), four others harboured a mutation in the P-module (ND4 or ND6 subunits, P3 to P6) and the three last had a mutation in the Q-site (ND1 or NDUFS7 subunits, P1, P2 and P11, Table 1). First, CI catalytic enzyme activities (NADH dehydrogenase activity, NADH:HAR reaction, Figure 1A), NADH ubiquinone reductase activity, NUR, Figure 1B and complex I-supported respiration, Figure 1C) were measured on mutant and control fibroblast cell lines.

The CI catalytic impairment observed was dependent on the module affected by the mutation. First, as the N-module contains both the substrate NADH and the cofactor FMN binding sites, we expected that a mutation in this module should impair NADH binding and oxidation. Our results indicated that a mutation in N module only slightly altered the NADH dehydrogenase activity (of about 40% compared to control cells, $p=0.1416$, Figure 1A). This reduction was associated with a decrease in whole CI activity, i.e. NUR (-80%, Ctl vs N $p=0.0143$ Figure 1B) and complex I-supported respiration (-40%, Ctl vs N $p=0.0047$ Figure 1C).

In the Q-site mutant cell lines, the NADH dehydrogenase activity was not affected. By contrast, NUR activity was reduced of about 80% (Ctl vs Q $p=0.0253$). This could result from the role of ND1 and NDUFS7 subunits in the binding of ubiquinone (Tocilescu, Zickermann, 2010). In these cell lines, coupled to the decreased NUR reaction, a 50% drop in CI supported respiration was observed (Ctl vs Q $p=0.0112$).

Finally, in P-module mutant cells, the NADH dehydrogenase activity was not affected and the NUR was only slightly decreased. In line with this observation, Liolitsa *et al.* (2003) reported no alteration in NUR activity in two patients with mutations in the ND5 subunit of the P-module (Liolitsa *et al.* , 2003). However, in these cells lines, CI linked respiration was severely decreased (approximately 50

Figure 2

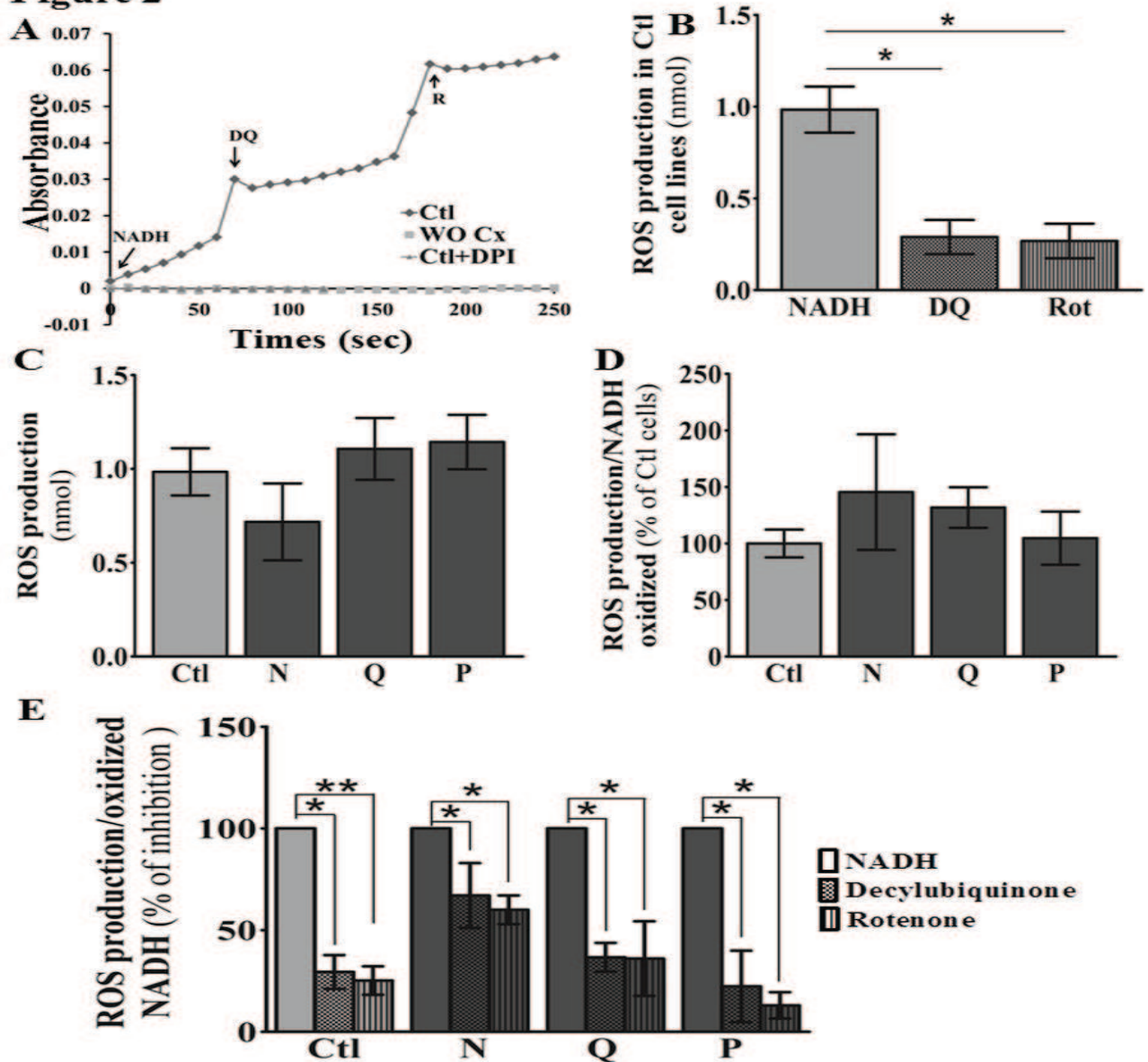


FIGURE 2. ROS production by CI.

A: Representative curves of the kinetic of ROS production by CI in control fibroblast cell lines. ROS production was measured by spectrophotometric analysis using the HRP/Amplex Red in presence of SOD at 572 nm. When indicated, NADH, decylubiquinone (DQ) and rotenone (R) were added. **B:** ROS production in control cell lines. ROS production was measured by spectrophotometry, using NADH (N), decylubiquinone (D) and rotenone (R). Results are expressed as nmol of H₂O₂ produced per mg of proteins per minute. **C:** ROS production by CI in patient cell lines. ROS production was determined spectrophotometrically using the Amplex Red in the presence of SOD. Results are expressed as nmol of H₂O₂ produced per mg of proteins per minute. **D:** ROS production by CI per NADH oxidized in CI-deficient and control cell lines. Data are expressed as ratio of H₂O₂ production per oxidized NADH compared to controls. **E:** CI H₂O₂ production in CI-deficient cell lines. ROS production was measured using NADH (N), decylubiquinone (D) and rotenone (R). Results are represented in percentage of inhibition of H₂O₂ production according to the different substrates.

%, Ctl vs P $p=0.0047$). The 30 % reduced NUR activity observed in these cells lines could hardly explain by itself the 50% decrease in the CI linked respiration. While the measurement of maximal CI activity (either NAD:HAR or NUR reactions) on solubilised complexes did not take into account the proton pumping activity, respiration rate measurement did. Thus, the decrease in respiration rate in the P-module mutant cells could be partly due to an impaired proton translocation. Thus, these results demonstrated that, regardless of the mutation analysed, the electron transfer from NADH to the quinone and further to complexes III and IV, was impaired. However, it relied on different causes according to the location of the mutation, i.e. NADH oxidation (N-module), quinone reduction (Q-Site), or proton pumping (P-Module).

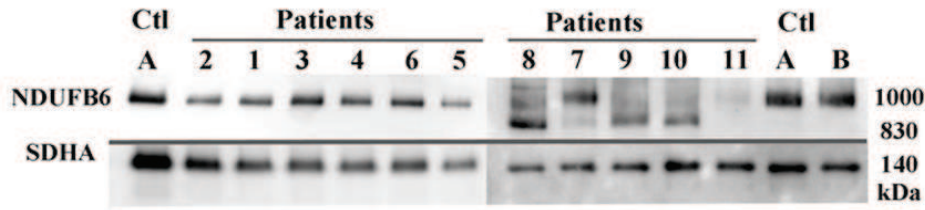
In the N-module mutant cells, the FMN site is responsible for the production of ROS and DQ did not reduce it:

To gain insight into the mechanism and site of ROS production, we used solubilised CI from our cell lines presenting different impaired catalytic activities. Figure 2A shows a representative Amplex Red measurement with the effects of substrates and products of the NADH Ubiquinone Reductase reaction on superoxide production. First, ROS production was initiated by the addition of NADH (diamond-shaped curve, Figure 2A). DPI, which specifically reacts with the flavin (Majander et al. , 1994, Ragan and Bloxham, 1977), abolished both NADH oxidation and ROS production (Triangle-shaped curve, Figure 2A), demonstrating the specificity of the measurements. In absence of any complexes (background rate, square-shaped curve in Figure 2A), no ROS production could be detected (square plots, Figure 2A). The CI turnover was stimulated by DQ addition (i.e. increasing NADH oxidation) to test the ROS production mediated by short-lived catalytic intermediates. Finally, Rotenone (R, Figure 2A) was added to increase semiquinone species (Burbaev et al. , 1991).

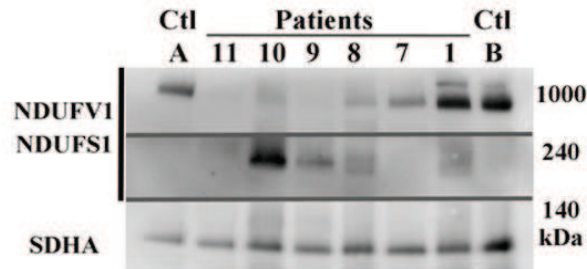
Using this model, ROS production was first analyzed on CI solubilized from control cells (Figure 2B). NADH stimulated the ROS production but neither R nor DQ addition increased it. These results did not support a ROS production by short-lived catalytic intermediates (semiquinones) or the involvement of ubiquinone reduction itself. Rather DQ addition slowed down the ROS production as (reduction of approximately 70% of H_2O_2 production, Figure 2B, DQ). On one hand, the

Figure 3

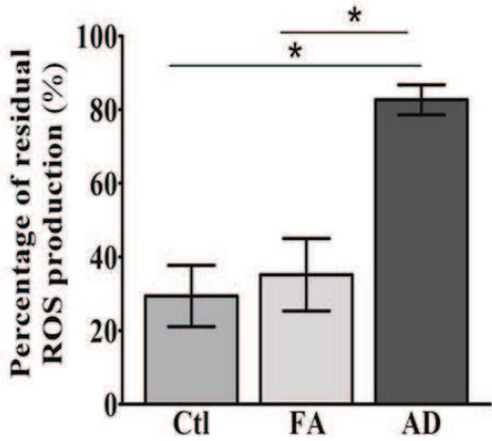
A



B



C



D

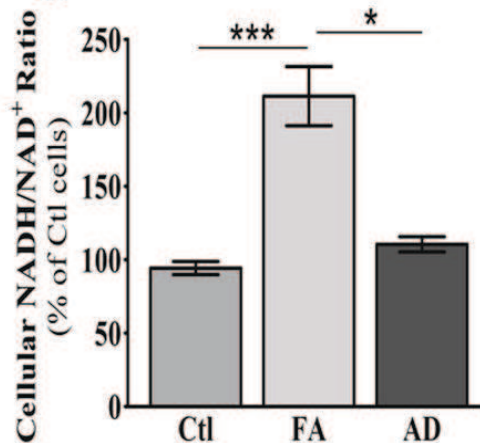


FIGURE 3. Link between the lack of decylubiquinone reduction and CI assembly

A, B: Structural analysis of CI by BNPage. Immunodetection of CI with the NDUF6 (A) and NDUFV1 plus NDUFS1 (B) antibodies and of complex II with the SDHA antibody as loading control.

C: Residual ROS production in CI-deficient in mutated and control cell lines. ROS production was measured by spectrophotometry using NADH. Results are represented in residual ROS production after DQ addition. Fibroblast cells are pooled according to their CI assembly profile.

D: Cellular NADH/NAD⁺ ratio. NADH and NAD⁺ levels in CI-deficient cell lines was determined by spectrophotometry. Data are expressed NADH/NAD⁺ ratio per million cells and represented as percentage of control value.

NAD^+/NADH ratio determines the reduction state of the FMN (Birrell and Hirst, 2013). On the other hand, O_2 binding and reduction at the FMN site implies a reduced flavin and a nucleotide-free binding site (Hirst, King, 2008, Keeney, Xie, 2006, Kussmaul and Hirst, 2006). Thus, the sensitivity of ROS production on the NADH/NAD^+ ratio and NAD^+ concentration strongly pointed out the FMN as the main site of ROS production by CI. So the ROS production was investigated on CI mutant cells. As shown in Figure 2C, the ROS production upon NADH addition was not significantly higher in mutant cells compared to controls. To take into account the slight decrease of NADH dehydrogenase activity observed in N-module mutated cells (Figure 1A), the ROS production was normalized per the amount of NADH oxidized (Figure 2D). Even after this standardization, there was no significant difference in ROS production in mutant cells compared to controls, regardless of the mutated module. However, when further investigating the effects of increasing the turnover through DQ addition, two different profiles were obtained (Figure 2E). First, in both P-module and Q-site mutated cells, DQ decreased the ROS production by roughly 60% and 75%, respectively ($p=0,0369$ for both Q and P). In patient p11 (mutated in NDUFS7 subunit), the addition of DQ only decreased the ROS production by 24% (Figure S11). Thus, the addition of DQ in the P-module and ND1 mutant cell lines could increase the NADH oxidation, thereby decreasing ROS production. On the contrary, in N-module mutated cells, the addition of DQ only faintly inhibited the ROS production (NADH vs DQ $p=0,0139$). In this group, one patient (p7) displayed a 100% inhibition of ROS production by DQ, compared to the inhibition average of 18 % in patient cells p8 to p10 (Figure S11).

Thus, in patients p8 to p11 (mutated in N or Q), DQ failed to shut down the ROS production. This result suggested a quinone binding and/or reduction impairment in these patients. In these cells, the mutations were not located at the quinone binding site or at Fe/S clusters. This could indicate that the oxidation of NADH at the N-module was not connected to DQ binding or reduction at the Q-site.

In mutant cells, lack of quinone reduction is correlated to CI assembly defect: We further investigated if the disconnection between the NADH oxidation and the quinone reduction. could be due to a CI assembly defect. A BN-PAGE analysis was performed on patient cell lines (Figure 3A). NDUF6 hybridation (targeting a subunit in the membrane arm of CI) showed a major band at roughly 1MDa,

Figure 4

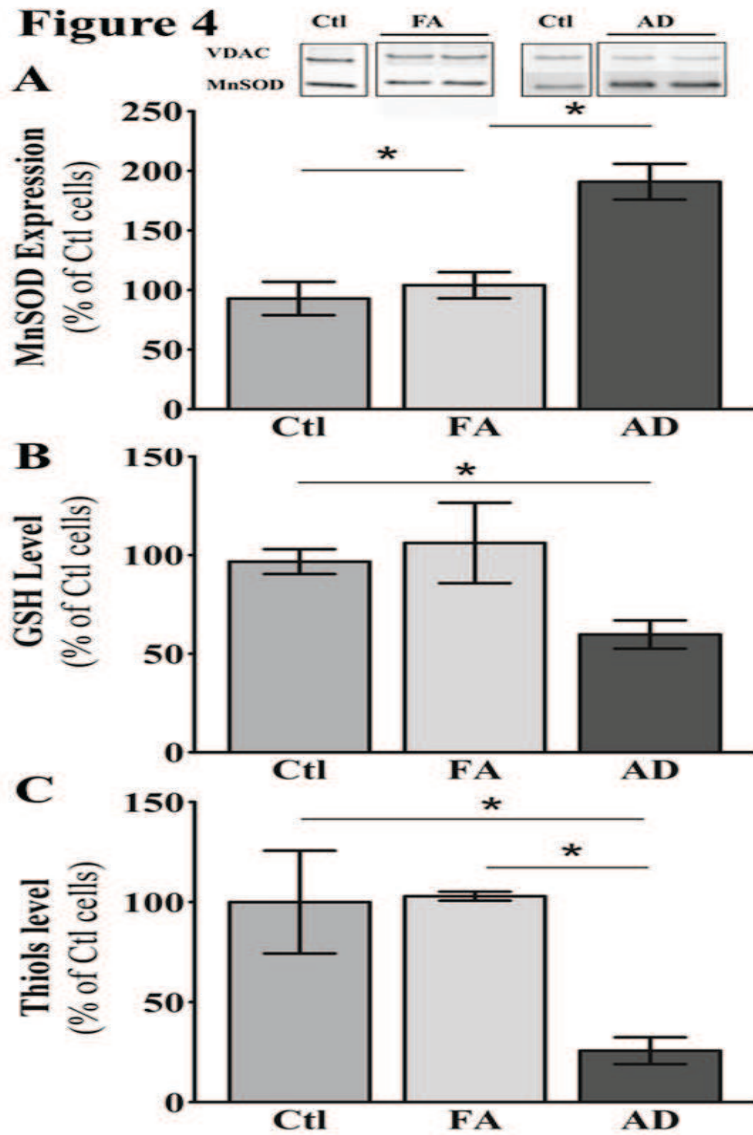


FIGURE 4. Study of oxidative stress *in vivo*.

A: Expression of mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) in CI-deficient cell lines. The expression of MnSOD was determined by Western blotting with VDAC as loading control.

B: Reduced glutathione (GSH) levels in CI-deficient fibroblast cell lines. GSH was quantified by mass spectrometry. The results are expressed as the amount of reduced glutathione per million cells, compared to controls.

C: Thiol level in CI-deficient and control fibroblast cell lines. Thiol level was quantified by spectrophotometry. The results are expressed as the amount of reduced glutathione per mg of proteins, compared to controls.

corresponding to the holoenzyme (fully assembled complex I) in P-module and Q-site mutant cell lines and in p7 cells (mutated in N-module, NDUFV1). Among the Q-site mutated patients, both p1 and p2 (mutations in ND1 subunit) presented a slight reduction of the quantity of CI holoenzyme (15% and 20%, respectively) without assembly intermediates. In p7, a faint band at 830kDa, corresponding to a late-stage assembly intermediate, was observed but the 1MDa band was largely predominant. Thus, CI was almost fully assembled in these cell lines named FA (Full Assembly) for the rest of the study.

By contrast, p8 to p10 (N-module mutated cells) and p11 (mutated in the NDUFS7 subunit of the Q-site) had a sharp reduction of fully assembled CI holoenzyme and will be named AD (Assembly Defect). The p11 cells, (mutated in NDUFS7 subunit implicated during the first stage of CI assembly), only presented a severe reduction of the holoenzyme. The mutations in the N-module induced a nearly undetectable level of holoenzyme and a clear accumulation at ~830kDa subcomplex. CI assembly in these patients was further analyzed using NDUFS1 and NDUFV1 (two subunits of the N-module) antibodies (Figure 3B). Additional assembly intermediates at roughly ~240kDa were observed for p8, p9, p10. Altogether, these results showed that the N-module was not connected to other P and Q modules in these cells. The CI assembly profiles were then compared with the effect of DQ addition on ROS production previously measured (Figure 3C). The FA group, including p7, displayed a significant reduction of ROS production by CI upon DQ addition (-64.8%, figure 3C; details on S11). On the contrary, in the AD group, ROS production was only slightly inhibited by the addition of DQ (-17.3%, AD vs Ctl $p=0.0319$; AD vs FA $p=0.0452$).

Although unconnected, this N module seemed to preserve NADH dehydrogenase activity. Indeed, on solubilized CI, NADH dehydrogenase activity was still measurable (Figure 1A). To reinforce this hypothesis, the cellular NADH/NAD⁺ ratio was determined in the different mutant cells (Figure 3D). In the FA group, the cellular NADH/NAD⁺ ratio showed a two-fold increase compared to controls while the NADH/NAD⁺ ratio was similar in both AD group and controls (AD group vs Ctl 110.4 %). This result strongly suggested that the N-module was still functional in AD and accounted for the preservation of mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio in this group.

Figure 5

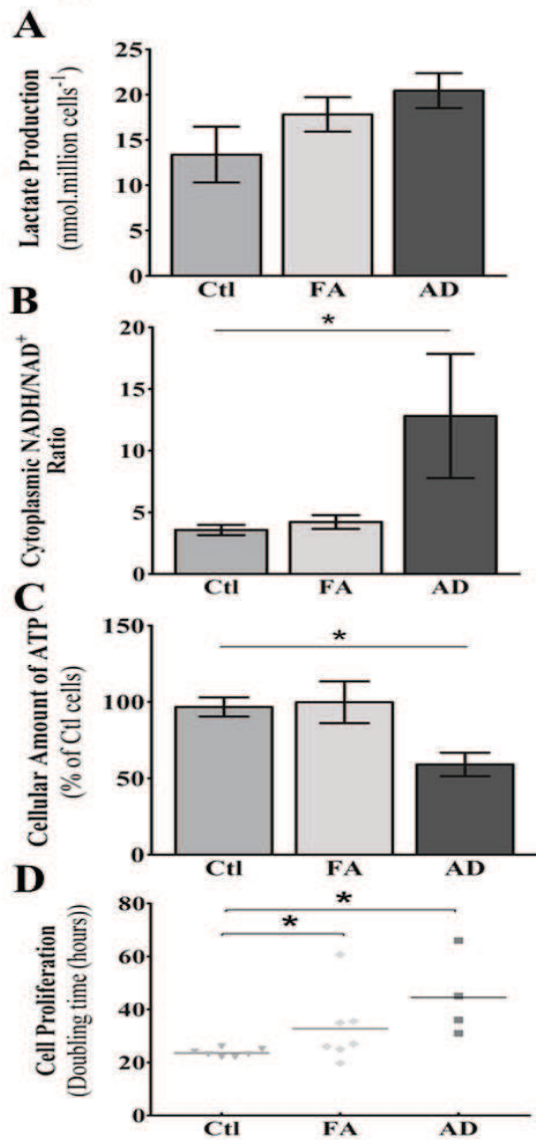


FIGURE 5. ATP and lactate production, and NADH/NAD⁺ ratio.

A: Lactate concentration in CI-deficient cell lines determined by fluorometry. Results expressed as lactate levels in mmol per million cells.

B: NADH and NAD⁺ ratio in the cytoplasmic compartment of CI-deficient cell lines.

C: ATP level in CI-deficient cell lines determined by HPLC. The results are expressed in pmol of ATP per million cells compared to controls.

D: Cell proliferation in CI-deficient cell lines. Results are represented as cellular doubling time in hours.

In the AD group, the strong decrease in NUR activity (-80%) could not be related to the small decrease in NADH dehydrogenase activity. The assembly defect observed in AD mutated cells would explain the physical inability of quinone to accelerate the electron transfer, leading to a drastic CI deficiency.

The assembly defect of CI is linked to oxidative stress

In the AD group, the assembly defect together with the residual NADH oxidation present in these cells would initiate the electron transfer by CI. However, as reduced FMN could not be re-oxidized by electron transfer to the quinone due to the disconnected module, it would consequently lead to ROS overproduction. Thus, to investigate the presence of an oxidative stress in these cell lines, the expression of MnSOD was measured by Western Blot (Figure 4A). No change in the expression of MnSOD was observed in FA cells while in AD cells, it was two-fold increase compared to control cell lines (Figure 4A Ctl vs AD $p=0.0143$; FA vs AD $p=0.0143$). Superoxide detoxification by MnSOD is followed by hydrogen peroxide reduction by glutathione peroxidase. This reaction is coupled to the oxidation of glutathione (Koopman et al. , 2010). Total level of glutathione (not shown) and reduced GSH were unchanged in FA cells compared to control cell lines (Figure 4B). In AD cells, the level of GSH was decreased by 30% (Figure 4B; Ctl vs AD $p=0.0209$), while total glutathione was not modified (not shown). This suggested an elevation of mitochondrial ROS production *in situ*, which is supported by a higher MitoSox fluorescence in AD cells vs Ctr and FA (Figures SI2). We then investigated the cellular consequences of ROS overproduction by measuring the level of protein thiols. The level of cellular thiols was significantly reduced (-70%, Ctl vs AD $p=0.0339$; FA vs AD $p=0.0253$) in AD cells compared to controls or FA cell lines (Figure 4C) suggesting the presence of an oxidative stress in AD.

Oxidative stress modulates ATP production and cell growth.

CI contributes to the protonmotive force essential for ATP synthesis. In cells, most of ATP is produced by two metabolic pathways: the aerobic oxidative phosphorylation in mitochondria and the anaerobic glycolysis in the cytoplasm. Oxidative stress has been shown to regulate glycolytic metabolism (Colussi et al. , 2000, Grant, 2008, Shi et al. , 2009). We therefore investigated whether a

Figure 6

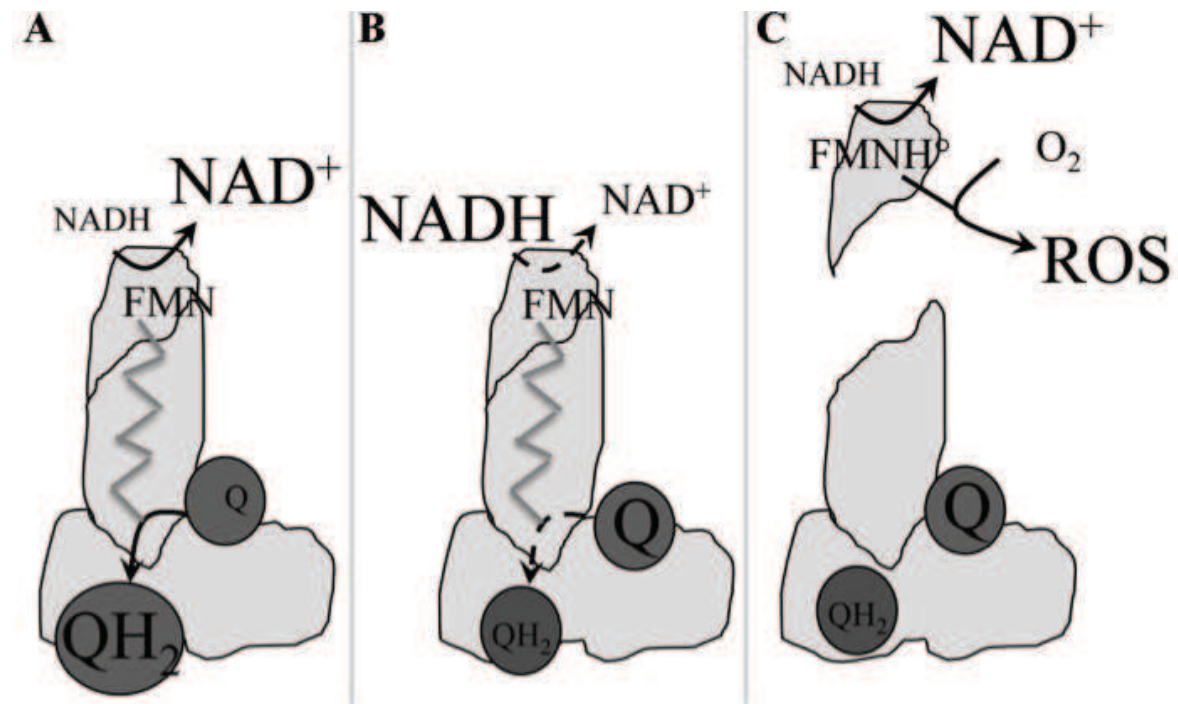


FIGURE 6. Schematic representation of the mechanism of ROS production by complex I in Ctl and mutant cell lines.

A: In Ctl cell lines: NADH oxidation by complex I led to quinone reduction (QH₂).

B: In FA cell lines: Decrease of complex I activity led to NADH and quinone accumulation (Q).

C: AD cell lines: The residual NADH oxidation through the N-module led to the formation of Flavin MonoNucleotide Semiquinones (FMNH[•]) implicated in ROS production.

mutation in CI subunits might lead to a metabolic switch between aerobic and anaerobic glycolytic pathways. The lactate production (Figure 5A) and the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio (Lactate/Pyruvate ratio, Fig. 5B) were determined in the different cell lines. Lactate production was not significantly increased by at least 15 % in all mutant cells, revealing a metabolic switch towards glycolysis. However, the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio was increased more than three-fold in the AD fibroblasts ($p=0.0339$) whereas in the FA fibroblasts, this ratio was similar to the controls. An increase in NADH/NAD⁺ ratio would indicate a limitation of NADH recycling through the LDH reaction, in turn inhibiting glycolysis and affecting the ATP synthesis. The cellular ATP level was therefore measured on the fibroblast cell lines (Figure 5C) and was equivalent to that of controls in the FA cells, whereas in the AD cells, it was reduced by roughly 50% ($p=0.0209$). Thus, in the fibroblasts presenting an oxidative stress, the anaerobic glycolytic pathway was fully enhanced, as revealed by an elevation of both lactate level and cytosolic NADH/NAD⁺ ratio. The reduction of ATP production may be due to the inhibition of anaerobic glycolysis through cytosolic acidification, i.e. the increase of NADH/NAD⁺ ratio. By contrast, in the FA cells, the increase of anaerobic glycolysis was sufficient to maintain an ATP level comparable to control cells.

We also investigated the metabolic consequences of the variations of the ATP level and the NADH/NAD⁺ ratio on cell proliferation. The doubling time was significantly higher in both FA and AD cell lines. (1.5 times greater in AD ($p=0.045$) and about two times higher in FA ($p=0.0058$) (Figure 5D) indicative of a reduced cell growth in mutant cells.

DISCUSSION

Primary CI deficiency leads to an heterogeneous group of diseases. For a while, at the genetic point of view, mitochondrial disorders due to nuclear mutations have been considered to be more severe than the one caused by mtDNA mutations (Rubio-Gozalbo et al. , 2000). However, latter studies have shown that mtDNA mutations are often associated with severe clinical phenotypes (Bannwarth et al. , 2012). No clear correlation between the biochemical consequences of CI deficiency and the genome impacted by the mutation (nuclear or mtDNA) has been made. The overproduction of ROS has been suggested to be part of the disease process and the severity of the pathology (Verkaart et al. , 2007). However, the site and the mechanism of ROS production by CI need to be clarified.

In this study, we have investigated the ROS production by CI and its biochemical consequences in a series of 11 patient fibroblast cell lines subdivided into the 3 groups according to the mutation location in CI modules (N, P and Q). We showed that, in patient fibroblasts, FMN appears as the main site of ROS production by CI. This ROS production can be inhibited by quinone binding, which accelerates the oxidation of NADH to NAD⁺. However, in patient cells with a CI assembly defect, quinone binding no longer increases NADH oxidation, leading to an oxidative stress.

In CI deficiency, ROS production is thought to be link to impaired NUR activity. Verkaart *et al.*, (2007) have shown that ROS production in CI deficient fibroblasts is inversely correlated to CI activity (Verkaart, Koopman, 2007). Likewise, in cybrid cells carrying LHON mutations, ROS overproduction was observed in cells with the most lower NUR activity (Beretta et al. , 2006). However, the literature concerning ROS production by CI is still controversial. Indeed, Iuso *et al.*, did not retrieve a clear correlation between ROS production and NUR activity (Iuso et al. , 2006). In our study, in P-module mutated cells, the quinone reduction was only slightly impaired (slight reduction of NUR activity) and, as it should be expected, no cellular oxidative stress was observed. In the Q-site mutated cells, a strong impairment of NUR activity was observed without oxidative stress, except for cells NDUFS7 mutated patient. Thus, the mitochondrial ROS overproduction was not correlated to the degree of NUR deficiency. Other studies claimed that a CI disassembly could cause ROS overproduction due to the blockade of electron transfer (Iommarini et al. , 2013).

In the N-module mutated cells, the NUR activity was strongly reduced (as mutations of the Q-site); and an assembly defect characterized by two assembly intermediates of roughly ~830kDa and ~240kDa was present. Mutations in the N-module (NDUFS4, NDUFV1 and NDUFS6 subunits) have been previously associated with the accumulation of these subcomplexes (Kirby, Thorburn, 2007, Lazarou et al. , 2007, Ugalde et al. , 2004). The latter small subcomplex, containing at least the NDUFV1 and NDUFV2 subunits, corresponds to the N-module (Lazarou, McKenzie, 2007) and preserved an NADH dehydrogenase activity as described in (Calvaruso et al. , 2012, Valsecchi et al. , 2012). Similarly, in our study, the NADH dehydrogenase activity was almost conserved in these cell lines, while the NUR activity was significantly decreased. This indicated an impairment of the quinone reduction in AD cells, which could be responsible for a defect in FMNH₂ re-oxidation. This could trigger an oxidative stress (Esterhazy et al. , 2008). In our study, AD patients, including the NDUFS7 mutated cells, presented an oxidative stress (significant induction of the expression of MnSOD and a decrease in both reduced glutathione and protein thiol levels). Interestingly, the study of Verkaart *et al.* (2007) also showed a strong correlation between CI assembly and ROS production (Verkaart, Koopman, 2007). Recently, it was suggested that mitochondrial ROS overproduction was linked to the accumulation of CI matrix arm intermediates in mouse models (Miwa et al. , 2014); which favors the involvement of the N-module in ROS production.

However, the sites of ROS production by CI are still debated. Among them, the reduced FMN in the N-module and semiquinones in the Q-site appear as the most relevant (Bazil et al. , 2014, Birrell et al. , 2009, Hirst, King, 2008). Our *in vitro* study demonstrated that high CI turnover due to the addition of decylubiquinone did not increase the ROS production, even when the quinone binding was impaired (Q-site mutated cells). These results did not support the implication of short-lived catalytic intermediates in ROS production. In addition, rotenone, selectively blocking the quinone reduction by antagonizing the semiquinone intermediates (Degli Esposti, 1998), did not modify ROS production. Altogether, these observations did not argue for the production of semiquinone species.

By contrast, our results demonstrated that increasing NAD⁺ level by the stimulation of CI turnover inhibited ROS production in Ctl and FA cells. ROS production by FMN site is highly

dependant on NADH/NAD⁺ ratio and NAD⁺ level (Birrell et al. , 2011). Thus our study strongly suggested that the reduced flavin is the main ROS producer in CI and it has already been observed in physiological conditions by (Galkin and Brandt, 2005, Kussmaul and Hirst, 2006). Moreover, CI is implicated notably in the etiology of mitochondrial diseases and neurodegenerative disorders (Procaccio et al. , 2014). In this line, ROS overproduction due to the FMN reduction was observed in Parkinson disease (Keeney, Xie, 2006) and in glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cells (Liu and Schubert, 2009). Our results show that the addition of decylubiquinone did not reduce ROS production in the AD cells suggesting that the ROS overproduction can be linked to the reduced FMN. Based on these results, we hypothesized that three conditions can be encountered. First, in control cells, CI fully NADH oxidation and the quinone binding allows an efficient energy transfer and high turnover, leading to low NADH/NAD⁺ ratio and low ROS production (Figure 6A). Second, in FA cells, the NADH oxidation is slowed down, due to impaired proton pumping (P-module mutated cells) or slower quinone reduction rate (ND1 mutated cells), but the connection between both N and Q modules allows the re-oxidation of the reduced FMN (Figure 6B). Third, in AD patients, the N-module still partly oxidized NADH, but its disconnection may explain the physical inability of quinone to accelerate electron transfer, and thus re-oxidation of the FMNH₂ (Figure 6C), leading to oxidative stress.

Fibroblasts from patient with a mutation in the NDUFS7 subunit, though mutated in the Q-site, presented an increase in ROS production. One hypothesis could be that the ROS production is linked to the CI assembly defect, as observed in the N-module mutated cells. Another hypothesis would be that in NDUFS7 patients, electrons can not be effectively transferred to the quinone impairing the FMNH₂ re-oxidation leading to ROS overproduction. Indeed, NDUFS7 is involved in the formation of the N2 iron-sulfur cluster and a mutation in this subunit has been shown to decrease the affinity for ubiquinone (Jaokar et al. , 2013) and to increase ROS production (Verkaart, Koopman, 2007). Whatever the hypothesis, in both cases, the mechanism explaining ROS production is linked to CI capacity to re-oxidize the FMNH₂. The ND1 subunit (which also belongs to the Q-site) participates to the anchorage of this module to the membrane and rather displays an architectural than a catalytic role. In our study, ND1 mutation is not linked to oxidative stress. However, it should be noticed that

cell lines were cultured in glucose-rich medium (2g/l). Previously, it has been shown that a mutation in ND1 subunit lead to ROS production in metabolic stress conditions when culturing mutant cells in galactose rich-medium (Floreani et al. , 2005) or when inducing cell differentiation (Wong et al. , 2002). In these conditions, the increase of NADH oxidation by CI would further enhance the FMN reduction, and trigger the ROS production (Floreani, Napoli, 2005, Wong, Cavelier, 2002).

ROS production has been considered as a determinant parameter in the disease process and the severity of CI disorders (Pitkanen and Robinson, 1996). Widely, ROS overproduction by CI was observed in neurological diseases (such as Parkinson) (Keeney, Xie, 2006) and in ageing process (Miwa, Jow, 2014). The disruption of CI assembly was tightly connected to a decrease of oxidative metabolism and a mitochondrial ROS overproduction in aged mouse models (Miwa, Jow, 2014). Our study goes further into the mechanism of ROS production and pointed out the implication of the reduced FMN. The understanding of the mechanism of ROS production in CI deficient cells should be of particular interest for the development of new therapeutics related to antioxidant treatment. This aspect opens access to new therapeutic strategy in various etiological disorders and underlines that the BN-Page should be useful for devising new interventions to treat ROS related diseases. For instance, chronic treatment of CI deficiency with anti-oxidant has been reported to modulate CI activity in nDNA mutated patient cells (Distelmaier, Koopman, 2009, Koopman et al. , 2008). However, contrasted results have been obtained with antioxidants (Angebault, Gueguen, 2011). As previously stated by distelmaier *et al.* (2009), only patients with an assembly defect may benefit from an antioxidant therapy (Distelmaier, Koopman, 2009). Targeting CI assembly could represent an alternative issue. As an example, lowering the glucose content in the culture medium of MELAS cells has been shown to partly restore CI assembly (Desquiret-Dumas, Gueguen, 2012).

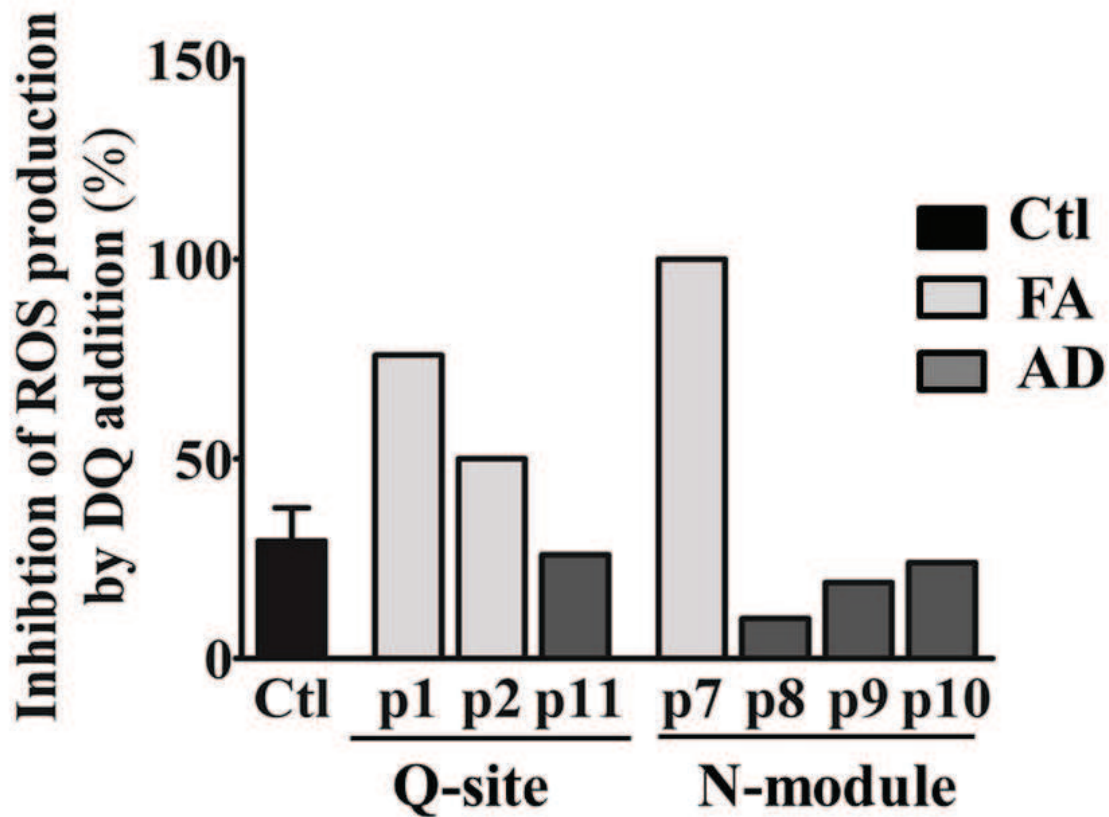
Our findings suggest that the overproduction of ROS may contribute to the severity of CI-related disorders and supports the hypothesis that biochemical and metabolic consequences of CI dysfunction rather depend on the ability of the defective complex to transfer efficiently electrons to the quinone than on the subunit or on the module affected. To our knowledge, this is the first demonstration of a clear relationship between the CI assembly level and ROS overproduction. Moreover, the level of CI assembly appears to be a crucial element in designing a specific therapeutic strategy for inherited CI

deficiency. However, further investigations would be needed to evaluate the potential of antioxidant therapies directed against diseases involving CI assembly defect.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the following research institutions : "Fondation pour la Recherche Médicale", "Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels", "Retina France", "Ouvrir les Yeux", and "Association contre les Maladies Mitochondriales".

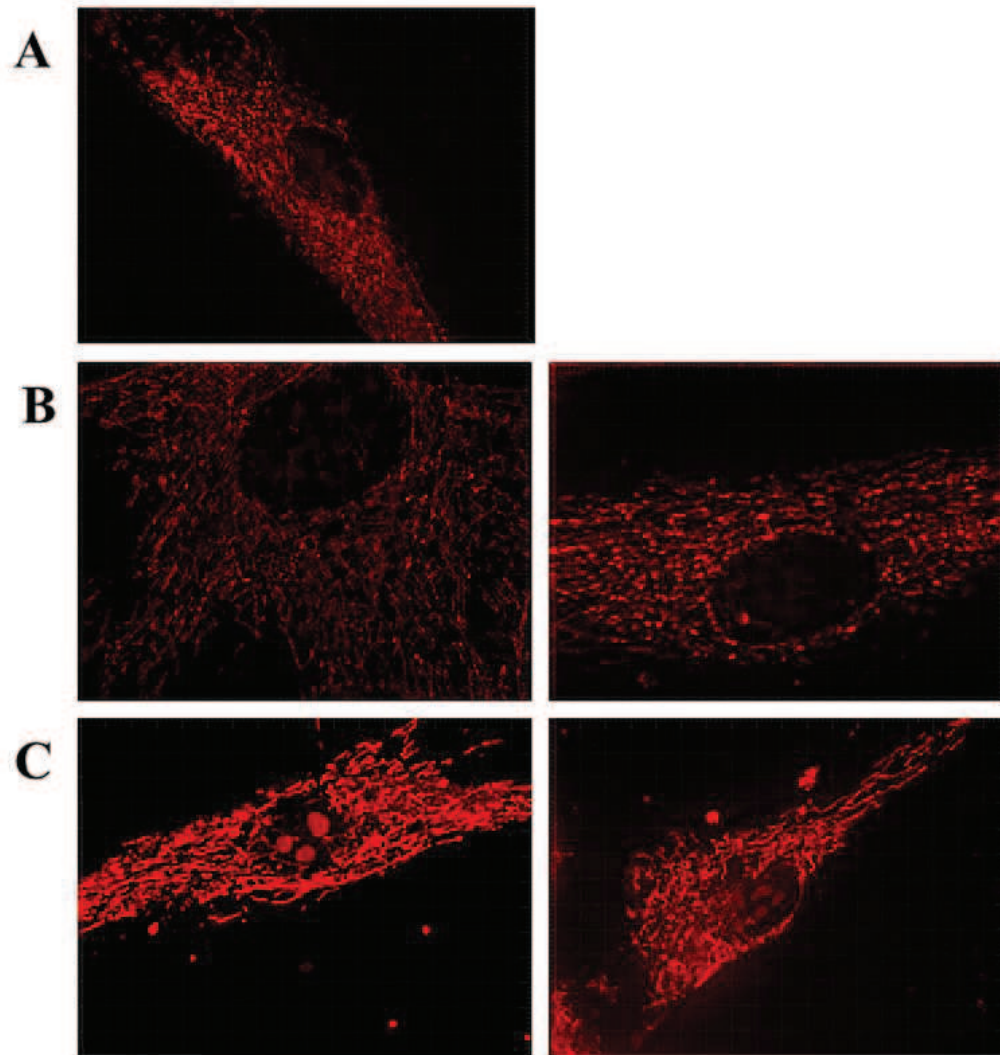
Figure SI 1



Supplementary Data 1: ROS production in patient and control cells

ROS production was measured on solubilized complex I and initiated using amplex Red method. Graph represented the inhibition of ROS production induced by decylubiquinone in mutant and control cells. The data were represented as percentage.

Figure SI 2



Supplementary Data 2: Assessing Cellular Levels of superoxide with superoxide indicator MitoSOX Red.

(5 μ M, 10min at 37 $^{\circ}$ C)

A : In control cells lines

B : In FA cells lines (p1 and p4)

C : In AD cells lines (p8 and p11)

Angebault C, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, Chevrollier A, Guillet V, Verny C, et al. Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHON patients while producing contradictory effects on respiration. *BMC research notes*. 2011;4:557.

Assouline Z, Jambou M, Rio M, Bole-Feysot C, de Lonlay P, Barnerias C, et al. A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUFS4 mutations in patients with Leigh syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822:1062-9.

Bannwarth S, Figueroa A, Fragaki K, Destroismaisons L, Lacas-Gervais S, Lespinasse F, et al. The human MSH5 (MutSHomolog 5) protein localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage. *Mitochondrion*. 2012;12:654-65.

Bazil JN, Pannala VR, Dash RK, Beard DA. Determining the origins of superoxide and hydrogen peroxide in the mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Free radical biology & medicine*. 2014.

Benarbia Mel A, Macherel D, Faure S, Jacques C, Andriantsitohaina R, Malthiery Y. Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;272:325-34.

Beretta S, Wood JP, Derham B, Sala G, Tremolizzo L, Ferrarese C, et al. Partial mitochondrial complex I inhibition induces oxidative damage and perturbs glutamate transport in primary retinal cultures. Relevance to Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *Neurobiology of disease*. 2006;24:308-17.

Birrell JA, Hirst J. Investigation of NADH binding, hydride transfer, and NAD(+) dissociation during NADH oxidation by mitochondrial complex I using modified nicotinamide nucleotides. *Biochemistry*. 2013;52:4048-55.

Birrell JA, King MS, Hirst J. A ternary mechanism for NADH oxidation by positively charged electron acceptors, catalyzed at the flavin site in respiratory complex I. *FEBS letters*. 2011;585:2318-22.

Birrell JA, Yakovlev G, Hirst J. Reactions of the flavin mononucleotide in complex I: a combined mechanism describes NADH oxidation coupled to the reduction of APAD⁺, ferricyanide, or molecular oxygen. *Biochemistry*. 2009;48:12005-13.

Breuer ME, Willems PH, Smeitink JA, Koopman WJ, Nooteboom M. Cellular and animal models for mitochondrial complex I deficiency: a focus on the NDUFS4 subunit. *IUBMB life*. 2013;65:202-8.

Burbaev D, Moroz IA, Kamenskiy YA, Konstantinov Au A. Several forms of chromaffin granule cytochrome b-561 revealed by EPR spectroscopy. *FEBS letters*. 1991;283:97-9.

Calvaruso MA, Willems P, van den Brand M, Valsecchi F, Kruse S, Palmiter R, et al. Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity. *Human molecular genetics*. 2012;21:115-20.

Colussi C, Albertini MC, Coppola S, Rovidati S, Galli F, Ghibelli L. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14:2266-76.

Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1364:222-35.

Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Barth M, Chevrollier A, Hancock S, Wallace DC, et al. Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822:1019-29.

Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Leman G, Baron S, Nivet-Antoine V, Chupin S, et al. Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288:36662-75.

Distelmaier F, Koopman WJ, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PH, et al. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132:833-42.

Esterhazy D, King MS, Yakovlev G, Hirst J. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*. 2008;47:3964-71.

Flamment M, Gueguen N, Wetterwald C, Simard G, Malthiery Y, Ducluzeau PH. Effects of the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant on hepatic mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1162-70.

Florenzi M, Napoli E, Martinuzzi A, Pantano G, De Riva V, Trevisan R, et al. Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *The FEBS journal*. 2005;272:1124-35.

Galkin A, Brandt U. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:30129-35.

Gavrikova EV, Grivennikova VG, Sled VD, Ohnishi T, Vinogradov AD. Kinetics of the mitochondrial three-subunit NADH dehydrogenase interaction with hexammineruthenium(III). *Biochim Biophys Acta*. 1995;1230:23-30.

Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, et al. Free radicals-mediated damage in trans-mitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett*. 2005;579:6909-13.

Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of biology*. 2008;7:1.

Guillet V, Gueguen N, Cartoni R, Chevrollier A, Desquiret V, Angebault C, et al. Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25:1618-27.

Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:551-75.

Hirst J, King MS, Pryde KR. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions*. 2008;36:976-80.

Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science*. 2010;329:448-51.

Hutter E, Renner K, Pfister G, Stockl P, Jansen-Durr P, Gnaiger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *The Biochemical journal*. 2004;380:919-28.

Iommarini L, Calvaruso MA, Kurelac I, Gasparre G, Porcelli AM. Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: parallel roads leading to different outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45:47-63.

- Iuso A, Scacco S, Piccoli C, Bellomo F, Petruzzella V, Trentadue R, et al. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:10374-80.
- Jaokar TM, Patil DP, Shouche YS, Gaikwad SM, Suresh CG. Human mitochondrial NDUFS3 protein bearing Leigh syndrome mutation is more prone to aggregation than its wild-type. *Biochimie*. 2013;95:2392-403.
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP, Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26:5256-64.
- Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods in cell biology*. 2007;80:93-119.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, et al. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12:1431-70.
- Koopman WJ, Verkaart S, van Emst-de Vries SE, Grefte S, Smeitink JA, Nijtmans LG, et al. Mitigation of NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency by chronic Trolox treatment. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1777:853-9.
- Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:7607-12.
- Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR, Ryan MT. Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Molecular and cellular biology*. 2007;27:4228-37.
- Lebon S, Minai L, Chretien D, Corcos J, Serre V, Kadhom N, et al. A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. *Molecular genetics and metabolism*. 2007;92:104-8.
- Liolitsa D, Rahman S, Benton S, Carr LJ, Hanna MG. Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations? *Annals of neurology*. 2003;53:128-32.
- Liu Y, Schubert DR. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *Journal of biomedical science*. 2009;16:98.
- Majander A, Finel M, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Wikstrom M. Catalytic activity of complex I in cell lines that possess replacement mutations in the ND genes in Leber's hereditary optic neuropathy. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1996;239:201-7.
- Majander A, Finel M, Wikstrom M. Diphenyleneiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:21037-42.
- Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*. 2009;9:331-9.
- Miwa S, Jow H, Baty K, Johnson A, Czapiewski R, Saretzki G, et al. Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice. *Nature communications*. 2014;5:3837.
- Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*. 2002;26:327-34.

- Nouws J, Nijtmans LG, Smeitink JA, Vogel RO. Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options. *Brain*. 2012;135:12-22.
- Pagniez-Mammeri H, Loublier S, Legrand A, Benit P, Rustin P, Slama A. Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin I. Structural genes. *Molecular genetics and metabolism*. 2012;105:163-72.
- Pitkanen S, Robinson BH. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98:345-51.
- Procaccio V, Bris C, Chao de la Barca JM, Oca F, Chevrollier A, Amati-Bonneau P, et al. Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria. *Revue neurologique*. 2014;170:390-400.
- Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:18056-65.
- Ragan CI, Bloxham DP. Specific labelling of a constituent polypeptide of bovine heart mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone reductase by the inhibitor diphenyleneiodonium. *The Biochemical journal*. 1977;163:605-15.
- Rubio-Gozalbo ME, Dijkman KP, van den Heuvel LP, Sengers RC, Wendel U, Smeitink JA. Clinical differences in patients with mitochondriocytopathies due to nuclear versus mitochondrial DNA mutations. *Human mutation*. 2000;15:522-32.
- Sarzi E, Brown MD, Lebon S, Chretien D, Munnich A, Rotig A, et al. A novel recurrent mitochondrial DNA mutation in ND3 gene is associated with isolated complex I deficiency causing Leigh syndrome and dystonia. *Am J Med Genet A*. 2007;143:33-41.
- Sazanov LA. The mechanism of coupling between electron transfer and proton translocation in respiratory complex I. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2014;46:247-53.
- Scacco S, Petruzzella V, Bertini E, Luso A, Papa F, Bellomo F, et al. Mutations in structural genes of complex I associated with neurological diseases. *Ital J Biochem*. 2006;55:254-62.
- Shi DY, Xie FZ, Zhai C, Stern JS, Liu Y, Liu SL. The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. *Molecular cancer*. 2009;8:32.
- Tocilescu MA, Zickermann V, Zwicker K, Brandt U. Quinone binding and reduction by respiratory complex I. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797:1883-90.
- Ugalde C, Janssen RJ, van den Heuvel LP, Smeitink JA, Nijtmans LG. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Human molecular genetics*. 2004;13:659-67.
- Valsecchi F, Grefte S, Roestenberg P, Joosten-Wagenaars J, Smeitink JA, Willems PH, et al. Primary fibroblasts of NDUFS4(-/-) mice display increased ROS levels and aberrant mitochondrial morphology. *Mitochondrion*. 2013;13:436-43.
- Valsecchi F, Monge C, Forkink M, de Groof AJ, Benard G, Rossignol R, et al. Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817:1925-36.
- Verkaart S, Koopman WJ, van Emst-de Vries SE, Nijtmans LG, van den Heuvel LW, Smeitink JA, et al. Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772:373-81.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. *Nature protocols*. 2006;1:418-28.

Wong A, Cavelier L, Collins-Schramm HE, Seldin MF, McGrogan M, Savontaus ML, et al. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Human molecular genetics*. 2002;11:431-8.

Zickermann V, Kerscher S, Zwicker K, Tocilescu MA, Radermacher M, Brandt U. Architecture of complex I and its implications for electron transfer and proton pumping. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787:574-83.

Zu Y, Shannon RJ, Hirst J. Reversible, electrochemical interconversion of NADH and NAD⁺ by the catalytic (Π lambda) subcomplex of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Am Chem Soc*. 2003;125:6020-1.

The NADH/NAD⁺ ratio is a key parameter in complex I deficiency: A potential therapeutic target?

Géraldine Leman^{1,3}, Valérie Desquiret-Dumas^{1,2,3}, Naïg Gueguen^{1,2,3}, Guillaume Geoffroy^{1,3}, Stéphanie Chupin^{1,2,3}, Magalie Barth^{1,2,3}, Patrizia Amati-Bonneau^{1,2,3}, Christophe Verny^{1,2,3}, Daniel Henrion^{1,3}, Dominique Bonneau^{1,2,3}, Pascal Reynier^{1,2,3}, Vincent Procaccio^{1,2,3}.

¹ Angers University, Angers, France

²Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers Hospital, F-49000, France

³UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Angers, F-49000, France

To whom correspondence should be addressed: Vincent Procaccio M.D., Ph.D. Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone 33 2 41 35 78 54. Fax 33 2 41 35 58 83. Email ViProcaccio@chu-angers.fr

Title: 15

Abstract: 186

Text including figures legends: 3280

46 References, 3 figures, 1 table (SI)

ABSTRACT

Nicotinamide nucleotides (NAD) are considered as crucial cofactors for numerous enzymatic reactions of cellular metabolism both in cytoplasm and mitochondria. A balance between the reduced and the oxidized form of NAD, required for energetic metabolism, directly regulates tricarboxylic acid cycle, glycolysis and oxidative phosphorylation. Conversely, NADH/NAD⁺ can be unbalanced in case of respiratory chain dysfunction especially complex I. The NADH/NAD⁺ ratio has been suggested by recent publications as a key player on mitochondrial metabolism. However, the biochemical consequences of the variations of the NADH/NAD⁺ on mitochondrial function are still not well understood. In this study, we investigated the consequences of a NADH/NAD⁺ variation due to complex I deficiency on mitochondrial metabolism and the intracellular pathways impacted. Our results showed that the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio was higher in cells carrying a mutation in mitochondrial DNA encoded subunits of complex I compared with control fibroblasts. This increase of NADH/NAD⁺ ratio reduced SIRT3 activity leading to an hyperacetylation of SIRT3 targeted mitochondrial proteins. The treatment of complex I deficient cells with nicotinamide mononucleotide (NMN) improved mitochondrial oxidative phosphorylation highlighting NMN as a potential therapeutic molecule for complex I deficiency.

INTRODUCTION

Many situations affecting mitochondrial metabolism are characterized by a modulation of the NADH/NAD⁺ ratio. For instance, high fat diet has been shown to increase the NADH/NAD⁺ ratio in a mouse model [1]. Moreover, the NAD⁺ level can be increased in response to fasting, exercise or caloric restriction [2, 3]. NAD⁺ is the essential cofactor of a deacetylase protein family involved in numerous intracellular signaling pathways, the sirtuins [4]. These deacetylases are considered as key regulators of energetic metabolism [5]. Indeed, SIRT1, the main nucleo-cytoplasmic isoform interacts notably with AMPK and PGC1-alpha to promote mitochondrial biogenesis [6, 7]. SIRT3, one of the three mitochondrial isoforms of sirtuins, is responsible for the acetylation of key enzymes of substrate supply pathways (tricarboxylic acid cycle, TCA: ICDH, SDH, fatty acid oxidation, FAO: LCAD) and of oxidative phosphorylation complexes (complex I, complex V). The mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio has been described at the center of a signaling pathway linking pharmacological complex I activation due to resveratrol and sirtuin-dependent increase of respiratory chain functioning [8]. In addition, in NDUF54 KO mice, complex I deficiency has been shown to increase NADH/NAD⁺ ratio [9]. Thus, complex I appears as a main regulator of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio [8, 10], but the biochemical consequences of the NADH/NAD⁺ variations on respiratory chain function are still not well understood.

In a previous study, we have demonstrated that the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio was increased in fibroblasts of complex I deficient patients depending on the mutated subunit (Leman et al., *ijbcb* 2014). Thus, complex I deficiency appears as a good model to investigate the consequences of NADH/NAD⁺ variation on mitochondrial metabolism and on the sirtuin pathway. Our study was divided in two parts, the first part was dedicated to the impact of complex I deficiency on the acetylation status of key mitochondrial protein targets, the role of the NADH/NAD⁺ ratio variation and the functional consequences of such a modulation. In the second part, we sought to determine if the modulation of this ratio could alleviate mitochondrial dysfunction observed in complex I mutant fibroblasts. Our results show that the increase in NADH/NAD⁺ ratio observed in fibroblasts from complex I mutated fibroblasts was correlated with an hyperacetylation of mitochondrial proteins. In particular, MnSOD and

SDHA, both well known SIRT3 targets, were hyperacetylated, suggesting that in these cells, SIRT3 activity was decreased. The modulation of the NADH/NAD⁺ ratio by a NAD⁺ precursor (NMN) reverted the level of hyperacetylated mitochondrial proteins and increasing mitochondrial oxidative phosphorylation. Taken together, our results show that the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio appears as a key parameter in the regulation of mitochondrial metabolism and could be a promising target for the treatment of mitochondrial complex I deficiency. Hence, the NMN could then represent a good candidate drug to normalize the NADH/NAD⁺ ratio in patient complex I deficient fibroblasts.

MATERIALS and METHODS

Patients: Prior written informed consent was obtained from 7 patients with inherited CI deficiency participating in the study. Patients were divided in two groups: the first group was composed of fibroblast cells carrying a mutation in ND (NADh dehydrogenase) subunits of complex I (ND group), the second group is composed of two cell lines harboring a mutation in the nuclear gene NDUFS4 (NDUFS4 group). The description of the mutations carried by these patients is detailed in table SI1. The presence of the mutation and the mutation load were analyzed according to Leman et al, 2014.

Cell Culture: Primary skin fibroblasts from 7 patients with inherited CI deficiency and 4 controls were cultured as described in [11]. All experiments were conducted on fibroblast cultures between passages 6 and 25 so as to avoid artefacts due to senescence as observed at passage numbers greater than 30 [12], and on control fibroblasts paired for passage numbers.

Complex I inhibition was achieved by treating control cells with 1 μ M rotenone, for 24h. Paired control flask was incubated with Ethanol, 1/2500. When indicated, control and patient cells were treated by 0,1 mM Nicotinamide mononucleotide (NMN) treatment for 72h.

Mitochondria isolation: Mitochondria were isolated from patients and control fibroblasts using digitonin (70 μ g/10⁶ cells) and differential centrifugation as described in [13].

Name	Cell lines	Mutation				Clinical phenotype	Reference
		Genome	Genes	% Mutation	Nucleotide Position		
ND	P1	mtDNA	<i>MT-ND1</i>	Homop	m.3460G>A	LHON	Leman et al
	P2			Homop	m.3697G>A	LS	Leman et al
	P3		<i>MT-ND4</i>	Homop	m.11778G>A	LHON	(48)
	P4			Homop	m.11778G>A	LHON	Leman et al
	P5			Homop	m.14487T>C	LS	Leman et al
NDUFS4	P6	nDNA	<i>NDUFS4</i>	Homoz	c.291delG	LS	(45)
	P7			Homoz	c.178-528del	LS	(45)

Supplementary Data I. Clinical and molecular description of patients with inherited CI deficiency.

Homop: Homoplasmic; Heteroz: heterozygous; LHON: Leber Hereditary Optic Neuropathy; LS: Leigh syndrome

Mitochondrial enzymatic activities and oxygraphic measurement: The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes (I-IV) were measured at 37°C on a UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) as described elsewhere [8]. Oxygraphic analyses were performed according to [11].

Analysis of the acetylation level: The acetylation level was analyzed by western blot. Briefly, 100µg of cellular proteins or 150µg of proteins from isolated mitochondria solubilized in RIPA buffer supplemented with 1 mM NAM, 1 mM sodium butyrate and 100 µM PMSF were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, USA) and incubated with primary monoclonal antibodies: voltage-dependent anion channel 1 (VDAC-1) (MitoSciences, Abcam, UK), anti-acetyl Lysine (Immunechem Pharmaceutical, Canada), anti-Lysine 68 acetylated of Manganese Superoxide dismutase (MnSOD, Abcam) or manganese superoxide dismutase (MnSOD) (MitoSciences, Abcam).

Immunoprecipitation of acetylated SDHA: Cellular proteins were extracted in RIPA buffer supplemented with 1 mM NAM, 1 mM sodium butyrate and 100 µM PMSF and about 1.5 mg of cellular proteins were incubated with 50 µg of anti-acetylated protein antibody (Immunechem) cross-linked to agarose beads, overnight at 4°C. The acetylated protein immunoprecipitated were washed twice in 1 mM Laurylmatoside / phosphate buffer solution and harvested by centrifugation. Acetylation of Succinate Dehydrogenase was then analyzed by western blot using antibody raised against subunit A (SDHA, Abcam).

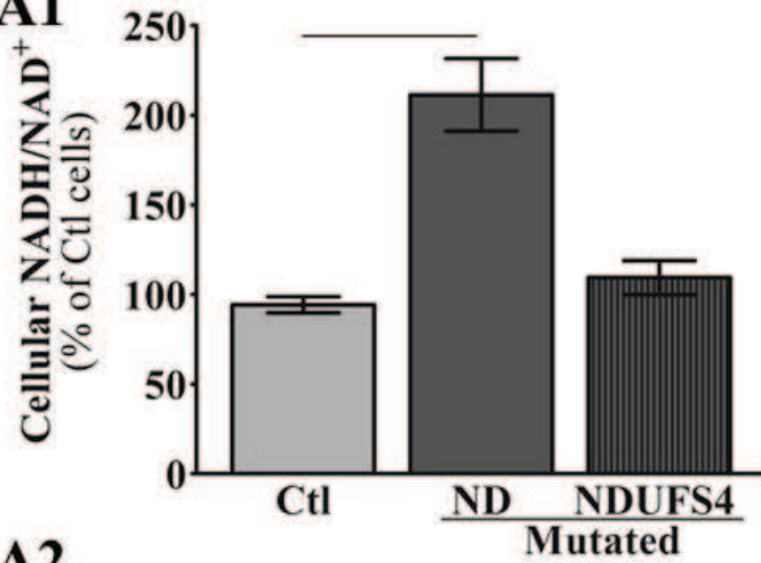
NADH/NAD⁺ measurement: NADH and NAD⁺ concentrations were measured using the NAD/NADH assay kit (Abcam) on cell lysates (4.10⁶ cells) filtered under a 10kDa column according to the manufacturer's instructions.

Cytosolic NADH/NAD⁺ measurement: The cytosolic NAD(H)-redox state was determined using the metabolite indicator method based on the lactate dehydrogenase reaction, by measuring pyruvate to lactate ratio on cell culture media [8].

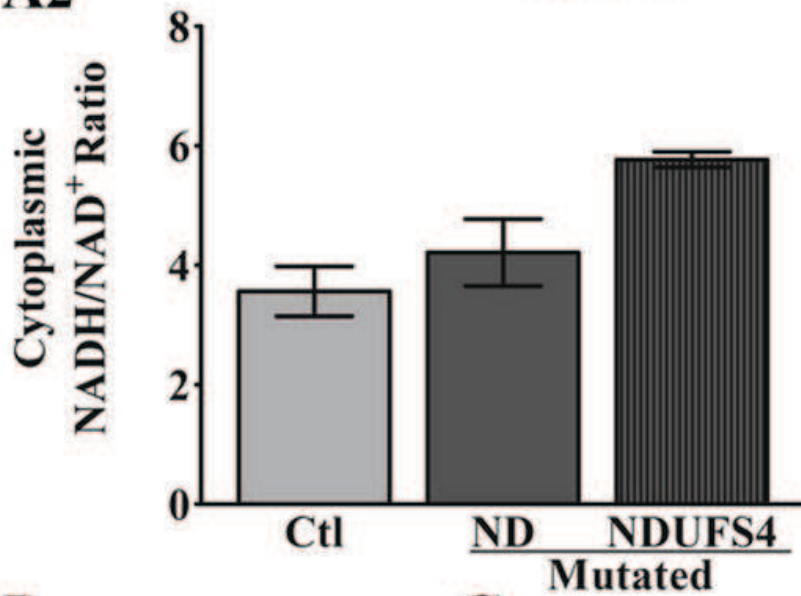
Statistical analysis: Statistical comparisons were made with the Mann-Whitney U test. Results were represented as mean ± SEM. Differences were considered statistically significant at p<0.05.

Figure 1

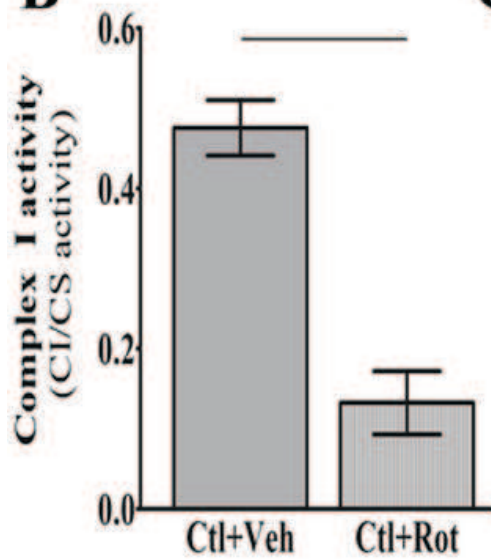
A1



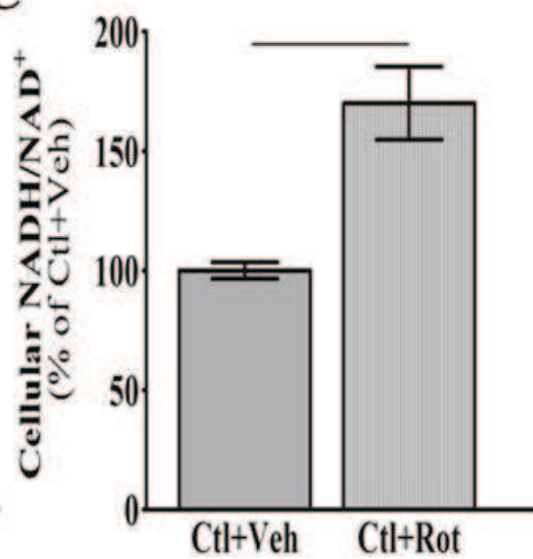
A2



B



C



RESULTS

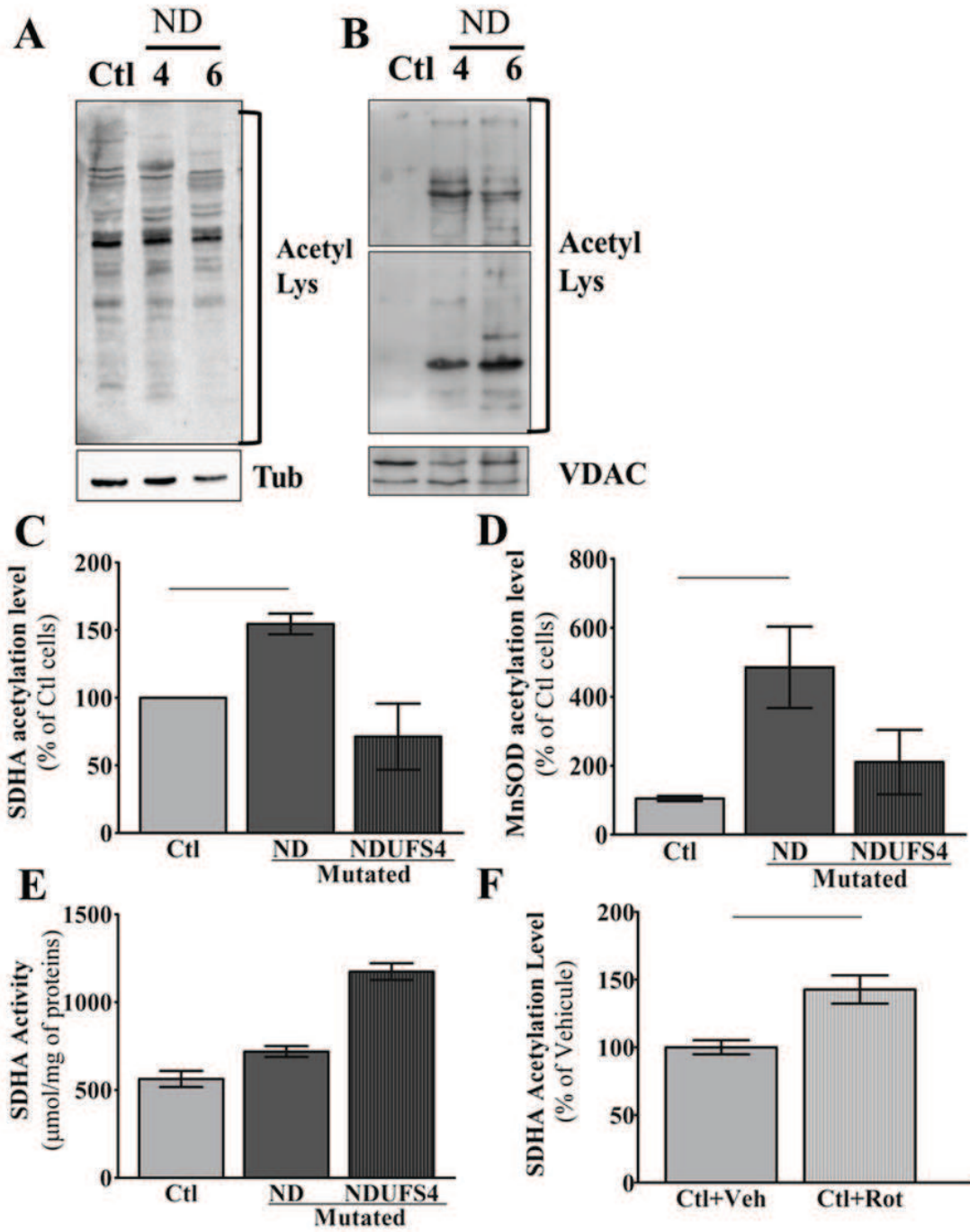
Complex I deficiency increased the NADH/NAD⁺ ratio

To study the effect of complex I deficiency on the mitochondrial ratio, two different cellular models of complex I deficiency were used: cells mutated in mitochondrial DNA encoded subunits (ND subunits P1 to P5 in table SI1), and cells mutated in the NDUFS4 nuclear encoded subunit (P6-P7). The impact of a mutation in the NDUFS4 subunit leads to complex I disassembly, thus disconnecting the catalytic NADH dehydrogenase domain (N module) of complex I from the electron transfer and quinone binding site [14] (Leman et al., 2014). It was demonstrated that, while unconnected, this N module displayed residual activity, still able to oxidize NADH [15] (Leman et al., 2014). By contrast, in ND mutated cells, the complex assembly was preserved (Leman et al., 2014). Mutations were localized in the quinone binding and proton pumping domains, thus impacting the catalytic activity of the complex. The ratio of Complex I to citrate synthase activities was significantly reduced in both CxI mutated fibroblasts, by roughly 50% in the ND mutated cells and 75% in NDUFS4 cells (Figure SI1).

The level of reduced and oxidized forms of nicotinamide nucleotides (NADH and NAD⁺ respectively) was measured in controls (Ctl) and patient fibroblasts carrying a mutation in complex I subunits. The cellular NADH/NAD⁺ ratio was increased by 2.2 fold in CxI mutated in mitochondrial subunits (ND) compared to Ctl fibroblasts (Figure 1A1), whereas the cytoplasmic NADH/NAD⁺ ratio remained unchanged (Figure 1A2). In various cell types, mitochondria have been shown to contain the majority of NAD⁺ [16] thus a cellular increase in NADH/NAD⁺ ratio without any modification in the cytosolic compartment may indicate a higher NADH/NAD⁺ ratio in the mitochondrial compartment. On the other hand, in patient fibroblasts carrying a mutation in NDUFS4 subunit, the cellular NADH/NAD⁺ ratio could be unchanged. Therefore, in this study, NDUFS4 patients were used as negative controls with a constant NADH/NAD⁺ ratio. It should be noticed that cytoplasmic NADH/NAD⁺ ratio was increased in NDUFS4 mutant cells, which could be explained by an increase in anaerobic glycolysis (Leman et al., 2014).

As Complex I is the main mitochondrial NADH dehydrogenase, we can hypothesize that a reduction in NADH oxidation, is at the origin -or at least directly participate- to the higher mitochondrial NADH/NAD⁺ found in ND mutant fibroblasts. To test this

Figure 2

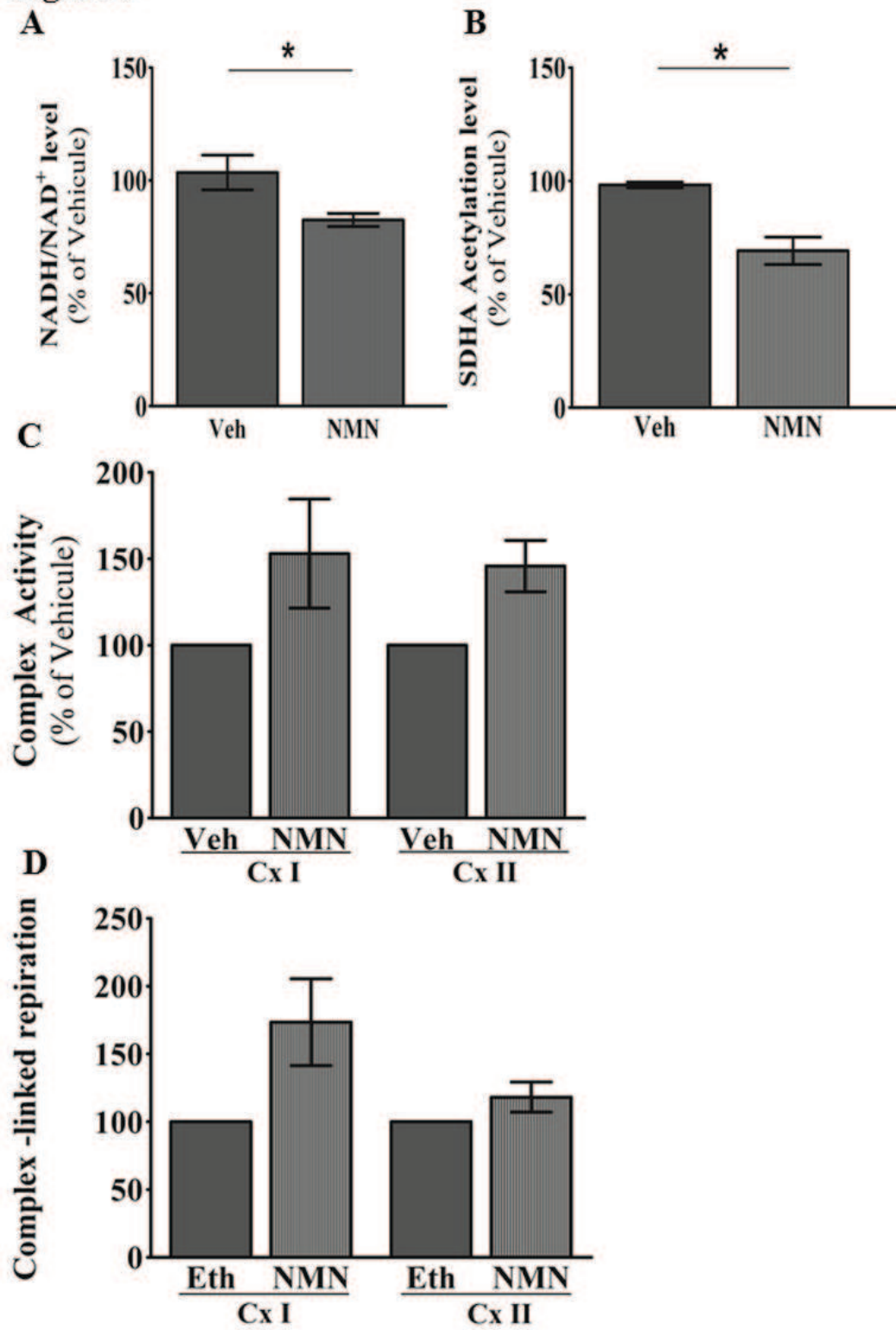


hypothesis, CxI deficiency was mimicked in Ctl fibroblasts by a 24h exposure of 1 μ M of rotenone (which inhibits electron transfer from Complex I Fe/S centers to ubiquinone). The rotenone exposure resulted in a 75% reduction of Complex I activity (Figure 1B1). This inhibition was accompanied by a 1.8 fold increase in cellular NADH/NAD⁺ ratio (Figure 1C) as seen in ND fibroblasts (Figure 1A1). Altogether, these results indicated that a decrease in NADH oxidation by CxI, either due to a pharmacological inhibition or to a mutation, could be responsible for a higher mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio. These results are in accordance with Santidrian *et al.*, which have shown that lowering complex I activity in breast cancer cells resulted in a higher NADH/NAD⁺ ratio and oxidative phosphorylation impairment [17]. In addition, Desquirit-Dumas, Gueguen *et al* have shown that resveratrol increased complex I activity (by) and as a consequence increasing the mitochondrial NAD⁺ level and improving mitochondrial metabolism in liver cells [8]. These results highlighted the key role of complex I in the regulation of mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio.

The change of NADH/NAD⁺ ratio induced the hyperacetylation of mitochondrial proteins Sirtuin isoforms have been described as NAD⁺-dependant deacetylase enzymes [18]. To investigate whether a higher NADH/NAD⁺ ratio would impact the activity of sirtuins, the level of acetylation was measured by western blot in mutant fibroblast cells carrying a mutation in ND subunits (table S1) using antibodies raised against acetyl lysine motif. No change in cellular acetylation level could be observed in ND mutated fibroblasts in crude cellular extracts (Figure 2A). According to Choudhary *et al* (2009), about 1/8 of the acetylated proteins has been localized in the mitochondrial compartment [19]. Thus, mitochondria would contain an important pool of the cellular acetylated proteins. The level of acetylation was measured on mitochondria isolated from CxI-mutated fibroblasts (Figure 2B). As shown, the mitochondrial acetylated protein content was higher in ND mutated cells.

As ND cells presented a higher NADH/NAD⁺ ratio, we can hypothesize that this imbalance resulted to the mitochondrial hyperacetylation. These results are in accordance with the study of Peek *et al.* (2013), which shows that the circadian variations of NAD⁺ content are responsible for a parallel fluctuation of mitochondrial protein acetylation status [20]. These results are also consistent with the study of

Figure 3



Canto *et al*, (2009) demonstrating that the AMPK pathway increased the level of NAD^+ which is responsible for a significant reduction of the protein acetylation of sirtuin targets [6]. Our study reconciles these parameters showing that complex I dysfunction could trigger an increase in mitochondrial NADH/NAD^+ ratio which in turn induces an increase in mitochondrial protein acetylation status.

The increased hyperacetylation would reflect a reduction of SIRT3 activity

SIRT3 is described as the main mitochondrial NAD^+ -dependent deacetylase [21]. A dysregulation of mitochondrial NADH/NAD^+ could consequently impact SIRT3 activity. To test this hypothesis, the acetylation of two well-known SIRT3 targets (MnSOD and SDHA, [22-24]) were evaluated by western blot (Figure 2C-D). Acetylation levels of both SIRT3 targets (SDHA Figure 2C MnSOD, Figure 2D) were significantly increased in ND mutant compared to Ctl cells (+ 400% for MnSOD and +60% for SDHA), suggesting that of SIRT3 expression was inhibited in ND mutant cells. Likewise, in rotenone-treated cells, the SDHA acetylation level was significantly higher than in vehicle treated Ctl cells. On the contrary, in NDUFS4 cells, the level of both SIRT3 targets was unchanged in NDUFS4 mutant cells (Figure 2). This indicated that complex I deficiency itself did not directly induced the MnSOD and SDHA hyperacetylation, but strongly suggest the role of the NADH/NAD^+ ratio and SIRT3 (and consequently the hyperacetylation of MnSOD and SDHA) in complex I deficient cells. In most of the cases, hyperacetylated enzymes are inactivated [25] as described for several targets including glutamate dehydrogenase [26], complex I of the respiratory chain [27], long chain acyl-coA dehydrogenase [28], succinate dehydrogenase (SDH) [22] and superoxide dismutase (MnSOD) [23, 29]. In our model, despite an increase of SDHA acetylation, SDHA activity did not differ significantly from control cells (Figure 2C). However, it has been suggested that enzymatic inhibition through acetylation is tissue specific [30] but may also depend on metabolic conditions (fed/fasted state, [31]). In the same way, the deacetylation of specific lysine residues of MnSOD by SIRT3 depends on different kind of stress such [32], calorie restriction [29], ionizing stress [23] and ROS overproduction [33]. In our model, the cell culture conditions in a relatively high glucose medium may explain the faint impact of hyperacetylation on the functionality on mitochondria. It might be interesting for further experiments to challenge the

mutant fibroblasts by culturing them in low glucose medium to reveal enzymatic impairments. Furthermore, in NDUFS4 mutated cells, the activity of SDHA was increased by about 229% of the control value (Figure 2E). It is thus conceivable that the complex I deficiency induces a compensatory increase of complex II activity. By contrast, in ND cells, the SDHA hyperacetylation could have prevented the induction of SDHA activity observed in NDUFS4 mutated cells.

Altogether, these results underlined the crucial role of the NAD⁺/sirtuin signalling pathway in the biological consequences of a complex I deficiency. So, targeting this ratio might represent a promising therapeutic strategy to alleviate the mitochondrial dysfunction in mitochondrial diseases.

The NMN treatment decreases NADH/NAD⁺ ratio and reverses the hyperacetylation of SIRT3 target.

Next, in order to test whether a reduction of the NADH/NAD⁺ ratio could modify the level of acetylation of mitochondrial proteins (i.e. increase SIRT3 activity), we sought to alter this ratio using nicotinamide mononucleotide (NMN), a NAD⁺ precursor previously shown to increase cellular NAD⁺ levels [34]. As shown in figure 3A, the NMN treatment after 72 h of exposure significantly decreased the NADH/NAD⁺ ratio (-30%) in ND patient treated cell lines .

In vitro, a direct stimulation of protein de-acetylation by NAD⁺ supplementation was previously shown on cardiac mitochondrial homogenates [35]. Thus, we then analyzed the acetylation level of a SIRT3 target. The decrease of NADH/NAD⁺ ratio was followed by a significant reduction of the SDHA acetylation level (Figure 3B), suggesting that an SIRT3 was activated by NMN treatment.

The NMN treatment increases the oxidative phosphorylation in complex I deficient cell lines.

The impact of the reduction of NADH/NAD⁺ ratio on mitochondrial metabolism was then investigated by measuring the activities of SDH and complex I in NMN treated cells. NMN treatment significant increased both complex I and SDH activities (Figure 3C). This increased activity of both complexes I and II controlling the entrance of electrons into the respiratory chain was followed by a slight stimulation of complex II-

linked respiration (+20%, $p < 0,05$, figure 3B) and a main increase of complex I-linked respiration (+75%, Figure 3B) in these cell lines.

The modulation of NADH/NAD⁺ ratio in metabolic diseases may represent a potential therapeutic target [36]. Indeed, increasing NAD⁺ level was shown to be effective for treatment of hyperlipidemia [37, 38] or diabetes, prevention of ischemia/reperfusion damages [39] or oxidative stress [40] and neuroprotection in Alzheimer's disease [41]. Currently, no curative treatment is available for patients with complex I deficiency. No satisfactory therapy is presently available for mitochondrial disorders [42, 43]. Treatment remains largely symptomatic and does not significantly alter the course of the disease. Pharmacological therapeutic strategies may focus on 2 potential goals: producing more energy and/or reducing the accumulation of mitochondrial ROS byproducts of a defective or stalled electron transport chain, a major consequence of a mitochondrial dysfunction. We have recently shown that low doses of resveratrol using *in vivo* and *in vitro* models directly stimulates mitochondrial complex I activity which in turn modulates the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio. Increasing NAD⁺ concentration leads to SIRT3 activation and finally induces mitochondrial metabolism

Moreover, the results of the current study indicated that the NAD⁺-SIRT3 axis would represent a promising target in complex I deficiency, at least in the subset of patients in which the NADH oxidation is decreased. Indeed, a small reduction of the NADH/NAD⁺ ratio significantly stimulated the overall oxidative phosphorylation in complex I deficient cells. Many studies have already described the modulation of NADH/NAD⁺ using pharmacological activators or nutraceutical interventions [36, 44, 45]. *In vivo*, supplementation with NAD⁺ precursors (nicotinic acid or nicotinamide) was also effective in increasing the NAD⁺ level both in cells [46] and in different tissues [47]. NMN was reported to restore NAD⁺ level in a high fat diet and aged mouse models and improve glucose tolerance and lipid profiles in these models [34], thus appearing as a promising molecule in the treatment of mitochondrial diseases.

In conclusion, our study demonstrates that complex I deficiency increases the NADH/NAD⁺ ratio and thus inhibits the deacetylase activity of SIRT3 leading to an hyperacetylation of mitochondrial proteins. The use of a NAD⁺ precursor, NMN,

ameliorates this ratio and improves oxidative phosphorylation suggesting that NAD⁺ precursor may represent a potential therapeutic agent for complex I deficiencies.

FIGURES

Figure 1: A deficit in NADH oxidation by complex I leads to an increase of mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio

Ctl: Control fibroblast cells lines (n=5); ND: Patient fibroblast cells lines carrying a mutation in mitochondrial encoded subunits of complex I (n=5); NDUFS4: Patient fibroblast cells lines carrying a mutation in NDUFS4 subunit (n=2). Ctl+Veh: Control fibroblast cell lines with the vehicle (n=4); Ctl+Rot: Control fibroblast cell lines treated with rotenone (1 μ M, 24h) (n=4). Results are expressed as mean \pm SEM. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to Ctl cells (P<0,05).

A: NADH/NAD⁺ ratio of patient and control cell lines in the different cellular compartments.

A1: Cellular NADH/NAD⁺. Cellular NADH/NAD⁺ level was measured on Ctl, ND and NDUFS4 cell lysates by absorbance reaction, and expressed as percentage of control cells.

A2: Cytoplasmic NADH/NAD⁺ level. The cytosolic NAD⁺/NADH ratio was calculated as the ratio of pyruvate/lactate concentrations measured in culture medium of Ctl, ND and NDUFS4 cells.

B: Complex I activity in control cell lines treated or not with rotenone analyzed by spectrophotometric measurement.

C: Cellular NADH/NAD⁺ ratio in control cell lines treated or not with rotenone, results are expressed as percentage of control cells.

Figure 2: A higher NADH/NAD⁺ ratio increased the acetylation of SIRT3 targets.

Ctl: Control fibroblast cells lines (n=5); ND: Patient fibroblast cells lines carrying a mutation in mitochondrial encoded subunits of complex I (n=5). Results are expressed as mean \pm SEM. Ctl+Veh: Control fibroblast cell lines with the vehicle (n=4); Ctl+Rot: Control fibroblast cell lines treated with rotenone (1 μ M, 24h) (n=4). Results are expressed as mean \pm SEM. The (*) indicates a significant difference compared to Ctl cells (P<0,05).

A: Cellular acetylation level in ND patient and Ctl fibroblast cell lines analysed by Western blot (Tubulin was used as loading control).

B: Mitochondrial acetylation level in ND patient and Ctl fibroblast cell lines analysed by Western blot (VDAC was used as loading control).

C: SDHA Acetylation level in CxI mutated and control fibroblast cells. Acetylated SDHA was immunoprecipitated from Ctl, ND and NDUFS4 cells. Data are expressed as percentage of control cells.

D: MnSOD Acetylation level in CxI mutated and control fibroblast cells. Acetylated MnSOD and total MnSOD expression were analysed by western blot on Ctl, ND and NDUFS4 cells. Data are expressed as percentage of control cells.

E: SDHA activity in control and CxI mutated fibroblast cell lines.

F: SDHA Acetylation level of control cells treated or not with rotenone (24H, 1 μ M). Data are expressed as percentage of control cells.

Figure 3: NAD⁺ precursor decreased NADH/NAD⁺ ratio, and increased SIRT3 activity and oxidative phosphorylation.

Veh: patient cell lines without treatment (n=?); NMN: NMN treated patient cells (n=?). Results are expressed as mean \pm SEM. The (*) indicates a significant difference compared to Ctl cells (P<0.05).

A: Cellular NADH/NAD⁺ level in patients cell lines treated or not with NMN (0,1mM, 72h). Results are expressed as percentage of control cells.

B: SDHA Acetylation level. Acetylated SDHA was immunoprecipitated from patients cell lines treated or not with NMN (0,1mM, 72h) and analyzed by western blot. Data are expressed as percentage of control cells.

C: Activity of complex I and SDH in patient cell lines treated or not with NMN (0,1mM, 72h) analyzed by spectrophotometric analysis. Data are expressed as percentage of control cells.

D: Maximal complex I and II-linked respiration rates in patient cell lines treated or not with NMN (0,1mM, 72h). Data are expressed as percentage of control cells.

1. Kim, H. J., Kim, J. H., Noh, S., Hur, H. J., Sung, M. J., Hwang, J. T., Park, J. H., Yang, H. J., Kim, M. S., Kwon, D. Y. & Yoon, S. H. (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice, *Journal of proteome research*. **10**, 722-31.
2. Chen, D., Bruno, J., Easlon, E., Lin, S. J., Cheng, H. L., Alt, F. W. & Guarente, L. (2008) Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction, *Genes & development*. **22**, 1753-7.
3. Canto, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J. R. & Auwerx, J. (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle, *Cell metabolism*. **11**, 213-9.
4. Houtkooper, R. H. & Auwerx, J. (2012) Exploring the therapeutic space around NAD⁺, *The Journal of cell biology*. **199**, 205-9.
5. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan, *Nature reviews Molecular cell biology*. **13**, 225-38.
6. Canto, C. & Auwerx, J. (2009) PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure, *Current opinion in lipidology*. **20**, 98-105.
7. Scarpulla, R. C. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network, *Biochimica et biophysica acta*. **1813**, 1269-78.
8. Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Leman, G., Baron, S., Nivet-Antoine, V., Chupin, S., Chevrollier, A., Vessieres, E., Ayer, A., Ferre, M., Bonneau, D., Henrion, D., Reynier, P. & Procaccio, V. (2013) Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells, *The Journal of biological chemistry*. **288**, 36662-75.
9. Karamanlidis, G., Lee, C. F., Garcia-Menendez, L., Kolwicz, S. C., Jr., Suthammarak, W., Gong, G., Sedensky, M. M., Morgan, P. G., Wang, W. & Tian, R. (2013) Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure, *Cell metabolism*. **18**, 239-50.
10. Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M. & Sato, T. (2006) Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*, *Journal of bacteriology*. **188**, 7062-71.
11. Angebault, C., Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Chevrollier, A., Guillet, V., Verny, C., Cassereau, J., Ferre, M., Milea, D., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Procaccio, V., Reynier, P. & Loiseau, D. (2011) Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHON patients while producing contradictory effects on respiration, *BMC research notes*. **4**, 557.
12. Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stockl, P., Jansen-Durr, P. & Gnaiger, E. (2004) Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts, *The Biochemical journal*. **380**, 919-28.
13. Graham, J. M. (2001) Isolation of mitochondria from tissues and cells by differential centrifugation, *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]*. **Chapter 3**, Unit 3 3.
14. Assouline, Z., Jambou, M., Rio, M., Bole-Feysot, C., de Lonlay, P., Barnerias, C., Desguerre, I., Bonnemains, C., Guillermet, C., Steffann, J., Munnich, A., Bonnefont, J. P., Rotig, A. & Lebre, A. S. (2012) A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUFS4 mutations in patients with Leigh syndrome, *Biochimica et biophysica acta*. **1822**, 1062-9.

15. Valsecchi, F., Monge, C., Forkink, M., de Groof, A. J., Benard, G., Rossignol, R., Swarts, H. G., van Emst-de Vries, S. E., Rodenburg, R. J., Calvaruso, M. A., Nijtmans, L. G., Heeman, B., Roestenberg, P., Wieringa, B., Smeitink, J. A., Koopman, W. J. & Willems, P. H. (2012) Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblasts, *Biochimica et biophysica acta*. **1817**, 1925-36.
16. Alano, C. C., Tran, A., Tao, R., Ying, W., Karliner, J. S. & Swanson, R. A. (2007) Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes, *Journal of neuroscience research*. **85**, 3378-85.
17. Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., Yagi, T. & Felding-Habermann, B. (2013) Mitochondrial complex I activity and NAD+/NADH balance regulate breast cancer progression, *The Journal of clinical investigation*. **123**, 1068-81.
18. Haigis, M. C. & Guarente, L. P. (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction, *Genes & development*. **20**, 2913-21.
19. Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V. & Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions, *Science*. **325**, 834-40.
20. Peek, C. B., Affinati, A. H., Ramsey, K. M., Kuo, H. Y., Yu, W., Sena, L. A., Ilkayeva, O., Marcheva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., Levine, D. C., Bacsik, D. J., Gius, D., Newgard, C. B., Goetzman, E., Chandel, N. S., Denu, J. M., Mrksich, M. & Bass, J. (2013) Circadian clock NAD+ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice, *Science*. **342**, 1243417.
21. Shi, T., Wang, F., Stieren, E. & Tong, Q. (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes, *The Journal of biological chemistry*. **280**, 13560-7.
22. Finley, L. W., Haas, W., Desquirit-Dumas, V., Wallace, D. C., Procaccio, V., Gygi, S. P. & Haigis, M. C. (2011) Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity, *PLoS one*. **6**, e23295.
23. Tao, R., Coleman, M. C., Pennington, J. D., Ozden, O., Park, S. H., Jiang, H., Kim, H. S., Flynn, C. R., Hill, S., Hayes McDonald, W., Olivier, A. K., Spitz, D. R. & Gius, D. (2010) Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress, *Molecular cell*. **40**, 893-904.
24. Verdin, E., Hirschey, M. D., Finley, L. W. & Haigis, M. C. (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling, *Trends in biochemical sciences*. **35**, 669-75.
25. Ghanta, S., Grossmann, R. E. & Brenner, C. (2013) Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. **48**, 561-74.
26. Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C. F. & Steegborn, C. (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5, *Journal of molecular biology*. **382**, 790-801.
27. Ahn, B. H., Kim, H. S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C. X. & Finkel, T. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 14447-52.

28. Bharathi, S. S., Zhang, Y., Mohsen, A. W., Uppala, R., Balasubramani, M., Schreiber, E., Uechi, G., Beck, M. E., Rardin, M. J., Vockley, J., Verdin, E., Gibson, B. W., Hirschey, M. D. & Goetzman, E. S. (2013) Sirtuin 3 (SIRT3) protein regulates long-chain acyl-CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site, *The Journal of biological chemistry*. **288**, 33837-47.
29. Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. & Chen, D. (2010) Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation, *Cell metabolism*. **12**, 662-7.
30. Finley, L. W. & Haigis, M. C. (2012) Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis, *Trends in molecular medicine*. **18**, 516-23.
31. Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Jr., Alt, F. W., Kahn, C. R. & Verdin, E. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation, *Nature*. **464**, 121-5.
32. Ozden, O., Park, S. H., Kim, H. S., Jiang, H., Coleman, M. C., Spitz, D. R. & Gius, D. (2011) Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress, *Aging*. **3**, 102-7.
33. Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Lei, Q., Guan, K. L., Zhao, S. & Xiong, Y. (2011) Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS, *EMBO reports*. **12**, 534-41.
34. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice, *Cell metabolism*. **14**, 528-36.
35. Wagner, G. R., Pride, P. M., Babbey, C. M. & Payne, R. M. (2012) Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase, *Human molecular genetics*. **21**, 2688-97.
36. Sauve, A. A. (2008) NAD+ and vitamin B3: from metabolism to therapies, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **324**, 883-93.
37. Altschul, R., Hoffer, A. & Stephen, J. D. (1955) Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man, *Archives of biochemistry and biophysics*. **54**, 558-9.
38. Cantor, J. R. & Sabatini, D. M. (2012) Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces, *Cancer discovery*. **2**, 881-98.
39. Yamamoto, T., Byun, J., Zhai, P., Ikeda, Y., Oka, S. & Sadoshima, J. (2014) Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD+ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion, *PloS one*. **9**, e98972.
40. Dou, X., Shen, C., Wang, Z., Li, S., Zhang, X. & Song, Z. (2013) Protection of nicotinic acid against oxidative stress-induced cell death in hepatocytes contributes to its beneficial effect on alcohol-induced liver injury in mice, *The Journal of nutritional biochemistry*. **24**, 1520-8.
41. Chi, Y. & Sauve, A. A. (2013) Nicotinamide riboside, a trace nutrient in foods, is a vitamin B3 with effects on energy metabolism and neuroprotection, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. **16**, 657-61.
42. Wallace, D. C., Fan, W. & Procaccio, V. (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics, *Annu Rev Pathol*. **5**, 297-348.
43. Procaccio, V., Bris, C., Chao de la Barca, J. M., Oca, F., Chevrollier, A., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D. & Reynier, P. (2014) Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria, *Revue neurologique*. **170**, 390-400.

44. Lu, L., Tang, L., Wei, W., Hong, Y., Chen, H., Ying, W. & Chen, S. (2014) Nicotinamide mononucleotide improves energy activity and survival rate in an model of Parkinson's disease, *Experimental and therapeutic medicine*. **8**, 943-950.
45. Forsyth, L. M., Preuss, H. G., MacDowell, A. L., Chiazze, L., Jr., Birkmayer, G. D. & Bellanti, J. A. (1999) Therapeutic effects of oral NADH on the symptoms of patients with chronic fatigue syndrome, *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. **82**, 185-91.
46. Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., Hashimoto, T. & Tsuchiya, M. (2007) Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells, *The Journal of biological chemistry*. **282**, 24574-82.
47. Jackson, T. M., Rawling, J. M., Roebuck, B. D. & Kirkland, J. B. (1995) Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD⁺ and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats, *The Journal of nutrition*. **125**, 1455-61.

Résultats et Discussion Articles 3 et 4 :

Un gradient de sévérité de l'atteinte catalytique est observé en fonction du module muté :

L'analyse des activités NADH déshydrogénase du module N, NADH:Ubiquinone Réductase du module N+Q, ainsi que la respiration liée au complexe I (reflet du pompage de protons au sein du module P), montre qu'il existe une différence de sévérité biochimique en fonction du module muté.

Le module N est responsable de l'oxydation du NADH, générant ainsi les électrons nécessaires à la réduction de la quinone. Ce transfert d'électrons est couplé à un pompage des protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, lequel est nécessaire à la synthèse d'ATP. Ainsi, notre étude montre que les mutations dans le module N impactent à la fois l'oxydation du NADH (réduction de 40% de l'activité NADH déshydrogénase, bien que non significative), l'activité NADH:Ubiquinone Réductase (réduction de 75%) ainsi que de la respiration liée à ce complexe (réduction de 60% par rapport aux cellules contrôles). L'impact des mutations semble donc sévère puisque celles-ci touchent l'ensemble des fonctions catalytiques du complexe I. L'analyse biochimique menée semble corrélérer avec la sévérité clinique puisque ces patients p7 à p10 (mutations dans les sous-unités NDUFV1 et NDUFS4) sont atteints du syndrome de Leigh.

A l'inverse, chez les patients porteurs de mutation dans le module P (responsable du pompage de protons), l'activité catalytique semble plus légèrement impactée. Chez ces patients, l'activité d'oxydation du substrat (NADH:HAR) n'est pas modifiée, alors que de la respiration liée au complexe I est diminuée, ce qui suggère bien un effet de la mutation essentiellement sur l'activité de pompage de protons. Majander *et al.*, (Majander, Huoponen et al. 1991) avaient également montré que la mutation m.11778G>A dans la sous-unité ND4 entraînait une diminution de la respiration liée au complexe I sans altérer significativement l'activité NADH déshydrogénase ou l'activité NADH:Ubiquinone réductase (NUR). Dans notre étude, l'activité NUR semble diminuée (-35%), mais à un degré moindre que les mutations affectant le module N ou Q (-75% et -65%, respectivement). Ces résultats suggèrent qu'un défaut de pompage de protons pourrait partiellement affecter la réduction de la quinone (Efremov, Baradaran et al. 2010). Là encore, l'atteinte biochimique semble en parti corrélérer à la clinique, puisque la majorité de ces patients présentent une atteinte moins sévère (syndrome de LHON p3, p4, p5).

Si les mutations au sein des modules N et Q entraînent bien une diminution de l'activité NUR, notre étude montre qu'une mutation dans une sous-unité du module P du complexe I, affecte peu cette activité. En effet, comme le souligne l'étude de Tucker *et al.*, la mesure de l'activité

NNUR ne tient pas compte de l'activité de pompage de protons par le complexe I (Tucker, Compton et al. 2011). En revanche, l'analyse de la respiration liée au complexe I, (qui teste la fonctionnalité globale du complexe I, de l'oxydation du NADH au pompage de protons) a montré que tous les patients présentaient une respiration liée au complexe I considérée comme pathologique. L'analyse fonctionnelle par oxygraphie apparaît donc comme un bon complément à l'analyse enzymatique pour le diagnostic des déficits du complexe I.

Le défaut d'assemblage du complexe I induit une production de ROS

Le complexe I est décrit comme le principal producteur de ROS mitochondrial (Hirst, King et al. 2008). Trois principaux sites de production au sein du complexe I ont été proposés : le site FMN, au sein du module N, ce qui est communément admis (Johnson, Choksi et al. 2003, Kussmaul and Hirst 2006), un site au niveau des centres Fe-S (centre N2, (Genova, Ventura et al. 2001), ou N1a, (Kushnareva, Murphy et al. 2002)) et le site quinone (radical semi-quinone) tous deux sur le module Q. Ces deux derniers sites de production restent débattus (Galkin and Brandt 2005). De plus, l'impact d'un déficit du complexe I sur la production de ROS, et le site de production potentiellement impliqué, ne sont pas clairement établis (Kirkinetzos and Moraes 2001). Affiner notre compréhension des mécanismes à l'origine de la production des ROS au sein des déficits du complexe I semble donc un préalable essentiel pour la proposition d'un rationnel thérapeutique. Nous avons ainsi évalué la production de ROS en fonction des différentes mutations et investigué l'éventuel site impliqué dans cette production.

La mesure de la production de ROS sur complexe I isolé a montré que l'activité NADH:O₂ réductase est comparable chez les patients et les contrôles et ce quel que soit la sous-unité mutée. En présence de décylubiquinone, la production de ROS n'est pas augmentée : celle-ci n'est donc pas stimulée par une augmentation du turnover. Sur nos préparations, les intermédiaires catalytiques (Fe-S, semi-quinone) ne semblent donc pas être les sites majeurs de la production de ROS. La production de ROS par le complexe I des cellules contrôles et sur celles d'une partie de nos patients est même progressivement diminuée suite à l'ajout de décylubiquinone. La production de superoxydes par la FMN nécessite que ce cofacteur soit sous forme réduite et que le site de liaison (site de fixation des nucléotides) soit libre, lui permettant ainsi d'interagir avec l'oxygène (Kussmaul and Hirst 2006, Hirst, King et al. 2008, Murphy 2009). Ces deux facteurs sont étroitement dépendants du rapport NADH/NAD⁺, le NAD⁺ stoppant rapidement la production de ROS (Hirst, King et al. 2008). L'ajout de décylubiquinone, en accélérant le turnover, consomme le NADH et génère du NAD⁺, inhibant au final la production de ROS. Nos résultats confortent l'étude

de Hirst qui démontre que sur un complexe I isolé, la FMN apparaît comme le principal site de production de ROS (Hirst, King et al. 2008).

Cependant, sur les autres cellules de patients, l'ajout de décyubiquinone ne permet pas de réduire la production de ROS. Ceci suggère que la FMN reste donc sous forme réduite et libre. De manière intéressante, ces patients se caractérisent par la présence de deux intermédiaires d'assemblage correspondant à un intermédiaire d'environ 830kDa, constitué des modules P et Q et à environ 200kDa, le module N isolé. En accord avec nos résultats, Assouline *et al.*, (Assouline, Jambou et al. 2012) avaient précédemment démontré que les patients porteurs de mutations dans la sous-unité NDUFS4 arboraient un intermédiaire d'assemblage du complexe I à 830kDa. Pour ces patients, le site de fixation du NADH n'est plus physiquement connecté au site de fixation de l'ubiquinone et donc les réactions d'oxydation et réduction ne sont plus couplées. Cette dissociation entre les domaines catalytiques pourrait expliquer que l'ajout de décyubiquinone n'accélère pas l'oxydation du NADH pour ces patients avec l'absence de connexion du module N.

Dans ces cellules, l'augmentation de l'expression de la MnSOD couplée à la diminution des glutathions réduits et des thiols confirment la présence d'un stress oxydant à l'échelle cellulaire. Ainsi, le module N non connecté conserverait son activité NADH déshydrogénase, nécessaire à la formation de la FMN réduite. Valsecchi *et al.*, ont précédemment montré que les souris NDUFS4 KO présentaient, en plus de l'intermédiaire de 830kDa, un intermédiaire d'assemblage à 200kDa correspondant au module N, et possédant une activité NADH déshydrogénase (Valsecchi, Monge et al. 2012). En accord avec ces résultats, l'hypothèse de la présence d'un module N fonctionnel (malgré sa déconnexion) est renforcée par le fait que le rapport NADH/NAD⁺ est comparable pour ce groupe de patients à celui du groupe contrôle. Au contraire, les mutations situées dans le site de pompage de protons et le domaine de fixation de la quinone inhibent cette oxydation du NADH.

Une corrélation inverse entre la production de ROS et l'activité résiduelle du complexe I avait précédemment été établie (Verkaart, Koopman et al. 2007). Dans notre étude, une telle relation n'est pas retrouvée, certains patients présentent une diminution franche de l'activité NUR, sans augmentation détectable du stress oxydant. Cependant, à l'image de nos résultats, Verkaart *et al.*, observent également une relation linéaire entre l'activité résiduelle et la quantité de complexe I correctement assemblé. De plus, une récente étude menée chez la souris par Miwa *et al.*, propose que l'accumulation d'intermédiaires d'assemblages du complexe I possédant une activité catalytique résiduelle entraîne une production de ROS accrue. En effet, dans cette étude, les souris âgées ou les souches de souris présentant un vieillissement précoce montrent une augmentation de la production de ROS ainsi que la présence d'un intermédiaire d'assemblage du complexe I caractérisé par un module N non connecté (Miwa, Jow et al. 2014). En lien direct avec cette étude animale, notre

analyse met en évidence pour la première fois dans un modèle de pathologie humaine que la production de ROS est augmentée en cas de déconnexion entre les modules N et Q.

Le rapport NADH/NAD⁺ est augmenté par certains déficit du complexe I :

Les patients ne présentant pas de stress oxydant se caractérisent par un complexe I correctement assemblé, mais qui semble moins fonctionnel. La diminution de la fonctionnalité du complexe I est révélée dans notre étude par l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ au sein de la mitochondrie (rapport NADH/NAD⁺ cellulaire augmenté sans variation dans le cytosol). L'augmentation de ce rapport semble liée à l'activité du complexe I. En effet, une inhibition de l'activité de ce complexe par la roténone dans des cellules contrôles augmente significativement ce rapport. Cette étude démontre une fois encore que l'activité du complexe I contrôle le rapport NADH/NAD⁺ au sein de la mitochondrie (Gyan, Shiohira et al. 2006, Desquirit-Dumas, Gueguen et al. 2013). Le NAD⁺ apparaît comme un régulateur du métabolisme énergétique. Ce composé est le cofacteur de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique mitochondrial, des enzymes du cycle de Krebs (ICDH, α CGDH, MDH), de la β -oxydation des acides gras et des enzymes impliquées dans la régulation des voies d'apport en acétyl-coA (PDH). Ce composé est aussi le cofacteur des déacétylases dépendantes du NAD⁺, les sirtuines, qui apparaissent comme des régulateurs majeurs de la fonction mitochondriale. Ainsi, une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial, lors d'une mutation pourrait réduire l'activité des sirtuines et moduler le métabolisme mitochondrial.

Une hausse du rapport NADH/NAD⁺ augmente l'acétylation des cibles de SIRT3.

Des variations de la concentration en NAD⁺ peuvent induire des modulations de l'acétylation. Dans notre modèle, en corrélation avec l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ en lien avec le déficit du complexe I, une hyperacétylation des protéines mitochondriales est observée. SIRT3 est la principale déacétylase mitochondriale. L'activité de cette dernière semble inhibée dans notre modèle. En effet, l'acétylation de la MnSOD et de la SDH, considérées comme deux cibles principales de SIRT3, est fortement augmentée.

De plus, nos résultats démontrent que l'utilisation d'un précurseur du NAD⁺, le NMN, qui diminue le rapport NADH/NAD⁺, réduit l'hyperacétylation de la SDH. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de l'oxydation du NADH par le complexe I, dans le cas de certains déficits ou d'une inhibition de son activité, augmente le ratio NADH/NAD⁺, induisant une inhibition de SIRT3 et une hyperacétylation de ces cibles. Finley et *al.*, ont montré qu'une hyperacétylation de la sous-unité A de la SDH inhibait son activité (Finley, Haas et al. 2011). Dans notre étude, l'activité de la SDH chez nos patients n'est pas diminuée par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent

que l'hyperacétylation observée dans ce modèle n'a pas de conséquences fonctionnelles au moins dans des conditions basales. En accord avec ces résultats, les souris SIRT3 KO ne présentent pas de déficit lié à l'hyperacétylation en condition basale, celui-ci s'exprimant seulement en condition de stress (Lombard, Alt et al. 2007).

Un traitement des cellules présentant une augmentation du rapport NADH/NAD^+ avec du NMN, précurseur du NAD^+ , permet ainsi la diminution de ce rapport. Cet effet est suivi d'une diminution de l'acétylation des cibles de SIRT3 et d'une augmentation de l'activité de la phosphorylation oxydative. Des études complémentaires semblent nécessaires afin d'évaluer les voies moléculaires (SIRT3) à l'origine de cette augmentation ainsi que les conséquences de cette augmentation sur le métabolisme cellulaire. Cependant, ces premiers résultats laissent suggérer que le NMN pourrait être une molécule thérapeutique prometteuse dans les déficits du complexe I associés à un défaut d'oxydation du NADH.

Conclusion

Notre projet consistait à étudier le rôle du complexe I dans la régulation de la fonction mitochondriale par la modulation du rapport NADH/NAD^+ .

I. Le rapport NADH/NAD^+ régule le métabolisme mitochondrial

I.1. La Régulation du métabolisme grâce à l'activation de SIRT3

La mitochondrie tient une place importante dans le maintien de l'homéostasie cellulaire des nucléotides adényliques. En effet, cet organite séquestre une part importante du « pool » de NAD^+ (de 70% dans le cœur à 30% dans les astrocytes) (Di Lisa and Ziegler 2001, Alano, Tran et al. 2007) et permet de préserver le NAD^+ lors d'une déplétion cytosolique massive (Houtkooper, Canto et al. 2010, Stein and Imai 2012). De plus, les taux mitochondriaux de NAD^+ étant limitants, ce cofacteur joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique mitochondrial (Alano, Tran et al. 2007, Pittelli, Felici et al. 2011). Dans ce travail de thèse nous montrons qu'une variation du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial a des conséquences importantes sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ainsi, une augmentation du rapport NADH/NAD^+ induit notamment une hyperacétylation mitochondriale alors qu'à l'inverse une augmentation de la concentration mitochondriale en NAD^+ résulte en une déacétylation des protéines mitochondriales. Une des protéines clés impliquées dans ces phénomènes d'acétylation/déacétylation semble être SIRT3 l'isoforme mitochondriale des sirtuines la plus étudiée. Nous montrons qu'une des cibles connues de SIRT3 (la sous-unité SDHA) est déacétylée lorsque le rapport NADH/NAD^+ est réduit alors qu'elle est hyperacétylée lors de l'augmentation de la concentration de NADH. Ces résultats sont en accord avec Karamanlidis et *al.*, qui démontrent qu'une accumulation du NADH conduit à une inactivation de SIRT3 et donc à une hyperacétylation mitochondriale (Karamanlidis, Lee et al. 2013). Une augmentation de l'acétylation des protéines mitochondriales peut conduire à une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et de la respiration comme montré par He *et al.*, (2012) et très récemment par Paulin *et al.*, (He, Newman et al. 2012, Paulin, Dromparis et al. 2014). Cependant, d'autres études rapportent que même si l'inactivation de SIRT3 conduit à une hyperacétylation mitochondriale, les conséquences phénotypiques sont moindres.

Ainsi, l'activité des complexes I et IV et la respiration ne sont pas modifiées chez les souris SIRT3 KO. De même, l'enzyme de détoxification MnSOD est hyperacétylée en l'absence de SIRT3 mais les auteurs n'observent aucune conséquence sur le stress oxydant (Fernandez-Marcos, Jeninga et al. 2012). Les conséquences d'une hyperacétylation mitochondriale deviennent mesurables lorsque l'organisme ou les cellules sont placées en conditions de stress métaboliques (Lombard, Alt et al. 2007). Par exemple, lors d'un jeûne, les souris invalidées pour le gène SIRT3 accumulent des intermédiaires de la β -oxydation des acides gras et ont une diminution de la quantité d'ATP (Hirschey, Shimazu et al. 2010). Dans notre étude, bien qu'hyperacétylée, la SDH n'est pas inhibée suggérant à l'image des résultats obtenus pour la souris SIRT3 KO, que les conséquences fonctionnelles d'une hyperacétylation ne seraient visibles que lors d'un stress métabolique. Il pourrait ainsi être envisagé dans la suite de ce travail de placer les fibroblastes de patients présentant une augmentation de la concentration mitochondriale en NADH dans un milieu pauvre en glucose de manière à mimer une condition de privation en nutriments afin d'étudier les conséquences d'une hyperacétylation mitochondriale.

I.2. Autres voies impactées par une variation du rapport NADH/NAD⁺

Dans notre étude nous nous sommes focalisés sur les conséquences de l'augmentation ou de la diminution du rapport NADH/NAD⁺ sur l'activité de SIRT3. Bien que décrite comme ayant le plus de cibles mitochondriales, cette sirtuine n'est pas la seule isoforme mitochondriale. Ainsi, les protéines SIRT4 et SIRT5 possèdent également des cibles mitochondriales et pourrait donc être régulées par une variation du rapport NADH/NAD⁺ au sein du compartiment mitochondrial. SIRT4 possède plutôt une activité ADP ribosyl transférase et régule négativement l'activité de la glutamate déshydrogénase (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006). De plus, une diminution de l'expression de SIRT4 induit un dialogue rétrograde entre la mitochondrie et le noyau par l'intermédiaire de la protéine ANT2 et activerait ainsi la biogenèse mitochondriale par une voie AMPK dépendante (Ho, Titus et al. 2013). Récemment, SIRT4 a également été décrite comme un suppresseur de tumeurs dans différents modèles (Jeong, Xiao et al. 2013, Zhu, Yan et al. 2014). SIRT5 est quant à elle impliquée dans le cycle de l'urée en régulant l'activité de la carbamoyl phosphate synthase (Nakagawa, Lomb et al. 2009). Elle pourrait également déacétyler le cytochrome c (Schlicker, Gertz et al. 2008). Une étude récente dans laquelle les auteurs ont analysé le métabolisme mitochondrial dans des cellules HEK-293 après surexpression des différentes isoformes de sirtuines mitochondriales a montré que la surexpression de SIRT4 et SIRT5 conduit à une augmentation de la

respiration cellulaire ainsi qu'à une augmentation de l'oxydation des substrats (de Moura, Uppala et al. 2014). De manière intéressante, seule la surexpression de SIRT4 conduit à une diminution de la quantité de superoxydes et à une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (de Moura, Uppala et al. 2014). Bien que la variation d'expression de SIRT4 et SIRT5 semblent avoir des conséquences fonctionnelles sur la mitochondrie, les souris inactivées pour les gènes SIRT4 ou SIRT5 ne présentent pas d'hyperacétylation mitochondriale (Lombard, Alt et al. 2007). De même, peu d'études se sont intéressées à la régulation des isoformes SIRT4 et SIRT5 par le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial (Haigis, Mostoslavsky et al. 2006, Nakagawa, Lomb et al. 2009). Dans ce cadre, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression et ou l'activité de SIRT4 et SIRT5 dans nos modèles caractérisés par des variations du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial.

Enfin, l'activité des sirtuines nucléaires et cytosoliques pourraient aussi être influencée par une variation du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial. En effet, une augmentation de la concentration mitochondriale en NADH pourrait inhiber l'activité de la navette malate/aspartate et de la pyruvate déshydrogénase et ainsi modifier le rapport NADH/NAD⁺ cytosolique. SIRT1 est l'isoforme nucléaire et cytosolique la plus étudiée. Elle est bien connue pour réguler le métabolisme énergétique mitochondrial en activant la voie de biogenèse mitochondriale. De plus, une étude récente de Ryu et *al.*, montre que l'isoforme nucléaire SIRT7 pourrait stimuler la chaîne respiratoire en interagissant avec GABPβ1, un facteur de transcription important pour l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire codées par le génome nucléaire (Ryu, Jo et al. 2014). Le rapport NADH/NAD⁺ peut également influencer l'activité des enzymes du cycle de Krebs. En effet, Fendt et *al.*, ont montré qu'une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial limite l'entrée de l'acétylCoA dans le cycle de Krebs en inhibant la pyruvate déshydrogénase (Fendt, Bell et al. 2013). Dans leur étude, une restauration de ce rapport par l'ajout de NMN permet de lever cette inhibition.

Ainsi, de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme mitochondrial sont régulées par le rapport NADH/NAD⁺. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant ce rapport (synthèse et recyclage du NAD⁺, oxydation du NADH par le complexe I de la chaîne respiratoire) pourrait permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les pathologies où ce rapport est altéré (régime riche en lipides, vieillissement, pathologies mitochondriales).

II. Le complexe I est un régulateur du rapport $NADH/NAD^+$

Le complexe I est l'une des voies d'entrées majeures de la chaîne respiratoire et catalyse l'oxydation de NADH, couplée à une translocation de protons à travers la membrane interne mitochondriale, conduisant finalement à la production d'énergie. Par cette fonction, le complexe I "recycle" le NADH fournit par les voies d'apport en substrat (cycle de Krebs, β -oxydation...). Ainsi le rapport $NADH/NAD^+$ devrait résulter de l'équilibre entre l'oxydation du NADH par le complexe I et la synthèse intramitochondriale de NAD^+ d'un côté et sa réduction par le cycle de Krebs, la β -oxydation ou la navette malate/aspartate de l'autre. Cependant, l'impact d'une altération de l'activité du complexe I sur cet équilibre, et, par voie de conséquence, sur le métabolisme énergétique, reste très peu connu.

Ces dernières années, il a été montré que le complexe I pouvait effectivement réguler le métabolisme cellulaire. Ainsi, le rôle du complexe I dans le vieillissement a été abordé essentiellement chez *c.Elegans* et la drosophile. Récemment, ces études ont montré que la surexpression de la NADH déshydrogénase mitochondriale de levure (Ndi1) dans le système nerveux ou le tissu intestinal de drosophile augmenterait l'espérance de vie de celle-ci (Bahadorani, Cho et al. 2010, Hur, Stork et al. 2014). D'autre part, la diminution de l'activité de ce complexe (par KO de sous-unités) a été associée avec une tumorigenèse accrue dans les cellules tumorales MDA-MB-435 (He, Zhou et al. 2013, Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013). L'une des hypothèses expliquant ces résultats pourrait impliquer une modulation de la production de ROS. Cependant une modification de la balance $NADH/NAD^+$ pourrait également médier de tels effets. En effet, si l'inhibition de l'activité du complexe I peut augmenter l'activité métastatique des cellules issues de tumeur du sein MDA-MB-435, cet effet peut être mimé par l'inhibition de la NAMPT, enzyme impliquée dans la voie de sauvetage du NAD^+ (Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013). Ces résultats semblent placer la modulation de la concentration en NAD^+ comme un élément clé de la signalisation induite par une diminution d'activité du complexe I.

Dans les cellules de fibroblastes de patients présentant un déficit en complexe I (article 3), nous avons mis en évidence que des mutations dans une des sous-unités du module P, ou dans la sous-unité ND1 (intervenant dans la fixation de la quinone) entraînaient un défaut d'oxydation du NADH (diminution de la respiration maximale liée au complexe I) associé à une augmentation du rapport $NADH/NAD^+$ au sein de la mitochondrie. Le KO de la sous-unité NDUFV1, sous-unité impliquée

dans la fixation du NADH au complexe, augmente également le rapport NADH/NAD^+ dans les cellules MDA-MB-435 (Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013) ou dans les cellules musculaires C2C12 (Hong, Kim et al. 2014). Enfin, l'inhibition pharmacologique de l'activité NADH Ubiquinone Réductase par la roténone augmente également le rapport NADH/NAD^+ dans les fibroblastes contrôles (Article 4). L'ensemble de ces résultats confirment bien qu'une diminution de l'activité du complexe.

A l'inverse, nous avons pu montrer qu'une augmentation de l'activité du complexe I, induite par le resveratrol (article 1), entraîne une diminution du ratio NADH/NAD^+ dans les cellules hépatiques, à l'origine d'une stimulation du métabolisme mitochondrial par l'activation de SIRT3. Le rapport NADH/NAD^+ mitochondrial semble bien directement lié à la capacité d'oxydation du NADH, puisque la surexpression de la NADH déshydrogénase mitochondriale de levure NDI 1 dans des cellules MDA-MB-435 permet également de diminuer le rapport NADH/NAD^+ (Santidrian, Matsuno-Yagi et al. 2013).

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle central joué par le complexe I au sein de la mitochondrie. Ainsi, celui-ci est à la fois impliqué dans la synthèse d'ATP, via son rôle dans l'établissement du potentiel de membrane, mais également dans la régulation du rapport NADH/NAD^+ et donc des enzymes dont l'activité est NAD^+ dépendante. Augmenter l'activité du complexe I pourrait donc contrecarrer le déclin des fonctions mitochondriales qui survient au cours du vieillissement ou au cours de pathologies mitochondriales en augmentant le taux cellulaire en NAD^+ , permettant la mise en place d'une réponse homéostatique grâce à l'activation des sirtuines. Cependant, moduler l'activité du complexe I pourrait également induire des effets reverses, du fait de son rôle central dans la production de radicaux libres.

III. *L'état d'oxydo-réduction de la FMN du complexe I joue un rôle clé dans la production de ROS*

Le complexe I est reconnu comme l'un des contributeurs majeurs de la production mitochondriale de radicaux libres, et cette production de ROS semble particulièrement importante dans la physiopathologie des déficits en complexe I. Une étude récente sur l'expression génique de lignées cellulaires issues de patients avec des pathologies mitochondriales, incluant des déficits du complexe I (Voets, Huigsloot et al. 2012) a montré des modifications de l'expression génique, en grande partie liée aux voies de détoxification des ROS. Cependant, les mécanismes à l'origine de la surproduction de ROS dans le cadre d'un déficit du complexe. En effet, le(s) site(s) de production de ROS au sein du complexe reste encore largement débattu(s). La FMN réduite (Galkin and Brandt 2005, Vinogradov and Grivennikova 2005, Kussmaul and Hirst 2006), des espèces semiquinones (Lambert and Brand 2004, Ohnishi, Ohnishi et al. 2005) ou encore l'un des FE-S, N1a (Kushnareva, Murphy et al. 2002) ou N2 (Genova, Ventura et al. 2001) ont été suggérés comme les espèces impliquées dans la production de ROS.

Nos analyses menées *in vitro* sur complexe I solubilisé montrent que quel que soit la sous-unité mutée (mutation sur l'ADN mitochondrial ou nucléaire, touchant le module N, P ou le site de fixation des quinones), la production de ROS en absence d'accepteur d'électrons est relativement identique, et implique les espèces FMN réduites. Sur fibroblastes de patients atteints de la maladie de Parkinson, l'analyse de la production de ROS sur complexe I isolé a également démontré que le site FMN serait responsable de cette production. De même, une étude menée par Knuuti et al., (2013), a montré que la substitution d'un acide aminée dans NuoF (équivalent à NDUFV1), augmente l'affinité de la FMN pour l'oxygène et induit une production accrue de ROS (Knuuti, Belevich et al. 2013), ce qui pointe là encore ce site comme un site majeur de production de ROS au sein du complexe I. En situation physiologique, en présence de l'accepteur d'électron du complexe (quinone), la proportion de FMN réduite et libre est faible, la production de ROS est donc limitée (Maintien d'un rapport NADH/NAD^+ faible, (Murphy 2009, Birrell and Hirst 2013).

Notre travail (article 3) indique que dans des conditions pathologiques, un défaut d'assemblage entraîne la déconnection du module N des autres modules du complexe I, empêchant ainsi la ré-oxydation de la flavine. L'étude de Miwa et *al.*, (2014), qui lie l'abondance d'intermédiaires catalytiques déconnectés du complexe I, à la production de superoxydes mitochondriaux et à la sénescence cellulaire, appuie cette hypothèse (Miwa, Jow et al. 2014). Dans le cas de la mutation dans la sous-unité NDUFS7 de notre étude, un défaut d'assemblage est également observé et pourrait expliquer l'absence d'inhibition de la production de ROS par le décylobaliquinone. Cependant, aucun module matriciel n'a pu être mis en évidence par BN-Page (article 3). D'un autre côté, la sous-unité NDUFS7 contenant le centre N2, le transfert d'électrons du cluster à la quinone pourrait être altéré. Ce blocage fonctionnel du transfert d'électrons induirait une réduction de la FMN, favorisant la production de ROS. Ces résultats placeraient l'état de réduction de la FMN, et la capacité du complexe I à ré-oxyder celle-ci comme un facteur essentiel de la production de ROS. Cependant, cette hypothèse mériterait d'être plus amplement investiguée dans le cadre des déficits en complexe I, par exemple en analysant les effets d'autres mutations altérant le transfert des électrons à la quinone (autres défauts d'assemblage, mutation dans NDUFS2,...).

Les mutations entraînant un défaut d'assemblage et/ou d'oxydation de la quinone, sont également associées à un stress oxydant. Dans les cellules présentant une mutation du gène codant pour la sous-unité ND1, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'activité NUR, associée à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺. Cette augmentation du rapport NADH/NAD⁺ devrait favoriser une plus grande proportion de FMN réduite *in vivo*, et donc une plus forte production de ROS. Cependant, aucun stress oxydant n'a pu être mis en évidence sur ces cellules. Ces analyses mériteraient d'être poursuivies, par exemple en condition de stress nutritionnel (milieu appauvri en glucose) ou énergétique favorisant le métabolisme oxydatif, afin de vérifier si l'augmentation du ratio NADH/NAD⁺ induit ou non une production de ROS dans ces cellules.

L'ensemble de ces résultats indique qu'une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ et du taux de NAD⁺ pourrait à la fois activer la voie SIRT3, et donc l'activité des enzymes cibles de cette déacétylase en particulier agissant sur les enzymes anti-oxydantes, mais également inhiber la production de ROS, en jouant sur l'oxydation de la flavine du complexe I. Cibler ce rapport apparaît donc une stratégie intéressante dans les pathologies liées au vieillissement, ou dans les cas de déficit fonctionnel du complexe I.

IV. Stratégies thérapeutiques dans les déficits du complexe I

IV.1. RSV, une molécule candidate utilisée comme thérapeutique ?

IV.1.1. Modulation du rapport NADH/NAD⁺.

Les résultats de notre étude montrent que le traitement par RSV stimule le métabolisme énergétique mitochondrial hépatique en augmentant les voies d'apport en substrats. Ces effets sont dépendant de SIRT3, elle-même activée par la diminution du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial résultant de l'activation directe du complexe I par le RSV. Le fait que le RSV puisse moduler le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial paraît très intéressant sur le plan thérapeutique. En effet, comme le montre notre étude sur les patients porteurs de mutations dans des sous-unités du complexe I, le NADH peut s'accumuler dans la mitochondrie suite à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et entraîner un déséquilibre du rapport NADH/NAD⁺ en faveur du NADH. Le RSV en augmentant l'oxydation du NADH pourrait être capable de normaliser ce rapport. Cependant, pour les patients présentant un complexe I déficitaire, rien n'indique que ce complexe peut être à nouveau stimulé par une molécule pharmacologique. Une étude de Lopes Costa et *al.*, (Lopes Costa, Le Bachelier et al. 2014) a montré sur des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans des sous-unités nucléaires du complexe I qu'un traitement par RSV (75 µM pendant 48 à 72 heures) pouvait, dans certaines lignées, restaurer l'activité du complexe I et induire une biogenèse mitochondriale. La réponse ou non au RSV ne semble pas dépendre de la sous-unité mutée puisque le RSV avait par exemple un effet chez certains patients mutés dans NDUFV1 et pour d'autres non. De manière intéressante, les patients ne répondant pas au RSV étaient ceux dont la respiration était la plus diminuée, on peut émettre l'hypothèse que le RSV a un effet chez les patients présentant une oxydation du NADH encore fonctionnelle et pouvant être stimulée. Des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent que le RSV à plus faible dose (10 µM) permet également d'améliorer l'activité du complexe I ainsi que la respiration chez certains patients (ND1 et NDUFS4) mais de manière limitée. De plus, dans cette étude le RSV augmenterait également la production de lactate dans les fibroblastes contrôles et NDUFS4, un élément qui n'est pas en faveur d'un effet bénéfique majeur de cette molécule chez les patients présentant une altération du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial.

IV.1.2. Le RSV peut être une molécule pro-oxydante / Principe de mitohormesis

En outre, les résultats de ce travail de thèse montrent que le RSV, en interagissant avec le complexe I, induit un stress oxydant dans les mitochondries de cerveau de souris âgées. En effet, nos études (articles 1 et 2) montrent une interaction directe du resveratrol avec le complexe I, qui entraîne à faibles doses (jusqu'à 5 μ M) une stimulation de l'oxydation du NADH, mais, à des doses supérieures, une inhibition de l'activité du complexe I (article 2), (Zini, Morin et al. 1999, Moreira, Silva et al. 2013, Sassi, Mattarei et al. 2014). Cette inhibition de l'activité du complexe I est associée à une augmentation de la production mitochondriale de ROS (Moreira, Silva et al. 2013). Dans notre étude, sous sa forme réduite, la liaison du RSV au complexe I ne semble pas induire une production accrue de ROS. Cependant, sous sa forme hydroxylée, le resveratrol devient un accepteur d'électrons. Nos résultats montrent *in vitro* que sa réduction au niveau du site flavine du complexe I induit une augmentation de la production de superoxydes par le complexe. Cette augmentation de la production de ROS lors de la réduction du RSV pourrait être due à la génération d'une espèce semi-radicalaire du RSV. En effet, un tel mécanisme a auparavant été décrit pour le paraquat (Birrell, King et al. 2011) ou encore l'idébénone, une quinone hydrophile capable d'augmenter l'oxydation du NADH par le complexe I, mais dont la réduction au niveau du site FMN entraîne la production de semiquinones (King, Sharpley et al. 2009). Le RSV est notamment hydroxylé par des peroxidases ((Espin, Soler-Rivas et al. 2000, Pinto Mdel, Garcia-Barrado et al. 2003), telle que la glutathion peroxydase, (Lopez-Nicolas and Garcia-Carmona 2008).

De ce fait, dans la matrice mitochondriale, le RSV pourrait être principalement sous forme hydroxylée. L'analyse des formes oxydées/réduites du RSV présentes au sein de mitochondries isolées incubées en présence de ce composé permettrait de confirmer cette hypothèse. L'hypothèse d'un effet pro-oxydant du RSV dans la mitochondrie s'appuie sur nos résultats *in vivo*. Le groupe de souris traité RSV montre une induction des défenses oxydantes dans les mitochondries de cerveau.

L'activation des défenses antioxydantes par un effet pro-oxydant initial a été décrit pour de nombreuses molécules antioxydantes (notamment pour les polyphénols) et constitue le principe du concept de « mitohormesis ». En effet, même si à haute dose le stress oxydant induit des dommages cellulaires, à petite dose cette molécule pourrait avoir des effets bénéfiques. En 2006, Tapia a émis l'hypothèse que de nombreux effets bénéfiques observés notamment lors de la restriction calorique ou l'exercice (Tapia 2006), seraient dus à une exposition régulière à une faible dose de stress oxydant, ceci a été confirmé par une étude de Schulz et *al.*, en 2007 (Schulz, Zarse et al. 2007). Au

niveau moléculaire une réponse à de faibles quantités de ROS serait activée (augmentation de l'expression des défenses antioxydantes, réduction du métabolisme énergétique) induisant un dialogue rétrograde entre le noyau et la mitochondrie (activation de la biogénèse mitochondriale) (Ristow 2014, Ristow and Schmeisser 2014). Dans notre étude, le RSV induit également une augmentation de l'activité du complexe I chez les souris jeunes ce qui laisse supposer une production de ROS augmentée. Cependant, chez ces souris, la présence d'un système efficace de défenses antioxydantes permettrait d'y répondre. A l'inverse, chez les souris âgées, la diminution de l'expression des enzymes antioxydantes due au vieillissement ne permettrait plus de faire face à ce stress expliquant ainsi les effets délétères du stress oxydant observé. Ces propriétés pro-oxydantes du RSV sont d'ailleurs de plus en plus utilisées pour les traitements anti-cancéreux où cette molécule, en association avec la mitomycine C, bloque le cycle et stoppe la prolifération tumorale des cellules de cancer colorectal humain (Ali and Braun 2014).

Ces données renforcent l'idée que la dose de RSV utilisée tout comme les caractéristiques individuelles sont des éléments indispensables à prendre en compte afin d'optimiser les propriétés thérapeutiques de ce composé qui semblent néanmoins manifestes. Une des voies de potentialisation pourrait être l'amélioration de la biodisponibilité du RSV grâce à l'utilisation de nanoparticules (Amiot, Romier et al. 2013, Singh and Pai 2014). En effet, une fois dans l'organisme, le RSV est très rapidement métabolisé en dérivés glucuronides et sulfates (Wenzel and Somoza 2005) qui ont des effets biologiques moindres que le trans-RSV. Une étude a également proposé des dérivés de RSV adressés à la mitochondrie par couplage avec le cation lipophile triphénylphosphonium (TPP) (Sassi, Mattarei et al. 2014). Les résultats montrent une cytotoxicité de ces dérivés (notamment les dérivés acétyl et méthyle) liée à une augmentation de la production de ROS par les complexes I et III et un effet découplant dû à une interaction avec l'ATP synthase.

Le RSV, possède des propriétés pharmacologiques indéniables notamment pour les pathologies impliquant une dysfonction mitochondriale. Cependant, son instabilité, sa métabolisation rapide dans l'organisme ainsi que sa susceptibilité à former des espèces radicalaires en milieu oxydant pourrait rendre son utilisation thérapeutique difficile.

Néanmoins, la capacité du RSV à modifier le rapport NADH/NAD^+ mitochondrial reste très intéressante. Moduler ce rapport par un autre composé apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement des pathologies mitochondriales.

IV.2. Utilisation du nicotinamide mononucléotide (NMN)

Les deux études présentées dans ce mémoire démontrent que la modulation du rapport NADH/NAD^+ est un régulateur important de la fonction mitochondriale. Depuis quelques années, un nombre croissant d'études placent le NAD^+ et le rapport NADH/NAD^+ au centre de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme énergétique, l'homéostasie calcique, le stress oxydant, le vieillissement ou encore la mort cellulaire (Ying 2008). Ainsi, la modulation de ce rapport est évoquée comme cible thérapeutique dans le syndrome métabolique, le diabète, les pathologies neurodégénératives mais également les maladies mitochondriales héréditaires (Houtkooper and Auwerx 2012). Dans notre modèle de patients porteurs d'un déficit du complexe I, une telle stratégie paraît intéressante. Dans ce but, nous avons traité les fibroblastes de patients par un précurseur du NAD^+ , le nicotinamide mononucléotide (NMN). Cette molécule est un précurseur cytosolique de la synthèse mitochondriale du NAD^+ , organe dans lequel il est métabolisé par l'enzyme nicotinamide mononucléotide adénylyltransférase (NMNAT3) (Nikiforov, Dolle et al. 2011). Nos résultats montrent que le traitement au NMN (0.1mM ; 72h) permet, chez les patients présentant une accumulation de NADH , d'augmenter l'activité des complexes I et II, les voies d'entrées des substrats réduits ainsi que l'activité de la chaîne respiratoire en restaurant le rapport NADH/NAD^+ . Les cibles moléculaires à l'origine de cette augmentation restent à étudier. Au regard de nos résultats obtenus sur le tissu hépatique, nous pourrions émettre l'hypothèse que la cible moléculaire induite par l'augmentation du rapport NADH/NAD^+ chez nos patients est SIRT3. Cette sirtuine pourrait en plus d'induire l'activité des complexes (notamment I et II, qui possèdent tous deux des sous-unités pouvant être déacétylées), augmenter l'activité de ces cibles impliquées à la fois dans la β -oxydation (LCAD) et le cycle de Krebs (CS). D'autres précurseurs du NAD^+ tels que le nicotinamide riboside (NR), un analogue de la vitamine B3 pourraient être utilisés. Le NR présente l'avantage d'être présent dans l'alimentation (tel que le lait), ce qui n'est pas le cas du NMN. Le NR peut entrer dans la mitochondrie et être dégradé par la nicotinamide riboside kinase 2 (Nikiforov, Dolle et al. 2011). Une étude récente a montré que ce composé permet de réduire les symptômes de la souris Deletor présentant une myopathie mitochondriale (Khan, Auranen et al. 2014). Chez ces animaux, le NR augmente la biogenèse mitochondriale et active la protéine SIRT1. Ceci suggère plutôt un effet sur le rapport NADH/NAD^+ cytosolique étant donné la localisation subcellulaire de cette protéine. Cependant, Canto *et al.*, ont démontré que le NR pouvait augmenter également la quantité mitochondriale de NAD^+ et moduler l'activité de SIRT3 (Canto, Houtkooper et al. 2012). Aux vues des données bibliographiques et des résultats présentés dans cette étude, l'utilisation de précurseurs du NAD^+ pour restaurer le rapport NADH/NAD^+ mitochondrial apparaît

comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans les déficits du complexe I de la chaîne respiratoire mais plus largement dans toutes les pathologies impliquant une accumulation de NADH dans la mitochondrie. Les mécanismes moléculaires induits par ces dérivés restent cependant à caractériser.

IV.3. Voies de synthèse et dégradation du NAD⁺

Une autre stratégie pour diminuer le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial pourrait être d'activer les voies de synthèse ou de diminuer les voies de dégradation du NAD⁺. Dans la mitochondrie, le NAD⁺ est principalement synthétisé à partir du NMN par l'enzyme NMNAT-3. L'hypothèse selon laquelle activer NMNAT-3 permettrait d'accroître le taux mitochondrial de NAD⁺ paraît séduisante mais une étude de Felici *et al.*, en 2013 a montré que la surexpression de certaines isoformes de NMNAT-3 diminuait le taux de NAD⁺ de manière drastique conduisant à une diminution de potentiel de membrane mitochondrial et de la respiration (Felici, Lapucci et al. 2013). Les données concernant l'implication de NMNAT-3 dans la synthèse du NAD⁺ mitochondrial restent encore débattues. L'autre façon d'augmenter le « pool » mitochondrial en NAD⁺ serait d'inhiber sa dégradation par la protéine poly(ADP ribose) polymérase 1 (PARP1). Il a été montré que la délétion de PARP-1 augmente le contenu cellulaire en NAD⁺ et active SIRT1. Ceci résulte en une activation du métabolisme oxydatif (Bai, Canto et al. 2011). Deux inhibiteurs pharmacologiques de cette protéine, le 3,4-Dihydro-5[4-(1-piperindinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinoline (DPQ) et le 3 aminobenzamide (3-AB) ont également été utilisés et ont permis d'augmenter l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Pirinen, Canto et al. 2014). Wei et *al.*, suggère que SIRT3 serait une cible de PARP du fait du rôle de cette protéine qui contrôle la concentration mitochondriale de NAD⁺. Ainsi, l'inhibition de la protéine PARP, en induisant une diminution de rapport NADH/NAD⁺ permettrait l'activation de SIRT3 (Wei, Xing et al. 2013). De même, l'utilisation d'un autre inhibiteur de PARP, le MRLB-45696, s'est avérée une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement dans un modèle murin de cytopathie mitochondriale liée à l'invalidation du facteur d'assemblage SCO2 pour le complexe IV (Cerutti, Pirinen et al. 2014). Le mécanisme à l'origine de cette amélioration semble passer par une augmentation du taux cellulaire de NAD⁺ et l'activation de la protéine SIRT1. Ceci paraît particulièrement intéressant dans notre modèle, certains patients présentant une altération du rapport mitochondrial NADH/NAD⁺ et d'autres du rapport cytosolique. L'utilisation d'une molécule pharmacologique permettant de restaurer ce rapport à la fois dans les 2 compartiments cytoplasmique et mitochondrial est donc particulièrement séduisante. Cependant, ces inhibiteurs déjà utilisés en

chimiothérapie anticancéreuse présentent des effets secondaires non négligeables (Rouleau, Patel et al. 2010).

IV.4. Rôle des traitements antioxydants

Notre étude montre que les fibroblastes de patients porteurs de mutations du complexe I et présentant un désassemblage ont un stress oxydant. L'utilisation de molécules antioxydantes paraît donc utile dans un contexte de désassemblage des modules du complexe I. Le coenzyme Q10 ou un de ses analogues l'idébénone est donné en clinique comme traitement symptomatique dans les pathologies mitochondriales. Ces molécules ont été étudiées pour traiter les déficits du complexe I (Parikh, Saneto et al. 2009). Cependant, même si l'idébénone augmente l'activité du complexe I dans les fibroblastes de patients LHON, l'augmentation associée de la respiration est plus variable et semble patient-dépendant (Angebault, Gueguen et al. 2011).

En outre, l'idébénone pourrait également participer au maintien du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial puisque Giorgio *et al.*, ont montré en 2012 dans des modèles cybrides porteurs de mutations dans le gène ND1 et dans la lignée oncocytaire XTC (qui présente une mutation stop dans le gène ND1) que le traitement par idébénone induit une dépolarisation mitochondriale et une déplétion en NADH. Les auteurs émettent l'hypothèse que si la quinone est maintenue à l'état réduit par l'enzyme dicoumarol-sensible NAD(P)H:quinone oxydoréductase 1, le transfert d'électrons du vers le complexe III permettrait la réoxydation du NADH qui s'accumule dans les déficits du complexe I (Giorgio, Petronilli et al. 2012). Cette stratégie semble intéressante mais des études complémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender les acteurs moléculaires mis en jeu dans ce mécanisme.

IV.5. Restaurer l'assemblage du complexe I

Dans l'étude présentée ici, la majorité des patients porteurs de mutations nucléaires dans des sous-unités du complexe I présentent un défaut d'assemblage du complexe I. Cibler ce défaut d'assemblage pourrait être une stratégie thérapeutique, cependant peu d'études ont montré que l'assemblage pouvait être modifié. Une étude menée sur des cellules SHSY-5Y porteuses d'une mutation hétéroplasmique en position m.3243A>G de l'ADN mitochondrial a montré que l'incubation en milieu appauvri en glucose pouvait induire une diminution du taux d'hétéroplasmie, réduire le désassemblage du complexe I et ainsi améliorer son activité (Desquiret-Dumas, Gueguen et al. 2012). Dans notre étude, les mutations induisant un désassemblage sont des mutations

nucléaires situées dans le module N. Diminuer la synthèse des sous-unités du module N présentant une mutation pourrait apparaître comme une alternative. Une étude menée chez la souris par Miwa *et al.*, montre que le vieillissement induit un défaut d'assemblage du complexe I avec des intermédiaires d'assemblage. aboutissant à un stress oxydant par la FMN (Miwa, Jow et al. 2014). Il a été aussi montré le rôle de la prohibitine comme chaperone qui assurerait la protection de ces intermédiaires d'assemblages et donc l'oxydation du NADH par ce module N désassemblé et une production accrue de ROS. Dans cette étude, les auteurs démontrent également que la réduction de la synthèse des sous-unités composant le bras matriciel du complexe I par inhibition de la voie mTOR avec la rapamycine est corrélée à une plus grande longévité et à une diminution de la production de ROS. Notre étude a aussi démontré que le stress oxydant chez les patients porteurs de mutations dans une sous-unité du complexe I est lié au défaut d'assemblage et notamment à la présence d'un module N libre non connecté aux autres modules, l'élimination de ce dernier pourrait permettre de diminuer le stress oxydant dans ces cellules.

Fiches techniques

Fiche 1 : Culture de cellules fibroblastiques et d'hépatocarcinome humain.

Réactifs :

DMEM F12 (Institut de Biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France)

SVF (Institut de Biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France)

Amniomax (Gibco, New York, USA)

PBS sans calcium ni magnésium (Eurobio, Paris, France)

Trypsine-EDTA (Gibco, Paris, France)

Uridine (Sigma Aldrich, Paris, France)

Sodium Pyruvate (Sigma Aldrich, Paris, France)

L-Glutamine (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

Technique :

Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide avec 5% de CO₂.

Les fibroblastes sont issus de biopsies cutanées de patients porteurs de mutations dans des sous-unités du complexe I ou d'individus sains et sont cultivées dans un milieu contenant 2/3 de DMEM F12, 1/3 d'Amniomax supplémenté avec 10% de SVF, 50µg/ml d'uridine et 100µg/ml de pyruvate.

Les cellules HepG2 sont une lignée d'hépatocarcinome humain et sont cultivées dans un milieu contenant du DMEM F12, supplémenté avec 10% de SVF et 1mM de glutamine.

Passage des cellules :

Lorsque les cellules sont à confluences, elles sont lavées avec du PBS 1X, puis décollées avec de la trypsine 0,25%-EDTA 0,02% etensemencées dans de nouvelles boites selon la confluence nécessaire pour les expériences.

L'ensemble des travaux est réalisé sur des cellules à 80% de confluence. Dans le cas des fibroblastes, les travaux ont été réalisés sur des cellules avec un passage inférieur à 20 pour éviter les biais liés à la sénescence.

Réalisation de culots secs :

Les cellules sont décollées selon la méthode ci-dessus puis reprises par du PBS-5%SVF et centrifugées à 800g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X et

centrifugées de nouveau (5 minutes, 800g). Le surnageant est retiré et les culots sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et conservés à -80°C .

Fiche 2 : Modèle animal.

Réactifs :

Trans-Resveratrol (Sigma Aldrich, France)

Animaux :

Des souris mâles C57BL/6J de 3 et 6 mois ont été obtenues auprès de Janvier (Le Genest-St-Isle, France) et traitées en accord avec la directive 2010/63/EU du parlement européen.

Les cages se situent dans une salle dont la température et la lumière (une alternance de 12h de jour et 12h de nuit) sont contrôlées et reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté.

Après une période d'adaptation de 10 jours, les souris sont réparties en deux groupes : le groupe "jeune" constituées de souris sacrifiées à l'âge de 9 mois et le groupe "âgés" constitué de souris sacrifié à 24 mois. Au sein de chaque groupe (jeune et âgé), la moitié des souris reçoit un régime standard, l'autre reçoit un régime enrichi en RSV pendant 12 semaines (mg/kg/j).

Technique :

Suivi longitudinal : Les souris sont suivies pendant une période de 12 semaines. Une observation quotidienne, de leur comportement et de la santé des animaux, a été réalisée. La quantité de nourriture est elle aussi mesurée tous les jours (mesure de la différence entre la quantité donnée la veille et la quantité laissée). Toutes les deux semaines une pesée est réalisée.

Euthanasie : les animaux sont euthanasiés conformément aux directives de l'expérimentation animale. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane, puis ensuite euthanasiés par section de la veine cave. Les organes sont ensuite congelés à -80°C ou utilisé pour des analyses.

Fiche 3 : Isolement des mitochondries.

Réactifs :

Tampon Isolement mitochondries de foie, pH=7,4 :

Saccharose (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM

KCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM

Tris base (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM

EGTA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 5mM

Tampon Isolement mitochondries de cerveau, pH=7,4 :

Sucrose (sigma Aldrich, Lyon, France) : 250mM

Tris-Hcl (Eurobio, Paris, France) : 10mM

EDTA (Boehringer Ingelheim, Reims, France) : 1mM

BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,25mg/ml

Principe :

La technique se base sur du fractionnement cellulaire et des centrifugations différentielles et est adaptée de Krähanbühl *et al.*, (Krahenbuhl, Talos et al. 1994).

Technique :

A partir du tissu hépatique. Une partie du prélèvement est finement disséqué puis homogénéisé au potter (7 aller-retours 1000 t/min) dans un tampon d'isolement à hauteur de 10ml par grammes de tissu. L'homogénat est centrifugé pendant 10 minutes à 600g (pour éliminer le noyau et les débris cellulaires). Le surnageant est filtré sur une couche de gaze et centrifugé 3500g, 10 minutes. Le culot est ensuite repris dans 10ml de tampon d'isolement et la suspension est centrifugée à 3500g pendant 10 minutes. Le culot mitochondrial est enfin repris dans un minimum de tampon d'isolement et conservé dans la glace avant utilisation.

A partir du cerveau. Une partie du prélèvement est finement disséqué puis homogénéisé au potter (11 aller-retours 1000 t/min au potter large (50ml) puis 3 aller-retours avec le potter serré (4ml)) dans un tampon d'isolement cerveau à hauteur de 5ml. L'homogénat est centrifugé 3200g pendant 10 minutes. Cette centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires, les noyaux et les synaptosomes. Le surnageant est ensuite filtré sur une couche de gaze et centrifugé à 10000g

pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu avec 5ml de tampon d'isolement puis centrifugé à 6500g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot de mitochondries est délicatement homogénéisé à la tige boule dans 300µl de tampon d'isolement.

A partir des cellules. Les mitochondries sont isolées à partir d'un culot cellulaire repris à 100µl pour 7 millions de cellules avec du PBS 1X. La digitonine (4mg/ml) volume : volume est ajoutée afin d'isoler les mitochondries. La suspension cellulaire est incubée sous agitation douce 10 minutes à 4°C. La suspension de cellules perméabilisées est ensuite centrifugée à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Les mitochondries sont contenues dans le culot cellulaire issu de la centrifugation.

Fiche 4 : Dosage de protéines par mesure Spectrophotométrique.

Réactifs :

Kit BC Assay (Interchim, Montluçon, France) :

Solution d'acide bicinchoninique : réactif A

Solution de sulfate de cuivre : réactif B

Solution de standard de BSA (Bovine Serum Albumine) : 1mg/ml

Principe :

Les protéines en milieu alcalin réduisent les ions cuvriques Cu^{2+} en ions cuivre Cu^{+} . Les ions cuivre et l'acide bicinchoninique (contenu dans le kit) forment alors un complexe soluble violet absorbant à 562nm. L'absorbance à 562nm est donc directement proportionnelle à la concentration protéique, une droite étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA afin de déterminer la concentration protéique de notre échantillon.

Technique :

Une gamme de BSA est préparée à partir de la solution mère de BSA à 2mg/ml (0,125mg/ml, 0,250mg/ml, 0,5mg/ml). Les dilutions en cascade sont effectuées dans le solvant qui est utilisé dans la technique concernée (exemple : NaCl pour les dosages de complexes ou Ac/BT pour les BN Page).

Plusieurs dilutions des échantillons sont effectuées de manière à ce que les valeurs se situent la gamme de mesures. Les échantillons sont dilués dans le NaCl sauf pour le BNpage (tampon Ac/BT).

Un blanc contenant seulement la solution utilisée pour les dilutions est réalisé.

10 μ l du blanc, des points de gamme ou des échantillons sont déposés dans les puits d'une microplaque 96 puits. La solution de travail est réalisée de la manière suivante : Le réactif B est dilué au 50^{ème} dans le réactif A. puis 200 μ l de la solution sont ajoutés dans les puits.

La plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C puis l'absorbance est mesurée en point final à 562nm.

Fiche 5 : Mesure oxygraphique des respirations des complexes de la chaîne respiratoire.

Réactifs :

Tampon de respiration, pH=7,4 pour fibroblastes :

KH_2PO_4 : 10mM

Mannitol : 300mM

KCl : 10mM

MgCl_2 : 5mM

BSA : 1mg/ml

Tampon de respiration, pH=7,4 pour HePG2 (booster) :

KH_2PO_4 : 5mM

Sucrose : 225mM

Tris HCl : 10mM

MgCl_2 : 5mM

BSA : 2mg/ml

Tampon de respiration pour mitochondries isolées, ajusté à pH=7.4 :

Sucrose : 225mM

Tris-HCl : 10mM

KH_2PO_4 : 5mM

KCl : 10 mM

EDTA : 1mM

MgCl_2 : 4mM

BSA : 0.1%

Digitonine (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 5mg/ml chauffée à 95°C pendant 2 minutes 30 pour permettre une dissolution complète.

Malate (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 0,5M, pH=7,0

Pyruvate (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 0,5M, pH=7,0

Succinate (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 0,5M, pH=7,0

PalmytoylCoA (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 4mM (sur mitochondries isolées)

Glycérol-3-phosphate (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 0.2M (sur mitochondries isolées)

NAD^+ (Roche Diagnostics, Maylan, France) : 50mM

ADP (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 150mM (cellules) ou 0.05mM (mitochondries isolées)

Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5mM

Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 8mg/ml

KCN (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 200mM

Azide (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM

Ascorbate (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 400mM

TMPD (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 30mM (cellules), 50 mM (mitochondries isolées)

Principe :

Le principe de cette technique est de mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène de cellules perméabilisées ou de mitochondries isolées lors de l'apport des différents substrats des complexes de la chaîne respiratoire et à différents états métaboliques. Un oxygraphe de type Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Autriche) avec une électrode de Clark a été utilisé pour la mesure. L'électrode se compose d'une anode argent et d'une cathode en platine, connectées par une solution de KCl 1M (pour former un pont salin) et est recouverte d'une membrane perméable à l'oxygène. Une tension constante est appliquée aux deux électrodes de sorte que la cathode soit chargée négativement. Les ions Cl⁻ libérés attaquent l'argent, ce qui génère des électrons réduisant l'oxygène en eau en présence de protons. Le mouvement des électrons crée un courant électrique proportionnel à la concentration en oxygène qui est enregistré sous forme de potentiel. La variation de courant due à la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est donc proportionnelle à la concentration en oxygène dissout dans le milieu.

$$IR = \frac{p \times 203}{[c] \times 200}$$

IR Intensité Respiratoire (nmol O₂/min/mg_{prot})

p Pente mesurée sur le tracé (mm/min)

203 Solubilité de l'oxygène dans le milieu à 37°C (nmol O₂/ml)

200 pleine échelle (200mm)

c concentration protéique (mg/ml)

Le courant Le flux ainsi que la concentration en oxygène sont enregistrés sur le logiciel OROBOROS Datlab

Instrument :

L'oxygraphe est composé de deux chambres thermostatées de 2ml avec la possibilité d'une agitation douce.

Avant toute mesure l'appareil doit être calibré dans le milieu utilisé pour les mesures. Un 100% en oxygène est effectué en laissant la cuve ouverte. Un 0% (milieu privé d'oxygène) s'effectue à l'aide de dithionite.

Dans le cadre de l'étude de la respiration des cellules fibroblastiques, la mesure s'effectue à 37°C.

Technique :

Protocole pour les fibroblastes : Les cellules (minimum 4 millions) issues de la culture sont récoltées, reprise à hauteur de 50µl par million de cellules avec du tampon rustin sans BSA. Les cellules sont perméabilisées avec de la digitonine (15µg par million de cellules) pendant 2 minutes 30 sous agitation. L'action de la digitonine est stoppée grâce à l'ajout de 5 volumes de tampon Rustin contenant de la BSA. Les cellules sont culotés par centrifugation 2 minutes 30 à 800g. Les cellules contenues dans le culot sont reprises avec 200µl de tampon de respiration avec de la BSA et ajoutées à au 1,9ml de tampon de respiration avec de la BSA contenu dans la cuve de l'oxygraphe fermée hermétiquement à l'aide du bouchon.

Protocole pour les cellules HepG2 : Les cellules (minimum 3 millions) issues de la culture sont récoltées, reprise à hauteur de 50µl par million de cellules avec du tampon booster. Les cellules sont déposées dans la cuve (1.5mL final) et la cuve de l'oxygraphe fermée hermétiquement à l'aide du bouchon. Les cellules sont perméabilisées à l'intérieur de la cuve par l'ajout de la digitonine (7.5µg/M de cellules).

Protocole pour les mesures sur mitochondries isolées : (confère fiches techniques 3) sont réalisées sur 0.1mg de mitochondries (cerveau) ou 0.2mg (foie) QSP 2ml de tampon de respiration mitochondries contenu dans la cuve de l'oxygraphe fermée hermétiquement à l'aide du bouchon.

La mesure :

Des ajouts successifs des substrats suivant sont réalisés à l'aide de seringues :

- > Activation du complexe I : Malate + Pyruvate : 20µl chacun sauf HepG2 15µl (5mM final) (apport contrôlé par la PDH)
- > Activation de l'ATP synthase : ADP : 20µl ou 15µl HepG2 (1,5mM final) ou 0,5mM mitochondries tissulaires isolées
- > Test de l'intégrité membranaire : Cytochrome C : (320µM final)
- > Activation du complexe I : Glutamate : (5mM final) (apport non contrôlé par la PDH)
- > Activation du complexe II : Succinate : 40µl (10mM final)
- > Activation de la bêta-oxydation : PalmytoylCoA, 20 µl ou 15µl HepG2 (40 µM final)
- > Inhibition du complexe I : Roténone : 8µl ou 6µl HepG2 (10µM final)
- > Oligomycine : 2µl (8µg/ml final)
- > Antimycine : 3µl 1mg/ml
- > Activation du complexe IV : TMPD réduit par de l'Ascorbate (0,3mM et 4mM respectivement)

Le contenu des cuves est ensuite prélevé afin d'effectuer un dosage de protéines.

-> KCN et Azide : 20 μ l chacun (2 mM et 1 mM final, respectivement)

Fiche 6 : Mesure de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (Complexe I) sur cellules.

Réactifs :

Tampon A (tampon de re-suspension des cellules), ajusté à pH=7,2 :

Saccharose : 250mM

Tris : 20mM

EDTA : 2mM

BSA : 1mg/ml

Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France): 100mM, pH=7,4 :

Ubiquinone 1 (CoQH1) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5mM

Sodium Azide (NaN₃) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1M

Rotenone (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5mM

Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,5M

DCPIP (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 5mM, dissous à 37°C

NADH (Roche, Rosny-sous-bois, France) : 15mM

BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mg/ml

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe I à générer des électrons grâce à l'oxydation du NADH et de à transférer à un accepteur quinone (ici, le CoENZyme Q1 ou ubiquinone 1). Le dosage mesure donc l'activité NADH Ubiquinone Reductase. Celle-ci est adaptée de Kuznetsov *et al.*, (Kuznetsov, Schneeberger et al. 2004)

La réaction catalysée est donc :



Cette mesure est effectuée en présence d'un accepteur d'électrons artificiel, le 2,6 DiChloro-IndoPhénol (DCPIP). Celui-ci accepte les électrons de la dihydroquinone, et évite ainsi l'inhibition de la réaction par son produit, la quinone réduite (Benit, Slama et al. 2008). La diminution du DCPIP oxydée est suivie à 600nm. L'ajout de rotenone (inhibiteur du complexe I) permet de déterminer l'activité spécifique du complexe I, par soustraction de l'activité rotenone-insensible.

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco.

Technique :

Les cellules (minimum 3 millions) en culture sont récoltées, trypsinées et lavées au PBS 1X, puis culotées et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Ces culots secs sont conservés à -80°C jusqu'au dosage. Les culots sont alors repris à hauteur de 50µl de tampon A par million de cellules. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide pendant 3 minutes puis rapidement décongelées à 37°C. Les cellules lysées sont centrifugées 1 minute à 16000g. Le culot enrichi en mitochondries est resuspendu avec 50µl de tampon A par million de cellules. 1 Million de cellules (soit 50µl de suspension cellulaire) est soniqué dans un tube en verre, maintenu à 4°C, qsp 250µL de tampon A (amplitude de sonication 39%, 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication).

La mesure :

Le mélange réactionnel suivant est réalisé dans un tube en verre :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	815	80mM
KCN	2	1mM
NaN ₃	2	2mM
BSA	20	1mg/ml
Eau	QSP 1 ml	
CoQH ₁	40	0,1mM
DCPIP	15	75µM

Le mélange est incubé 2 minutes à 37°C. 250 000 cellules fibroblastiques ou 500 000 cellules HepG₂ sont ajoutés et 15µl de NADH (0,2mM final) sont nécessaires pour démarrer la réaction. La diminution d'absorbance est suivie à 600nm pendant 40s puis 4µl de roténone est ajouté.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe I est déterminée selon la formule suivante :

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

$$IR = \frac{(\Delta DO_{-ROT} - \Delta DO_{+ROT})}{l \times \epsilon_{\text{molécule}} \times S n_{\text{molécule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

ΔDO_{-ROT} : Variation de la densité optique en l'absence de roténone à 600nm

ΔDO_{+ROT} : Variation de la densité optique en présence de roténone à 600nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{molécule}}$ (DCPIP) : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600nm = $19.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$S n_{\text{molécule}}$ (DCPIP) : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_{total} : volume total dans la cuve en ml soit 1

V_{essai} : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.003ml

P : masse des protéines en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Le résultat obtenu est en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Fiche 7 : Dosage de l'activité NADH déshydrogénase sur complexes solubilisés.

Réactifs :

Tampon Reprise mitochondries fibroblastes pH=7,2

Mannitol : 220mM

Sucrose : 75mM

Tris-Base : 10mM

KCl : 150mM

EGTA : 1mM

Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM, pH=7,5

NADH (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 5mM

Hexaammineruthenium III chloride (HAR) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 350mM

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe I à générer des électrons grâce à l'oxydation du NADH et à les transférer à un accepteur interagissant directement avec le cofacteur FMN (ici, le HAR). La diminution de l'absorbance à 340nm est proportionnelle à la disparition du NADH. La technique est adaptée de Hirst *et al.*, (Hirst, King et al. 2008).

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco.

Technique :

Les mitochondries sont isolées à partir des cellules fibroblastiques comme décrit dans la fiche 3. Reprendre les mitochondries dans du tampon de Reprise mitochondries de fibroblastes à 10mg/ml dans du tampon d'isolement mitochondrie.

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en verre de la manière suivante :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	60	20mM

Cx solubilisé	3	
HAR	3	3,5mM
H ₂ O	210	

La réaction est initiée par l'ajout de NADH 3µl soit 50µM final. La disparition du NADH due à l'oxydation de celui-ci par le complexe I est suivie à 340nm.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe I est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molécule}} \times S_{n_{\text{molécule}}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot.⁻¹.

ΔDO : Variation de la densité optique à 340nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε molécule (NADH) : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340nm=6,22mM⁻¹.cm⁻¹

Snmolécule (NADH) : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.003ml

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en µmol.min⁻¹.mg⁻¹

Fiche 8 : Mesure de l'activité Succinate Ubiquinone Reductase (complexe II) sur fibroblastes.

Réactifs :

Tampon A (Confère Fiche N°6)

Tampon KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM, pH=7,5 :

Succinate (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,5M, ajusté à pH=7

EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10mM

Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10mM

DCPIP (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 5mM, dissous à 37°C

Antimycine A (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1mM

BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mg/ml

Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5mM

Ubiquinone-1 (Coenzyme Q1) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5 mM

Thénoyltrifluoroacétone (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 40 mM

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe II à générer des électrons grâce à l'oxydation du succinate et de les transférer à l'accepteur ubiquinone (ici Ubiquinone 1). L'ubiquinone est transformé en ubiquinol, lequel va lui-même réduire le DCPIP. La réduction du DCPIP est suivie à 600nm. Cette technique est adaptée de James *et al.*, (James, Wei et al. 1996).

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco.

Technique :

Les cellules (minimum 3 millions) en culture sont récoltées, trypsinées et lavées au PBS 1X, puis culotées et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Ces culots secs sont conservés à -80°C jusqu'au dosage. Les culots sont alors repris à hauteur de 50µl de tampon A par million de cellules. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide pendant 3 minutes puis rapidement décongelées à 37°C.

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en verre de la manière suivante :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	500	50mM
Succinate	40	20mM
KCN	200	2mM
EDTA	10	0,1mM
BSA	20	1mg/ml
Roténone	4	10µM
Antimycine A	2	2µM
Eau ppi	160	
DCPIP	15	80µM

Le mélange est incubé 2 minutes à 37°C. 500 000 cellules sont ajoutées et la réaction est initiée par l'addition de 20µl d'ubiquinone 1 à 2,5mM soit 50µM final. La diminution d'absorbance est suivie à 600nm pendant 40s. Puis 5µl de thénoltrifluoracétone (TTFA) sont ajoutés pour une concentration finale de 0,2 mM, la lecture est de nouveau suivie pendant 40s.

Formule :

L'activité enzymatique est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molécule}} \times S n_{\text{molécule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

ΔDO : Variation de la densité optique à 600nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε molécule (DCPIP) : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600nm=19.1mM⁻¹.cm⁻¹

Snmolécule (DCPIP) : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.003ml

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en µmol.min⁻¹.mg⁻¹

Fiche 9 : Dosage de l'activité de la Succinate Deshydrogénase.

Réactifs :

Tampon A (Confère Fiche N°6)

Tampon KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM, pH=7,5 :

Succinate (Acros, Noisy-Le-Grand, France) : 0,5M, ajusté à pH=7

KCN (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10mM

Phénazine méthosulfate (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 20mM

DCPIP (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 500 μ M

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe II à générer des électrons grâce à l'oxydation du succinate et de les transférer à un accepteur interagissant directement avec le cofacteur FADH de la SDHA (ici, la phénazine méthosulfate). La phénazine réduite va ensuite céder ses électrons au DCPIP. La réduction du DCPIP est suivie à 600nm. Cette technique dérive de James et al., (James, Wei et al. 1996).

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco.

Technique :

Les cellules (minimum 3 millions) en culture sont récoltées, trypsinées et lavées au PBS 1X, puis culotées et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Ces culots secs sont conservés à -80°C jusqu'au dosage. Les culots sont alors repris à hauteur de 50 μ l de tampon A par million de cellules. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide pendant 3 minutes puis rapidement décongelées à 37°C. Les cellules lysées sont centrifugées 1 minute à 16000g. Le culot enrichi en mitochondries est resuspendu avec 50 μ l de tampon A par million de cellules. 1 Million de cellules (soit 50 μ l de suspension cellulaire) est soniqué dans un tube en verre, maintenu à 4°C, qsp 250 μ l de tampon A (amplitude de sonication 39%, 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication).

Les dosages sur mitochondries sont réalisées sur mitochondries isolées (confère fiches techniques 3) à partir de foie ou de cerveau, et conservées aliquotées à -80°C.

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en verre de la manière suivante :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	500	50mM
Succinate	40	20mM
KCN	150	1,5mM
Phénazine méthosulfate	50	1mM
Echantillon		250 000 cellules ou 30µg/ml de protéines mitochondriales

Le mélange est incubé 4 minutes à 37°C. La réaction démarre avec l'ajout de 200µl de DCPIP. La diminution d'absorbance est suivie à 600nm pendant 90s.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe II est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molecule}} \times S n_{\text{molecule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en µmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

ΔDO : Variation de la densité optique à 600nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

εDCPIP : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600nm=19,1mM⁻¹.cm⁻¹

SnDCPIP : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.003ml

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en µmol.min⁻¹.mg⁻¹

Fiche 10 : Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome C Réductase (Complexe III) sur mitochondries isolées et fibroblastes.

Réactifs :

Tampon A (Confère Fiche N°6)

Tampon KH_2PO_4 (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 20mM, pH=7,8 :

Cytochrome c oxydé (Acros, Noisy-Le-Grand, France) : 1mM

Décyubiquinol : 25mM

EDTA (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 20mM

Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 10mM

Roténone (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 2,5mM

Antimycine A (Sigma Aldirch, Lyon, France) : 1mg/ml

BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mg/ml

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe III à oxyder l'ubiquinol en réduisant le cytochrome c. Le cytochrome c réduit absorbe à 550nm. L'augmentation de l'absorbance à 550 nm sera donc proportionnelle à l'activité de ce complexe. Afin de déterminer l'absorbance non spécifique, le dosage est réalisé en parallèle en présence d'antimycine, un inhibiteur spécifique de ce complexe. Cette technique est adaptée de Rustin *et al.*, (Rustin, Chretien et al. 1993).

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco

Technique :

Les cellules (minimum 3 millions) issues de la culture sont récoltées, reprise à hauteur de 50µl de tampon A par million de cellules. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide pendant 3 minutes puis rapidement décongelées à 37°C. Les cellules sont centrifugées 1 minute à 16000g. Le culot est resuspendu avec 50µl de tampon A par million de cellules.

La mesure a aussi été effectuée sur mitochondries isolées de cerveau et de foie préparé comme décrit dans la fiche technique 3.

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en verre de la manière suivante (1ml volume final):

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	500	10mM
KCN	24	0,24mM
EDTA	100	2mM
BSA	20	1mg/ml
Cytochrome C oxydé	40	40µM
Eau ppi	307	
Roténone	2	5µM
Cellules- Mitochondries	5 - 3	100 000 cellules

Réaliser une autre tube avec de l'antimycine 4µl à 1mg/ml soit 4µg/ml final.

Le mélange est incubé 2 minutes à 37°C. Démarrer la réaction avec 2µl de Décylubiquinol 25mM soit 75µM. L'augmentation de l'absorbance est suivie à 550nm pendant 66s.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe III est déterminée selon la formule suivante :

$$IR = \frac{(\Delta DO_{-ROT} - \Delta DO_{+ROT})}{l \times \epsilon_{\text{molecule}} \times S n_{\text{molecule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en µmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

ΔDO-ROT : Variation de la densité optique en l'absence de roténone à 600nm

ΔDO+ROT : Variation de la densité optique en présence de roténone à 600nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

εCyto_C : coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550nm=18,5mM⁻¹.cm⁻¹

SnCyto_C : nombre stœchiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.005ml ou

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$

Fiche 11: Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome C Oxydase (Complexe IV) sur fibroblastes et mitochondries.

Réactifs :

Tampon A (Confère Fiche N°6)

Tampon KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM, pH=6,5 :

Cytochrome C oxydé (Acros, Noisy-Le-Grand, France) : 1mM

Cytochrome C réduit (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100 μ M

Laurylmaltoside (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 125mM

BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mg/ml

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe IV à oxyder le cytochrome c. Le cytochrome c réduit absorbe à 550nm. La diminution de l'absorbance à 550nm sera donc proportionnelle à l'activité de ce complexe.

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco.

Technique :

Les cellules (minimum 3 millions) issues de la culture sont récoltées, reprise à hauteur de 50 μ l de tampon A par million de cellules. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide pendant 3 minutes puis rapidement décongelées à 37°C. Les cellules sont centrifugées 1 minute à 16000g. Le culot est resuspendu avec 50 μ l de tampon A par million de cellules.

La mesure a aussi été effectuée sur mitochondries isolées de cerveau et de foie préparé comme décrit dans la fiche technique 3.

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en verre de la manière suivante (1ml volume final):

Réactifs	Volume (μ l)	Concentration finale
----------	-------------------	----------------------

FICHES TECHNIQUES

Cytochrome C réduit	500	50µM
BSA	20	1mg/ml
Eau ppi	455	

Le mélange est incubé 3 minutes à 37°C. Démarrer la réaction avec 4µl de mitochondries ou 5µl de cellules soit 100 000 cellules et avec 20µl de Laurylmaltoside 125mM soit 2,5mM. La diminution d'absorbance est suivie à 550nm pendant 90s.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe IV est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molecule}} \times S n_{\text{molecule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en µmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

ΔDO : Variation de la densité optique à 550 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

εCyto C : coefficient d'extinction molaire du cytochrome C à 550nm=18,5mM⁻¹.cm⁻¹

Sn Cyto C : nombre stœchiométrique du cytochrome C dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml soit 0.005ml ou 0,004ml.

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en µmol.min⁻¹.mg⁻¹

Fiche 13: Dosage de l'activité de la citrate synthase.

Réactifs :

Tampon A (Confère Fiche N°6)

Tampon Tris (Eurobio, Paris, France) : 1M, pH=8,1 :

DTNB (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1mM

Acétyl CoA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10mM

Triton X100 (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10 %

Oxaloacétate (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10mM

Principe :

La citrate synthase, enzyme mitochondriale du cycle de Krebs, est utilisée comme référence de quantité de mitochondrie lors des dosages (Kirby, Thorburn et al. 2007). Cette enzyme catalyse la formation d'acide citrique à partir d'oxaloacétate et d'Acétyl-CoA. Le CoASH formé au cours de la réaction va réagir avec le 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) DTNB pour former le trinitrobenzène (TNB). Lors du dosage l'apparition du TNB est suivie à 412nm.

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco

Technique :

Comme pour les différents complexes dosés les cellules (minimum 0,5 millions) sont soit congelées décongelées puis utilisées pour le dosage ou congelées décongelées puis soniques.

Les dosages sur mitochondries sont réalisées sur mitochondries isolées (confère fiches techniques 3) à partir de foie ou de cerveau, et conservées aliquotées à -80°C

La mesure :

Le mélange suivant est réalisé dans un tube en plastique de la manière suivante (1ml volume final):

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
DTNB	150	150µM

FICHES TECHNIQUES

Oxaloacétate	50	500 μ M
Triton	10	0,1%
Eau PPI	755 ou 735	
Acétyl CoA	30	300 μ M

Le mélange est incubé 2 minutes à 37°C. La réaction est initiée par l'ajout de 100 000 cellules ou 4 μ l de mitochondries. L'augmentation de l'absorbance est suivie à 412nm pendant 90s.

Formule :

L'activité enzymatique du complexe V est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molecule}} \times S_{n_{\text{molecule}}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$.

ΔDO : Variation de la densité optique à 412nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ϵ_{DTNB} : coefficient d'extinction molaire du DTNB à 412nm = $13,6 \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$S_{n_{\text{DTNB}}}$: nombre stœchiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_{total} : volume total dans la cuve en ml soit 1

V_{essai} : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml

P : masse des proteines en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

Le résultat obtenu est en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Fiche 14: Dosage de l'ADP, ATP, AMP par HPLC.

Réactifs :

Solution d'extraction :

Méthanol : 50%

Chloroforme : 50%

Principe :

La technique consiste à séparer les différents nucléotides adényliques sur une colonne échangeuse d'anions spécifique des ions polyphosphates et polycarbonates. Brièvement, le culot repris dans la solution d'extraction puis est introduit dans la phase mobile de la colonne AS11. Cette phase est ensuite poussée dans la phase stationnaire dont le gel est greffé à des groupements alkanol ammonium quaternaire. Les différents composés vont être successivement retenus par la colonne, puis élués séparément. Un détecteur crée un chromatogramme (tracé des différents constituants du mélange ou chacun est représenté par un pic en fonction de son temps de rétention dans la colonne), l'amplitude du pic permet de déterminer la concentration des différents composés.

Instrument :

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec une colonne IonPac AS11 (Dionex Corporation, Sunnyvale, Californie, USA).

Technique :

Environ 6 millions de cellules fibroblastiques récoltées et 1 million de cellules sont préservés pour réaliser un dosage de protéines. Le reste est conservé en culot sec pour le dosage. L'ensemble des expériences s'effectue à froid. Le culot est repris par 300µl de tampon d'extraction et le lysat est vortexé pendant 30s dans la glace puis incubé 10 minutes dans la glace. 100µl d'H₂O sont ensuite ajoutés et l'ensemble est vortexé 30s et centrifugé à 14 000g pendant 10 minutes à 4°C. La fraction supérieure contenant les nucléotides est prélevée et déposée sur la colonne échangeuse d'anions. Les différents nucléotides présents dans le mélange retenus dans la colonne sont décrochés par un gradient isocratique continu d'élution composé de 30mM NaOH. La concentration en ATP, ADP et AMP est déterminée à partir de courbes standards et exprimée soit par million de cellules ou soit par mg de protéines.

Fiche 15 : Dosage NADH/NAD⁺ cellulaire

Réactifs :

NAD/NADH abcam Assay Kit contenant :

- Colonne 10KDa
- Extraction buffer
- NAD cycling Buffer
- NAD cycling enzyme Mix
- NADH developer
- NADH standard

Principe :

Cette technique est une réaction colorimétrique. Dans ce kit, le NAD⁺ interagit avec l'alcool déshydrogénase pour former de l'acétaldéhyde et du NADH. Le NADH formé réduit le sel de tétrazolium en un composé coloré, le formazan qui absorbe à 450nm. La quantité de formazan formée est proportionnelle au NAD⁺ présent dans le lysat cellulaire. Pour doser le NADH, il faut d'abord l'oxyder en NAD⁺ par la lactate déshydrogénase. Un même lysat cellulaire va être divisé en deux parties : l'une permettant de doser le NADH (destruction du NAD⁺ de l'échantillon par chauffage à 60°C) et l'autre dans laquelle le NADH+NAD⁺ va être dosé.

Instrument :

SAFAS® modèle Xenius Apparatus (SAFAS, Monaco, France)

Technique :

Environ 5 millions de cellules récoltées sous forme de culot sec et 1 million de cellules sont conservées pour réaliser un dosage de protéines. 800µl d'extraction buffer froid sont ajoutés pour lyser les membranes cellulaires. 2 cycles de congélation (20 minutes dans de la carboglace) et décongélation sont effectués, entre chaque cycle les tubes sont vortexés 10s. Une centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 14000g est ensuite réalisée. Le surnageant est filtré sur des colonnes de 10KDa (pour éliminer les enzymes susceptibles de dégrader le NAD⁺ et le NADH) par centrifugation pendant 15 minutes à 10000g à 4°C. La moitié de l'échantillon est ensuite chauffé à

60°C pendant 30 minutes afin de dégrader tout le NAD^+ présent, cette fraction servira à doser le NADH.

Sur une microplaque, une gamme en NADH (de 20pmol à 140pmol) puis les échantillons dilués dans du tampon d'extraction, un correspondant au NADH+NAD (non chauffé dilué au tiers) et un NADH (chauffé pur), sont déposés. 100 μl de mélange réactionnel composé de 100 μl de NAD cycling buffer Mix plus 2 μl de NAD cycling enzyme est ajouté à chaque puit. 10 μl de NADH developer est ajouté dans chacun des puits afin de déclencher la réaction. La plaque est incubée à température ambiante à l'abri de la lumière et une lecture à 450nm toutes les heures pendant 4h.

Une courbe standard permet, à partir de la DO obtenue, de déterminer la concentration en NADH. Les résultats sont exprimés en mg de protéines ou en millions de cellules.

Fiche 16 : Dosage NADH/NAD⁺ cytoplasmique.

La rapport NADH/NAD⁺ est déterminé à partir du rapport entre la concentration en lactate et celle en pyruvate.

Détermination de la quantité de lactate

Réactifs :

Lactate Assay Abcam contenant :

Lactate assay buffer

Lactate Enzyme Mix repris dans du lactate assay buffer

Lactate Substrat Mix repris dans du lactate assay buffer

L-Lactate Standard à 100mM

Principe :

Le lactate est oxydé par la lactate déshydrogénase en pyruvate. Cette réaction est couplée à la réduction du NAD⁺ en NADH. Le NADH formé réduit le sel de tétrazolium en un composé coloré, le formazan qui absorbe à 450nm. La densité optique est donc proportionnelle à l'activité de la lactate deshydrogénase et donc à la quantité de lactate.

Instrument :

SAFAS® modèle Xenius Apparatus (SAFAS, Monaco, France)

Technique :

L'analyse de la quantité de lactate s'effectue sur le surnageant congelé des cellules en culture. 1µl de surnageant sont déposés dans la plaque 96 puits de manière à ce que la quantité de lactate contenue dans ce volume soit dans une gamme de concentration pour laquelle l'activité de l'enzyme est linéaire. Une gamme est déposée en parallèle de l'échantillon, cette gamme est réalisée grâce au lactate standard (2 à 10nmoles). Le mélange réactionnel contenant 46µl de lactate assay buffer, 2µl de lactate substrat mix, 2µl de lactate enzyme mix est ajouté dans chaque puit. La lecture s'effectue après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

La quantité de lactate est déterminée à partir de la DO obtenue à 450nm, en la comparant à celles obtenues pour les échantillons contenus dans la gamme dont les concentrations sont connues. Le résultat est exprimé en nmol de lactate/mg de protéines ou en million de cellules.

Détermination de la quantité de pyruvate :

Réactifs :

Pyruvate Assay Abcam contenant :

Pyruvate assay buffer

Pyruvate Enzyme Mix repris dans du pyruvate assay buffer

Pyruvate Probe (resorufin) repris dans du DMSO

Pyruvate Standard à 100mM

Principe :

Le pyruvate est oxydé par la pyruvate oxydase. L'oxydation du pyruvate est couplé à la formation H_2O_2 qui, une fois métabolisée par l'horsetradish peroxidase (HRP) forme le composé resorufin qui absorbe à 570nm. La densité optique est donc proportionnelle à l'activité de la pyruvate oxydase et donc à la quantité de pyruvate.

Instrument :

SAFAS® modèle Xenius Apparatus (SAFAS, Monaco, France)

Technique :

L'analyse de la quantité de pyruvate s'effectue sur le surnageant congelé des cellules en culture. Du surnageant (12.5µl) est déposé dans la plaque 96 puits de manière à ce que la quantité de pyruvate contenue dans ce volume soit dans une gamme de concentrations pour laquelle l'activité de l'enzyme est linéaire. Une gamme est déposée en parallèle de l'échantillon, cette gamme est réalisée grâce au pyruvate standard (2 à 10nmoles). Un mélange réactionnel contenant du 46µl pyruvate assay buffer, 2µl pyruvate probe, 2µl pyruvate enzyme mix est réalisé et ajouté dans chaque puit. La lecture s'effectue après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

La quantité de pyruvate est déterminée à partir de la DO obtenue à 570nm, en la comparant à celles obtenues pour les échantillons contenus dans la gamme dont les concentrations sont connues. Le résultat est exprimé en nmol/mg de protéines ou en million de cellules.

Fiche 17 : Dosage de la quantité de glucose.

Réactifs :

Glucose Assay Abcam contenant :

Glucose assay buffer

Glucose Enzyme Mix repris dans du glucose assay buffer

Glucose Probe (resorufin) repris dans DMSO

Glucose Standard à 100nM/ μ l

Principe :

Le glucose est oxydé par glucose oxydase et forme de l' H_2O_2 . Cette molécule va être transformée par l'HRP pour former un composé (resorufin) absorbant à 570nm. La densité optique est donc proportionnelle à l'activité de la glucose oxydase et donc à la quantité de glucose.

Instrument :

SAFAS® modèle Xenius Apparatus (SAFAS, Monaco, France)

Technique :

L'analyse de la quantité de glucose s'effectue sur le surnageant des cellules en culture. Du surnageant (2 μ L dilué au 1/10) est déposé dans la plaque 96 puits de manière à ce que la quantité de glucose contenue dans ce volume soit dans une gamme de concentrations pour laquelle l'activité de l'enzyme est linéaire. Une gamme est déposée en parallèle de l'échantillon (2 à 10nmoles), cette gamme est réalisée grâce au glucose standard. Un mélange réactionnel contenant 46 μ l de glucose assay buffer, 2 μ l de glucose probe, et 2 μ l glucose enzyme mix est ajouté dans chaque puit. La lecture s'effectue après 30 minutes d'incubation à 37°C.

La quantité de glucose est déterminée à partir de la DO obtenue à 570nm, par comparaison avec celles obtenues pour les échantillons contenus dans la gamme dont les concentrations sont connues. Le résultat est exprimé en nmol/mg de protéines ou en million de cellules.

Fiche 18 : Dosage de l'O₂⁻ et de l'H₂O₂ produit par le complexe I.

Réactifs :

Tampon isolement mitochondrie

Mannitol : 220mM

Sucrose : 75mM

Tris-base : 10mM

KCl : 150mM

EGTA : 1mM

Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM, pH=7,5

Super Oxide Dismutase (SOD) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2U/μl

Horse Radish Peroxidase (HRP) (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1U/μl

Amplex Red (life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) : 10μM

NADH (Roche) : 6mM

Principe :

Le complexe I peut produire à la fois du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde, la SOD est donc utilisée pour convertir les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène. L'HRP va ensuite utiliser son substrat l'H₂O₂ pour oxyder l'Amplex Red en resorufin dont l'absorbance va être suivie à 572nm. L'absorbance est donc directement proportionnelle à la quantité de superoxydes et H₂O₂ produits par le complexe I.

Instrument :

La mesure est réalisée sur un spectrophotomètre SAFAS UVmc2, SAFAS, Monaco

Technique :

L'analyse de la quantité d'H₂O₂ produit par le complexe I s'effectue sur fraction enrichie en complexes mitochondriaux issues de mitochondries isolées à partir de cellules (fibroblastes) ou de tissus (cœur de bœuf).

La mesure :

Le mélange réactionnel suivant est nécessaire pour le dosage (tube en verre) :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon KH ₂ PO ₄	60	20mM
NADH	1,5	30µM
SOD	0,9	1,8U
HRP	0,6	0,6U
Amplex RED	1	10µM
H ₂ O ₂	210	
Complexes	60	

Le mélange est incubé 2 minutes à 37°C. La réaction est initiée par l'ajout de 1.5µl (30 µM) de NADH. L'absorbance est suivie à 572nm pendant 180s. Afin de déterminer le site de production de l'H₂O₂, un accepteur d'électron (le decylubiquinone, 100µM) et un inhibiteur du complexe I ciblant le site de fixation des quinones (la roténone 5µM) sont ajoutés.

Formule :

La production d'H₂O₂ (réduction de l'amplex red) est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{molecule}} \times S n_{\text{molecule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times p}$$

AS : activité spécifique en µmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

ΔDO : Variation de la densité optique à 572nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

εresorufin : coefficient d'extinction molaire de la resorufin à 572nm=73mM⁻¹.cm⁻¹

Snresorufin : nombre stœchiométrique du resorufin dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve en ml soit 1

Vessai : volume des échantillons ajouté dans le dosage en ml

P : masse des proteines en mg.ml⁻¹

Le résultat obtenu est en µmol.min⁻¹.mg⁻¹

Fiche 18: Extraction de l'ARN.

Réactifs :

Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) :

Tampon RPE

Tampon RLT

Tampon RW1

Colonne

Ethanol 70%

Culot cellulaire environ 2 millions

Principe :

La technique consiste à extraire les ARN totaux des cellules par rétention sur colonne de silice puis élution dans une solution peu concentrée en sels.

Instrument :

NanoDrop ® 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Technique :

Le culot cellulaire est dissout dans 600µl de tampon de lyse (tampon RLT +1/100e β-mercaptoéthanol). Le mélange est transféré dans une colonne QIAshredder contenu dans le kit. La colonne est centrifugée 2 minutes à la vitesse maximale de manière à lyser les cellules. 600µl d'éthanol 70% sont ajoutés à l'éluat (afin de précipiter l'ARN) et transférés sur la colonne de silice. Une centrifugation de 15 secondes à puissance maximale est réalisée. Des lavages successifs avec du tampon RW1 et RPE sont effectués pour éliminer les protéines liés à l'ARN et les traces d'alcools contenus dans les tampons. L'ARN est ensuite élué par de « l'eau RNase free ». La concentration de l'échantillon est dosée au nanodrop.

Fiche 19: PCR (RT-PCR).

Réactifs :

Kit Advantage ® RT-for-PCR (Clontech, Saint-Germain-en-Lay, France)

Principe :

La technique consiste en la synthèse d'ADN complémentaire à partir de des ARN totaux extraits. Une reverse transcriptase est nécessaire, ici elle est d'origine virale, la MMLV (« Moloney-Murine Leukémia Virus »).

Instrument :

Un thermocycleur ou un bain sec.

Technique :

Un volume correspondant à 1µg d'ARN est mélangé avec 1µl d'hexamere (soit 1µM final) et complété à 12,5µl avec de l'eau RNase free. La solution est placée 2 minutes à 70°C. Le mélange réactionnel suivant est réalisé :

- 4µl de tampon 5X (250mM Tris-HCl (pH=8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂)
- 1µl de la solution dNTP (500µM de chaque DNTP)
- 0,5µl de RNAsin (inhibiteur de ribonucléases) soit 20 unités
- 1µl de MMLV soit 200 unités

6,5µl du mélange réactionnel sont ajoutés à la solution d'ARN et chauffés à 42°C pendant 1h puis 5 minutes à 95°C pour inhiber l'action de l'enzyme.

L'ADN complémentaire ainsi synthétisé est dilué avec environ 80µl d'eau RNase free puis stocké à - 80°C.

Fiche 20: qPCR sirtuines.

Réactifs :

RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix

Principe :

La technique consiste à déterminer la quantité de transcrits d'une protéine donnée (ici sirt1, sirt3, sirt4) par analyse de l'amplification en temps réel de l'ADNc correspondant.

Technique :

Pour chaque échantillon, 400ng d'ADNc est nécessaire pour doser l'expression de sirt3 et sirt4 et 800ng pour sirt1.

Le mélange suivant est réalisé pour chaque tube :

12.5µl RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix

1µl d'amorces

13,5µl de ce mélange sont déposés dans les tubes auquel sont ajoutés la quantité d'échantillon et de l'eau RNase free pour un volume final de 25µl

En parallèle une gamme est réalisée afin de déterminer la concentration de nos échantillons à partir des CT obtenus.

Le programme du thermocycleur est le suivant : 95°C pendant 10 minutes puis 45 cycles comprenant 15s à 95°C, puis 30s à 55°C et 30s à 72°C. Fiche 21: Le Western Blot.

Réactifs :

Pour les gels :

Tris SDS, pH=8,8 :

Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1M

SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,2%

Tris SDS, pH=6,8 :

Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 325mM

SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,2%

TEMED (Eurobio, Courtaboeuf, France) :

Persulfate d'ammonium (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 10%

Isopropanol

Pour les échantillons:

Antiprotéase (Roche, Bâle, Suisse) : 25X

Marqueur de poids moléculaire : PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Tampon échantillon 2X, pH=6,8 :

Tris-HCl (Sigma Aldrich, Paris, France) : 0,4M

SDS (Eurobio, Paris, France) : 4,5%

Glycérol (Eurobio, Paris, France) : 4,5%

Bleu de bromophénol (Eurobio, Paris, France) : 2mM

β -Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, Lyon, France): 0,6M

Pour la migration:

Tampon électrophorèse, pH=8,3 :

Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 25mM

Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 192mM

SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,1%

Pour le transfert:

Tampon de transfert, pH=8,3 :

Tris (Eurobio, Paris, France) : 20mM

Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 150mM

Ethanol : 20%

Tampon TBS, pH=7,4 :

NaCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,2M

KCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5m

Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 25mM

Principe :

Cette technique permet d'analyser l'expression protéique d'un échantillon. Pour ce faire, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire sur un gel d'agarose, puis transférées sur une membrane. La révélation de la protéine d'intérêt s'effectue grâce à la reconnaissance d'un de ses motifs antigéniques par un anticorps primaire. Cet anticorps est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou à un groupement fluorescent. Dans le premier cas, la révélation s'effectue par chimioluminescence, dans le second elle s'effectue par fluorescence.

Instrument :

Les supports pour couler les gels : système Miniprotean, Biorad, CA, USA

La cuve à électrophorèse BioRad

Le transfert sur membrane BioRad

Technique :

1/ Préparation des gels

Deux gels sont préparés et coulés entre les deux plaques du système BioRad. Le premier gel correspond au gel de séparation. En fonction de la résolution du gel souhaité, donc en fonction de la taille de la protéine recherchée, la quantité d'acrylamide varie (Solution stock 30%).

Cas de deux gels 15% :

Réactifs	Volume (ml)
Tris SDS, pH=8,8	12,5
Acrylamide	12,5
H2O qsp 25	0

250µl de persulfate d'Ammonium à 10% et 12,5µl de TEMED sont ajoutés. Le gel est ensuite coulé et laissé à polymériser 30 minutes à température ambiante. De l'isopropanol est ajouté à la surface pour lisser la surface et éviter dessèchement du gel.

Le gel de concentration se situe au-dessus du gel de séparation et permet de concentrer les protéines contenues dans l'échantillon avant la migration.

Cas de deux gels de concentration :

Réactifs	Volume (ml)
H ₂ O	4
Tris SDS, pH=6,8	5
Acrylamide	1

100µl de persulfate d'Ammonium à 10% et 10µl de TEMED sont ajoutés. Le gel est ensuite coulé et le peigne est ajouté. Le gel est laissé à polymériser 30 minutes à température ambiante.

2/ Préparation des échantillons

Les western-blots sont réalisés à partir d'homogénat protéique issus de cellules ou de tissus broyés. De 20 à 150µg de protéines (dilués dans de l'eau additionnée d'antiprotéases 1X). La quantité dépend de l'expression de la protéine d'intérêt. Un volume de tampon d'échantillon 2X est ajouté et l'échantillon est dénaturé par chauffage (5 minutes à 50°C ou à 100°C selon les protéines). Les échantillons sont ensuite centrifugés puis déposés dans les puits.

3/ Electrophorèse et transfert

Les échantillons sont concentrés dans les puits pendant 10 minutes à 100 volts puis les protéines sont séparées par électrophorèse sur gels dénaturants (SDS) pendant environ 1h30 à 145 volts pour 2 gels et 150 volts pour 4 gels.

Le transfert semi-sec est réalisé sur membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène). Les membranes sont préparées par immersion dans un bain d'éthanol (30s), d'eau (5 minutes) et du tampon de transfert. La membrane est placée dans l'appareil de transfert BioRad entre deux éponges. Un courant constant de 260mA est appliqué pendant 30 minutes.

4/ Incubation avec les anticorps

La membrane est saturée pendant minimum 2h avec du lait 5% dilué dans du TBS 1X-Tween 0,1%. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS1X-Tween 0,1%. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'intérêt) pendant minimum 2h. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire (couplés au substrat de la HRP ou fluorescent).

5/ Révélation

La révélation s'effectue soit par fluorescence soit par chimiluminescence. Dans le cas d'une révélation par chimiluminescence de l'ECL (Amersham Biosciences, UK) est utilisé. L'image est acquise grâce à un imageur de type Li-Cor.

Fiche 22: Le Blue Native Page.

Réactifs :

Solubilisation des complexes :

Tampon AB/BT, pH=7 :

Acide Aminocaproïque : 1,5M final (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Bis Tris : 75mM final (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Antiprotéase (Roche, Bâle, Suisse) : 25X

n-Dodecyl β -D-maltoside : 125mM (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Digitonine : 50mg/ml (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Marqueur de poids moléculaire : Ferritine

Tampon de charge pH=7 :

Acide Aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 750mM final

Bis Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM final

EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,5mM final

Serva Blue G-250 (Biorad, Californie, USA) : 5%

Pour la migration :

Tampon d'électrophorèse A (tampon cathode A), pH=7 :

Bis-Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 500mM final

Tricine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM

Serva Blue G-250 (Biorad, Californie, USA) : 0,02%

Tampon d'électrophorèse B (tampon cathode A), pH=7 :

Bis-Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 500mM final

Tricine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM

Tampon anode, pH=7 :

Bis-Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 500mM final

Gels Bis-Tris, polyacrylamide en gradient 3-12 % ou 4-16% Novex Native Page (Invitrogen)

Pour le transfert :

Tampon de transfert :

Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 25mM

Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 192mM

Methanol : 20%

Principe :

Cette technique permet l'analyse de l'expression de protéines ou de complexes multi-protéiques en leur forme native. Le blue native poly-acrylamide gel electrophoresis est en effet une électrophorèse native de protéines ou complexes mutli-protéiques solubilisés grâce à des détergents zwitterioniques, non-inoniques, séparés en condition non-dénaturante selon leur poids moléculaire sur gel de gradient d'acrylamide. Dans cette technique, la charge nécessaire à la séparation et la résolution des protéines est apportées par le bleu de coomassie au lieu du SDS employé en western blot. Cette électrophorèse est suivie, si besoin, d'un transfert sur membrane comme pour le western blot. La révélation de la protéine s'effectue grâce à la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire. Cette technique est adaptée de Schagger *et al.*, (Schagger, Bentlage et al. 1996).

Instrument :

- système d'électrophorèse Surelock Xcell Invitrogen (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA)
- système de transfert liquide sur membrane MiniProtean II (BioRad)

Technique :

1/ Préparation des échantillons

Les mitochondries isolées (cf Figure 3) issues des cellules fibroblastiques sont reprises à 10mg/ml dans du tampon AC/BT supplémenté en inhibiteurs de protéase 1X. 50µg de mitochondries reprises sont prélevés et complétés avec de du tampon AC/BT plus inhibiteurs de protéases QSP 25µl. Pour l'étude des complexes de la chaine respiratoire, la solubilisation des complexes à partir des mitochondries s'effectue grâce à un traitement à base de n-Dodecyl β-D-maltoside à hauteur de 3g par grammes de protéines, 10 minutes sous agitation douce dans la glace. Pour l'étude des supercomplexes de la chaine respiratoire, la solubilisation des supercomplexes à partir des

membranes mitochondriales s'effectue grâce à un traitement à la digitonine à hauteur de 3g par grammes de protéines, 5 minutes à température ambiante. L'échantillon est ensuite centrifugé à 20 000g, 20 minutes, à 4°C afin de culoter les débris membranaires. Les complexes en solutions dans le surnageant sont ensuite supplémenté en tampon de charge, à raison de 2.5µl pour 25µl de surnageant.

2/ Electrophorèse et transfert

La ferritine est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Les échantillons sont déposés dans les puits puis séparés par électrophorèse. La cuve externe est remplie par de l'anode buffer, l'espace interne est emplie de tampon cathode A. La migration se déroule 30 minutes à 100 volts pour que les échantillons pénètrent dans le gel de concentration puis 150 volts pendant environ 45 minutes jusqu'à atteindre le premier tiers du gel. Le tampon cathode A, contenant du bleu de Coomassie, contenu au sein de l'espace étanche interne délimité par les deux gels, est enlevé et remplacé par du tampon d'électrophorèse dépourvu de Bleu de Coomassie (cathode B). L'ensemble est ensuite mis à migrer à 200 volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

Le transfert est réalisé sur membrane de PVDF. Les membranes sont hydratées par immersion dans un bain de méthanol (30s), puis dans du tampon de transfert. La membrane est placée sur une feuille de papier whatman lui-même déposé sur une éponge, le tout hydraté dans le tampon de transfert. Le gel recouvert par un papier whatman et une éponge, est placé sur la membrane. La cassette (support en plastique) contenant le "sandwich" avec le gel est placé dans l'appareil de transfert contenant du tampon de transfert. Le transfert s'effectue pendant 1h45 pour deux gels à 100 volts. Afin d'éviter que l'ensemble ne chauffe de la glace est ajoutée dans le support de transfert et le transfert s'effectue en chambre froide, à 4°C.

3/ Incubation avec les anticorps

La membrane est saturée pendant minimum 2h avec du lait 10% dilué dans du TBS 1X-Tween 0,1%. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS1X-Tween 0,1%, puis incubée avec l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine d'intérêt) pendant minimum 2h. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire (couplés au substrat de la HRP).

4/ Révélation

La révélation par chimiluminescence s'effectue grâce à de l'ECL (Amersham Biosciences, UK). L'image est acquise grâce à un imageur de type Li-Cor.

Fiche 23: L'immunoprécipitation des protéines acétylées.

Réactifs :

- préparation de l'anticorps

Anticorps anti-acetyl Lysine couplé à des billes d'agarose (Immunechem, Burnaby British Columbia, Canada).

Tampon de Lavage de l'anticorps :

NaH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,1M final

NaCl : 1M final

- immunoprécipitation

Lysis Buffer, pH=8:

NaCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 150mM

Tris-base (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 50mM

Triton (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1%

DTT (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1mM

Sodium Déoxycholate (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 100mM

Antiprotéase 1X (Roche, Bale, Suisse)

Fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) : 1mM,

Nicotinamide (Sigma Aldrich, Lyon, France) :10 mM,

Sodium butyrate(Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1mM

Tampon de lavage :

PBS 1X

Laurylmaltoside (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1mM

Tampon d'élution SDS :

Tris-HCl (Sigma Aldrich, Paris, France) : 0,2M

SDS (Eurobio, Paris, France) : 2.25%

Glycérol (Eurobio, Paris, France) : 2.25%

Bleu de bromophénol (Eurobio, Paris, France) : 1mM

β-Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,3M

Principe :

Cette technique permet d'isoler d'un lysat cellulaire les protéines acétylées. Pour ce faire, les protéines cellulaires sont tout d'abord extraites en présence d'un tampon de lyse cellulaire (tampon RIPA), et incubées en présence de l'anticorps dirigé contre les motifs acétylés en lysine. Cet anticorps est fixé à une bille d'agarose permettant d'immuno-précipiter les protéines acétylées fixées à l'anticorps par centrifugations. Le complexe anticorps-antigène est ensuite lavé, puis les protéines cibles éluées en tampon SDS. Les protéines acétylées sont ensuite séparées et identifiées par western blot.

Technique :

1/ Préparation des anticorps

Pour une immunoprécipitation de 2mg de protéines cellulaires, 40µl de la solution d'anticorps, soit 160µg d'anticorps sont nécessaires. L'anticorps est lavé deux fois 5 minutes avec du PBS1X afin d'éliminer le glycérol présent dans la solution de conservation. Entre chaque lavage l'anticorps est collecté par centrifugation 1 minute, à 5000rpm. Les billes d'agarose sont ensuite lavées grâce au tampon de lavage puis collectées par centrifugation 1 minute 5000rpm et un dernier lavage au PBS1X est réalisé.

2/ Extraction protéique

Un culot d'environ 20 millions de cellules (congelées en culots sec à -80°C) est repris avec 200µl de Lysis buffer. Afin de permettre la lyse cellulaire, l'ensemble est incubé sur un rotor avec une rotation de 45g pendant 20 minutes à 4°C. Les débris sont ensuite culotés par centrifugation 15 minutes, à 14000g et à 4°C et le surnageant est récolté. La concentration protéique de ce dernier est ensuite déterminé (fiche technique n°4).

1,5 mg de lysat cellulaire, pour un volume final de 180 µl est incubés en présence de l'anticorps pendant une nuit sur rotor, à 20rpm et à 4°C.

3/ Elution des protéines cibles

Les billes sont collectées par centrifugation 1 minute à 5000g et à 4°C. Le surnageant (protéines non acétylées) est enlevé. Les billes sont ensuite lavées trois fois sous agitation douce pendant 5 minutes avec du tampon de lavage. Les protéines acétylées sont ensuite éluées de l'anticorps en tampon SDS, sous agitation douce à 4°C, pendant 10 minutes. Les billes et l'anticorps sont précipités par centrifugation (2 minutes, 5000 rpm, à 4°C) et les protéines éluées dans le surnageant

sont intégralement chargées sur le gel d'électrophorèse pour séparation, puis et identifiées par Western Blot.

Fiche 24: Extinction protéique.

Deux techniques ont été utilisées pour diminuer l'expression d'une protéine :

L'ARN interférence

Le traitement par des inhibiteurs pharmacologiques

Les SiRNA (cellules HepG2)

Réactifs :

SiRNA dirigé contre sirt1, sirt3, sirt4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Mexique)

Cellules HepG2

Milieu de culture HepG2 (cf fiche 1 :DMEM F12, supplémenté avec 10% de SVF et 1mM de glutamine)

Opti-MEM ® (Gibco, life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Lipofectamine ® RNAiMAX (life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Principe :

La technique de transfection utilisée est une reverse transfection, le SiRNA puis l'agent transfectant (la lipofectamine) sont déposés dans les puits avant les cellules. Cette technique est utilisée pour les cellules qui sont difficilement transfectables.

Technique :

Dans une plaque 6 puits, 20pmoles de SiRNA sont déposés. 200µl de milieu Opti-MEM est ajouté puis 2µl de lipofectamine. Les cellules sont ensuiteensemencées de telle sorte à obtenir une confluence de 70 à 80% au bout de 72h (cas des HepG2 200 000 cellules). Le milieu est éventuellement changé au bout de 24h dans notre cas pour traiter les cellules avec resveratrol (1µM, 48h).

A l'issue des 72h les cellules sont récoltées, une partie sert alors analyser l'extinction protéique par western blot. La manipulation est validée si le taux résiduel de la protéine d'intérêt est inférieur à 20% par rapport aux cellules traitées par Scramble (un mélange d'ARN n'ayant pas de cible cellulaire connue).

Les inhibiteurs pharmacologiques

Réactifs :

Sirt1 inhibitor III (6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide) EX-527 IC₅₀=98nM, 19,6nM, 48,7nM pour respectivement sirt1, sirt3, Sirt4 (Merck, Lyon, France).

Liste des travaux

PUBLICATIONS :

- V. Desquiret-Dumas¹, N. Gueguen¹, G. Leman, S. Baron, S. Chupin, E. Vessières, A. Ayer, A. Chevrollier, V. Nivet-Antoine, P. Reynier, D. Henrion, V. Procaccio. Resveratrol activates mitochondrial sirtuins by an increase in electron leak from the complex I of the respiratory chain.

The Journal of Biological Chemistry. Octobre 2013

- N. Gueguen¹, V. Desquiret-Dumas¹, G. Leman¹, S. Chupin, S. Baron, V. Nivet-Antoine, E. Vessières, A. Ayer, D. Henrion, P. Reynier, V. Procaccio. Resveratrol binds to mitochondrial complex I and increases oxidative stress in brain mitochondria of aged mice.

BBA-Bioenergetics. Soumis 2014

- G. Leman¹, N. Gueguen², V. Desquiret-Dumas², M. Kane, C. Wetterwald, S. Chupin, A. Chevrollier, AS. Lebre, JP. Bonnefont, M. Barth, P. Amati-Bonneau, C. Verny, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio. Oxidative stress is linked to an assembly defect in inherited complex I deficiency

Soumission Octobre 2014. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.

- G. Leman, V. Desquiret-Dumas², N. Gueguen², G. Geoffroy, S. Chupin, A. Chevrollier, M. Barth, P. Amati-Bonneau, C. Verny, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio. NADH/NAD⁺ ratio is a key parameter in complex I deficiency: potential therapeutic target ?

Manuscrit en préparation. *FEBS Letter ou Molecular and cellular biochemistry*.

AUTRES TRAVAUX :

- Communications orales :

- G. Leman N. Gueguen², V. Desquiret-Dumas², G. Geoffroy, S. Chupin, A. Chevrollier, M. Barth, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio. NADH/NAD⁺ ratio is a key parameter in complex I deficiency: potential therapeutic target ?

Euromit, Tampere. Juin 2014

- G. Leman. Oxidative stress is linked to an assembly defect in inherited complex I deficiency.

Programme Mérimée, Saint Jacques de Compostelle. Avril 2014

- G. Leman. Oxidative stress is linked to an assembly defect in inherited complex I deficiency.

GFB, Carry le Rouet Septembre 2013

- Enseignement :

- Février à Mai 2013 : Monitorat (32h de Travaux Pratiques) – Université Catholique de l'Ouest – Angers.

- Février à Mai 2012 : Monitorat (32h de Travaux Pratiques) – Université Catholique de l'Ouest – Angers.

- Septembre à Décembre 2011 : Participation à l'organisation du semestre européen de médecine (JPEMS). Faculté de Médecine Angers.

Table des illustrations

Figure 1 : Structure de la mitochondrie.

Figure 2 : Le génome mitochondrial humain

Figure 3 : Les différentes réactions de la glycolyse

Figure 4 : Réaction catalysée par la lactate déshydrogénase

Figure 5 : Les différentes réactions de la β -oxydation des acides gras.

Figure 6 : Les différentes réactions du cycle de Krebs.

Figure 7 : Structure schématique des complexes de la chaîne respiratoire et le complexe ATP synthase.

Figure 8 : Les voies de détoxification de la matrice mitochondriale.

Figure 9 : La régulation du métabolisme énergétique par le calcium

Figure 10 : La régulation du métabolisme énergétique par l'ATP

Figure 11 : Schéma représentant la définition de l'hétéroplasmie

Figure 12 : Schéma représentant l'assemblage du complexe I

Figure 13 : Schéma des différents modules du complexe I et de ses fonctions catalytiques

Figure 14 : Mécanisme de l'oxydation du NADH et de la réduction de la FMN au sein du complexe I

Figure 15 : Structure détaillée de l'isoforme humaine SIRT5.

Figure 16 : Cibles moléculaires de SIRT1 et les principales voies métaboliques impactées

Figure 17 : Les principales cibles métaboliques de la déacétylase SIRT3

Figure 18 : Structure du Resveratrol, trans et cis.

Figure 19 : Le Resveratrol sous forme radicalaire.

Figure 20 : Les voies de synthèse et de recyclage du NAD⁺.

Figure 21: La maintenance du pool de NAD^+ mitochondrial.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	II
ABREVIATIONS.....	IV
AVANT PROPOS.....	VIII
SOMMAIRE.....	X
INTRODUCTION.....	0
I. LA MITOCHONDRIE : STRUCTURE - FONCTION.....	1
I.1. HISTORIQUE - ORIGINE.....	1
I.2. STRUCTURE.....	1
I.3. METABOLISME ET PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.....	3
I.3.1. La production des coenzymes réduits.....	4
a) Formation de l'acétyl-CoA :.....	4
La glycolyse :.....	4
Glycolyse anaérobie vs aérobie, le recyclage du NADH :.....	5
b) Formation des coenzymes réduits.....	6
La β -oxydation :.....	6
Le cycle de Krebs, principale voie de formation des composés réduits.....	7
I.3.2. La chaîne respiratoire.....	8
a) La chaîne respiratoire : composition.....	8
NADH Ubiquinone OxydoReductase ou Complexe I.....	8
Succinate Ubiquinone Oxydoreductase ou complexe II.....	8
Ubiquinol cytochrome C reductase ou complexe III.....	9
Cytochrome c oxydase ou complexe IV.....	9
La F_0-F_1 ATP synthase ou complexe V.....	9
b) La phosphorylation oxydative.....	10
I.3.3. La production de ROS.....	10
I.3.4. La détoxification mitochondriale des ROS.....	11
a) MnSOD.....	11
b) Les glutathion peroxydases.....	12
II. REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.....	13
II.1. REGULATION DE L'EFFICACITE DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.....	13
II.1.1. La fuite de protons : les mécanismes extrinsèques.....	13
II.1.2. Les mécanismes intrinsèques.....	14
II.2. REGULATION ALLOSTERIQUE.....	14

II.2.1. Homéostasie calcique	14
II.2.2. La Régulation par le statut énergétique (rapport ATP/AMP).....	15
II.2.3. La Régulation par le rapport NAD ⁺ /NADH	16
II.3. LA REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE	17
II.3.1. Mécanisme de phosphorylation	17
II.3.2. Mécanisme d'acétylation	18
II.4. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE : LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE	19
III. ALTERATIONS DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	20
III.1. LE VIEILLISSEMENT	20
III.1.1. Aspect historique	20
III.1.2. Altération de la fonction mitochondriale au cours du vieillissement.....	21
III.2. LES MALADIES MITOCHONDRIALES.....	22
III.2.1. La neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)	22
a) Aspect clinique.....	23
b) Aspect génétique	23
c) Aspect biochimique.....	24
III.2.2. Le syndrome de Leigh	24
a) Aspect clinique.....	25
b) Aspect génétique	25
c) Aspect biochimique.....	26
IV. LE COMPLEXE I, CIBLE ET MOTEUR DE REGULATION	26
IV.1. ASSEMBLAGE DU COMPLEXE I	26
IV.2. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DU COMPLEXE I	28
IV.2.1. L'activité NADH déshydrogénase du complexe I.....	28
IV.2.2. La réduction de la quinone par le complexe I	29
a) Le transfert des électrons de la FMN à la quinone.....	29
b) La réduction de la quinone	29
IV.2.3. Le transfert de protons.....	30
IV.3. LA PRODUCTION DE ROS	31
IV.4. COMPLEXE I REGULATEUR DU METABOLISME MITOCHONDRIAL.....	34
IV.4.1. Régulation via la production de ROS	34
IV.4.2. Régulation via le NADH/NAD ⁺	36
V. LES SIRTUINES	36
V.1. GENERALITES (STRUCTURE, FONCTION)	36
V.1.1. Structure	37
V.2. LES DIFFERENTES ISOFORMES.....	38
V.2.1. Les isoformes nucléaires.....	38

V.2.2. L'isoforme cytoplasmique	38
V.2.3. Les isoformes mitochondriales	38
V.3. LES CIBLES DES SIRTUINES	40
V.3.1. Les cibles de SIRT1	40
V.3.2. Les cibles de SIRT3	40
a) SIRT3 apparaît comme un régulateur du métabolisme énergétique	40
b) SIRT3 est un régulateur de la production de ROS.....	41
V.4. REGULATIONS DES SIRTUINES	41
V.5. LES SIRTUINES SENSEURS DU METABOLISME	43
VI. MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE L'ACTIVITE DES SIRTUINES : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ?.....	43
VI.1. LE RESVERATROL	43
VI.1.1. Structure.....	43
VI.1.2. Absorption et métabolisme	45
VI.1.3. Le Resveratrol : un modulateur majeur du métabolisme mitochondrial	45
VI.2. MODULATION DU RAPPORT NADH/NAD ⁺	46
VI.2.1. Métabolisme du NAD ⁺	47
VI.2.2. La diminution du rapport NADH/NAD ⁺	48
a) Stimuler l'activité des enzymes de la voie de synthèse du NAD ⁺	49
b) Augmenter la concentration des précurseurs du NAD ⁺	49
c) Inhiber les enzymes fortement consommatrices en NAD ⁺	50
<u>PROBLEMATIQUE DE LA THESE</u>	<u>51</u>
<u>RESULTATS</u>	<u>55</u>
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>151</u>
I. LE RAPPORT NADH/NAD⁺ REGULE LE METABOLISME MITOCHONDRIAL	152
I.1. LA REGULATION DU METABOLISME GRACE A L'ACTIVATION DE SIRT3	152
I.2. AUTRES VOIES IMPACTEES PAR UNE VARIATION DU RAPPORT NADH/NAD ⁺	153
II. LE COMPLEXE I EST UN REGULATEUR DU RAPPORT NADH/NAD⁺	155
III. L'ETAT D'OXYDO-REDUCTION DE LA FMN DU COMPLEXE I JOUE UN ROLE CLE DANS LA PRODUCTION DE ROS	157
IV. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LES DEFICITS DU COMPLEXE I.....	159
IV.1. RSV, UNE MOLECULE CANDIDATE UTILISEE COMME THERAPEUTIQUE ?.....	159
IV.1.1. Modulation du rapport NADH/NAD ⁺	159
IV.1.2. Le RSV peut être une molécule pro-oxydante / Principe de mitohormesis	160
IV.2. UTILISATION DU NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE (NMN).....	162
IV.3. VOIES DE SYNTHESE ET DEGRADATION DU NAD ⁺	163

IV.4. ROLE DES TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS	164
IV.5. RESTAURER L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE I	164

FICHES TECHNIQUES..... 166

Fiche 1 : Culture de cellules fibroblastiques et d'hépatocarcinome humain.....	167
Réactifs :	167
Technique :	167
Fiche 2 : Modèle animal	169
Réactifs :	169
Technique :	169
Fiche 3 : Isolement des mitochondries.....	170
Réactifs :	170
Principe :	170
Technique :	170
Fiche 4 : Dosage de protéines par mesure Spectrophotométrique.....	172
Réactifs :	172
Principe :	172
Technique :	172
Fiche 5 : Mesure oxygraphique des respirations des complexes de la chaîne respiratoire.....	173
Réactifs :	173
Principe :	174
Instrument :	174
Technique :	176
Fiche 6 : Mesure de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (Complexe I) sur cellules.....	178
Réactifs :	178
Principe :	178
Instrument :	179
Technique :	179
Fiche 7 : Dosage de l'activité NADH déshydrogénase sur complexes solubilisés.....	181
Réactifs :	181
Principe :	181
Instrument :	181
Technique :	181
Fiche 8 : Mesure de l'activité Succinate Ubiquinone Reductase (complexe II) sur fibroblastes.....	183
Réactifs :	183
Principe :	183
Instrument :	183
Technique :	183

Fiche 9 : Dosage de l'activité de la Succinate Deshydrogénase.	185
Réactifs :	185
Principe :	185
Instrument :	185
Technique :	185
Fiche 10 : Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome C Réductase (Complexe III) sur mitochondries isolées et fibroblastes.	187
Réactifs :	187
Principe :	187
Instrument :	187
Technique :	187
Fiche 11: Dosage de l'activité Ubiquinone cytochrome C Oxydase (Complexe IV) sur fibroblastes et mitochondries.	190
Réactifs :	190
Principe :	190
Instrument :	190
Technique :	190
Fiche 13: Dosage de l'activité de la citrate synthase.	192
Réactifs :	192
Principe :	192
Instrument :	192
Technique :	192
Fiche 14: Dosage de l'ADP, ATP, AMP par HPLC.	194
Réactifs :	194
Principe :	194
Instrument :	194
Technique :	194
Fiche 15 : Dosage NADH/NAD ⁺ cellulaire.	195
Réactifs :	195
Principe :	195
Instrument :	195
Technique :	195
Fiche 16 : Dosage NADH/NAD ⁺ cytoplasmique.	197
Réactifs :	197
Principe :	197
Instrument :	197
Technique :	197
Réactifs :	198

Principe :	198
Instrument :	198
Technique :	198
Fiche 17 : Dosage de la quantité de glucose.....	200
Réactifs :	200
Principe :	200
Instrument :	200
Technique :	200
Fiche 18 : Dosage de l'O ₂ ⁻ et de l'H ₂ O ₂ produit par le complexe I.	201
Réactifs :	201
Principe :	201
Instrument :	201
Technique :	201
Fiche 18: Extraction de l'ARN.	203
Réactifs :	203
Principe :	203
Instrument :	203
Technique :	203
Fiche 19: PCR (RT-PCR).....	204
Réactifs :	204
Principe :	204
Instrument :	204
Technique :	204
Fiche 20: qPCR sirtuines.	205
Réactifs :	205
Principe :	205
Technique :	205
Réactifs :	205
Principe :	206
Instrument :	207
Technique :	207
Fiche 22: Le Blue Native Page.	210
Réactifs :	210
Principe :	211
Instrument :	211
Technique :	211
Fiche 23: L'immunoprécipitation des protéines acétylées.....	213

Réactifs :	213
Principe :	214
Technique :	214
Fiche 24: Extinction protéique	216
Réactifs :	216
Principe :	216
Technique :	216
Réactifs :	217
<u>LISTE DES TRAVAUX.....</u>	218
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	221
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	230

Bibliographie

Abdel-Halim, M. N. and S. I. Farah (1985). "Short-term regulation of acetyl CoA carboxylase: is the key enzyme in long-chain fatty acid synthesis regulated by an existing physiological mechanism?" Comp Biochem Physiol B **81**(1): 9-19.

Ahmad, K. A., M. V. Clement and S. Pervaiz (2003). "Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1010**: 365-373.

Ahn, B. H., H. S. Kim, S. Song, I. H. Lee, J. Liu, A. Vassilopoulos, C. X. Deng and T. Finkel (2008). "A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14447-14452.

Aires, V., D. Delmas, C. Le Bachelier, N. Latruffe, D. Schlemmer, J. F. Benoist, F. Djouadi and J. Bastin (2014). "Stilbenes and resveratrol metabolites improve mitochondrial fatty acid oxidation defects in human fibroblasts." Orphanet J Rare Dis **9**: 79.

Alano, C. C., A. Tran, R. Tao, W. Ying, J. S. Karliner and R. A. Swanson (2007). "Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes." J Neurosci Res **85**(15): 3378-3385.

Alhazzazi, T. Y., P. Kamarajan, N. Joo, J. Y. Huang, E. Verdin, N. J. D'Silva and Y. L. Kapila (2011). "Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer." Cancer **117**(8): 1670-1678.

Ali, I. and D. P. Braun (2014). "Resveratrol Enhances Mitomycin C-mediated Suppression of Human Colorectal Cancer Cell Proliferation by Up-regulation of p21WAF1/CIP1." Anticancer Res **34**(10): 5439-5446.

Altschul, R., A. Hoffer and J. D. Stephen (1955). "Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man." Arch Biochem Biophys **54**(2): 558-559.

Amiot, M. J., B. Romier, T. M. Dao, R. Fanciullino, J. Ciccolini, R. Burcelin, L. Pechere, C. Emond, J. F. Savouret and E. Seree (2013). "Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy." Biochimie **95**(6): 1233-1238.

Anderson, K. A. and M. D. Hirschey (2012). "Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism." Essays Biochem **52**: 23-35.

Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden and I. G. Young (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature **290**(5806): 457-465.

Angebault, C., N. Gueguen, V. Desquirit-Dumas, A. Chevrollier, V. Guillet, C. Verny, J. Cassereau, M. Ferre, D. Milea, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, V. Procaccio, P. Reynier and D. Loiseau (2011). "Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHON patients while producing contradictory effects on respiration." BMC Res Notes **4**: 557.

Aoyama, K., M. Watabe and T. Nakaki (2008). "Regulation of neuronal glutathione synthesis." J Pharmacol Sci **108**(3): 227-238.

Armeni, T., G. Principato, J. L. Quiles, C. Pieri, S. Bompadre and M. Battino (2003). "Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction--two different ways of modulating stress." J Bioenerg Biomembr **35**(2): 181-191.

Arnaudo, E., M. Hirano, R. S. Seelan, A. Milatovich, C. L. Hsieh, G. M. Fabrizi, L. I. Grossman, U. Francke and E. A. Schon (1992). "Tissue-specific expression and chromosome assignment of genes specifying two isoforms of subunit VIIa of human cytochrome c oxidase." Gene **119**(2): 299-305.

Assouline, Z., M. Jambou, M. Rio, C. Bole-Feysot, P. de Lonlay, C. Barnerias, I. Desguerre, C. Bonnemains, C. Guillermet, J. Steffann, A. Munnich, J. P. Bonnefont, A. Rotig and A. S. Lebre (2012). "A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUFS4 mutations in patients with Leigh syndrome." Biochim Biophys Acta **1822**(6): 1062-1069.

Austin, S. and J. St-Pierre (2012). "PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders." J Cell Sci **125**(Pt 21): 4963-4971.

Avalos, J. L., K. M. Bever and C. Wolberger (2005). "Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme." Mol Cell **17**(6): 855-868.

Azmi, A. S., S. H. Bhat and S. M. Hadi (2005). "Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties." *FEBS Lett* **579**(14): 3131-3135.

Ba, X. and N. J. Garg (2011). "Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases." *Am J Pathol* **178**(3): 946-955.

Bahadorani, S., J. Cho, T. Lo, H. Contreras, H. O. Lawal, D. E. Krantz, T. J. Bradley and D. W. Walker (2010). "Neuronal expression of a single-subunit yeast NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) extends *Drosophila* lifespan." *Aging Cell* **9**(2): 191-202.

Bai, P., C. Canto, H. Oudart, A. Brunyanszki, Y. Cen, C. Thomas, H. Yamamoto, A. Huber, B. Kiss, R. H. Houtkooper, K. Schoonjans, V. Schreiber, A. A. Sauve, J. Menissier-de Murcia and J. Auwerx (2011). "PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation." *Cell Metab* **13**(4): 461-468.

Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* **120**(4): 483-495.

Barazzoni, R., K. R. Short and K. S. Nair (2000). "Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart." *J Biol Chem* **275**(5): 3343-3347.

Barber, M. F., E. Michishita-Kioi, Y. Xi, L. Tasselli, M. Kioi, Z. Moqtaderi, R. I. Tennen, S. Paredes, N. L. Young, K. Chen, K. Struhl, B. A. Garcia, O. Gozani, W. Li and K. F. Chua (2012). "SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation." *Nature* **487**(7405): 114-118.

Barnils, N., E. Mesa, S. Munoz, A. Ferrer-Artola and J. Arruga (2007). "[Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy]." *Arch Soc Esp Oftalmol* **82**(6): 377-380.

Baron, S., T. Bedarida, C. H. Cottart, F. Vibert, E. Vessieres, A. Ayer, D. Henrion, B. Hommeril, J. L. Paul, G. Renault, B. Saubamea, J. L. Beaudeau, V. Procaccio and V. Nivet-Antoine (2014). "Dual effects of resveratrol on arterial damage induced by insulin resistance in aged mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**(3): 260-269.

Batenburg, J. J. and M. S. Olson (1976). "Regulation of pyruvate dehydrogenase by fatty acid in isolated rat liver mitochondria." *J Biol Chem* **251**(5): 1364-1370.

Baur, J. A., K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P. J. Pistell, S. Poosala, K. G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, E. G. Lakatta, D. Le Couteur, R. J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D. K. Ingram, R. de Cabo and D. A. Sinclair (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* **444**(7117): 337-342.

Baur, J. A. and D. A. Sinclair (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." *Nat Rev Drug Discov* **5**(6): 493-506.

Behr, D., J. Wu, S. Cumine, K. W. Kim, S. C. Lu, L. Atangan and M. Wang (2009). "Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity." *Chem Biol Drug Des* **74**(6): 619-624.

Bell, E. L., T. A. Klimova, J. Eisenbart, C. T. Moraes, M. P. Murphy, G. R. Budinger and N. S. Chandel (2007). "The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production." *J Cell Biol* **177**(6): 1029-1036.

Bender, E. and B. Kadenbach (2000). "The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation." *FEBS Lett* **466**(1): 130-134.

Benit, P., A. Slama and P. Rustin (2008). "Decylubiquinol impedes mitochondrial respiratory chain complex I activity." *Mol Cell Biochem* **314**(1-2): 45-50.

Berger, F., C. Lau, M. Dahlmann and M. Ziegler (2005). "Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms." *J Biol Chem* **280**(43): 36334-36341.

Berrisford, J. M. and L. A. Sazanov (2009). "Structural basis for the mechanism of respiratory complex I." *J Biol Chem* **284**(43): 29773-29783.

Biala, A., E. Tauriainen, A. Siltanen, J. Shi, S. Merasto, M. Louhelainen, E. Martonen, P. Finckenberg, D. N. Muller and E. Mervaala (2010). "Resveratrol induces mitochondrial biogenesis and ameliorates Ang II-induced cardiac remodeling in transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes." *Blood Press* **19**(3): 196-205.

- Birrell, J. A. and J. Hirst (2013). "Investigation of NADH binding, hydride transfer, and NAD(+) dissociation during NADH oxidation by mitochondrial complex I using modified nicotinamide nucleotides." *Biochemistry* **52**(23): 4048-4055.
- Birrell, J. A., M. S. King and J. Hirst (2011). "A ternary mechanism for NADH oxidation by positively charged electron acceptors, catalyzed at the flavin site in respiratory complex I." *FEBS Lett* **585**(14): 2318-2322.
- Bleier, L. and S. Drose (2013). "Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences." *Biochim Biophys Acta* **1827**(11-12): 1320-1331.
- Bobyleva, V., M. Bellei, T. L. Paziienza and U. Muscatello (1997). "Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria." *Biochem Mol Biol Int* **41**(3): 469-480.
- Boffoli, D., S. C. Scacco, R. Vergari, G. Solarino, G. Santacroce and S. Papa (1994). "Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle." *Biochim Biophys Acta* **1226**(1): 73-82.
- Borgstahl, G. E., H. E. Parge, M. J. Hickey, W. F. Beyer, Jr., R. A. Hallewell and J. A. Tainer (1992). "The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles." *Cell* **71**(1): 107-118.
- Borra, M. T., B. C. Smith and J. M. Denu (2005). "Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol." *J Biol Chem* **280**(17): 17187-17195.
- Bottcher, B., D. Scheide, M. Hesterberg, L. Nagel-Steger and T. Friedrich (2002). "A novel, enzymatically active conformation of the Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Biol Chem* **277**(20): 17970-17977.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* **134**(3): 707-716.
- Braidy, N., G. J. Guillemin, H. Mansour, T. Chan-Ling, A. Poljak and R. Grant (2011). "Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats." *PLoS One* **6**(4): e19194.
- Brand, M. D., C. Affourtit, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, J. L. Pakay and N. Parker (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." *Free Radic Biol Med* **37**(6): 755-767.
- Brand, M. D., J. A. Buckingham, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, M. P. Murphy, J. L. Pakay, D. A. Talbot and K. S. Echtay (2004). "Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production." *Biochem Soc Symp*(71): 203-213.
- Brand, M. D., J. L. Pakay, A. Ocloo, J. Kokoszka, D. C. Wallace, P. S. Brookes and E. J. Cornwall (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content." *Biochem J* **392**(Pt 2): 353-362.
- Brandt, U. (2006). "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)." *Annu Rev Biochem* **75**: 69-92.
- Bratic, A. and N. G. Larsson (2013). "The role of mitochondria in aging." *J Clin Invest* **123**(3): 951-957.
- Bratic, I. and A. Trifunovic (2010). "Mitochondrial energy metabolism and ageing." *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 961-967.
- Brown, M. D. (1999). "The enigmatic relationship between mitochondrial dysfunction and Leber's hereditary optic neuropathy." *J Neurol Sci* **165**(1): 1-5.
- Brown, M. D., I. A. Trounce, A. S. Jun, J. C. Allen and D. C. Wallace (2000). "Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation." *J Biol Chem* **275**(51): 39831-39836.
- Brunelle, J. K., E. L. Bell, N. M. Quesada, K. Vercauteren, V. Tiranti, M. Zeviani, R. C. Scarpulla and N. S. Chandel (2005). "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation." *Cell Metab* **1**(6): 409-414.
- Burbaev, D., I. A. Moroz, Y. A. Kamenskiy and A. Konstantinov Au (1991). "Several forms of chromaffin granule cytochrome b-561 revealed by EPR spectroscopy." *FEBS Lett* **283**(1): 97-99.
- Bykova, N. V., A. Stensballe, H. Egsgaard, O. N. Jensen and I. M. Moller (2003). "Phosphorylation of formate dehydrogenase in potato tuber mitochondria." *J Biol Chem* **278**(28): 26021-26030.
- Byles, V., L. K. Chmielewski, J. Wang, L. Zhu, L. W. Forman, D. V. Faller and Y. Dai (2010). "Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells." *Int J Biol Sci* **6**(6): 599-612.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* **84**(1): 277-359.

Canto, C. and J. Auwerx (2009). "PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure." *Curr Opin Lipidol* **20**(2): 98-105.

Canto, C. and J. Auwerx (2012). "Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)" *Pharmacol Rev* **64**(1): 166-187.

Canto, C., Z. Gerhart-Hines, J. N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J. C. Milne, P. J. Elliott, P. Puigserver and J. Auwerx (2009). "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity." *Nature* **458**(7241): 1056-1060.

Canto, C., R. H. Houtkooper, E. Pirinen, D. Y. Youn, M. H. Oosterveer, Y. Cen, P. J. Fernandez-Marcos, H. Yamamoto, P. A. Andreux, P. Cettour-Rose, K. Gademann, C. Rinsch, K. Schoonjans, A. A. Sauve and J. Auwerx (2012). "The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity." *Cell Metab* **15**(6): 838-847.

Canto, C., L. Q. Jiang, A. S. Deshmukh, C. Matakaki, A. Coste, M. Lagouge, J. R. Zierath and J. Auwerx (2010). "Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle." *Cell Metab* **11**(3): 213-219.

Capitanio, N., G. Capitanio, E. De Nitto, G. Villani and S. Papa (1991). "H+/e- stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome c oxidase vesicles." *FEBS Lett* **288**(1-2): 179-182.

Capitanio, N., G. Capitanio, D. A. Demarinis, E. De Nitto, S. Massari and S. Papa (1996). "Factors affecting the H+/e- stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH." *Biochemistry* **35**(33): 10800-10806.

Carelli, V., P. Barboni, A. Zacchini, R. Mancini, L. Monari, S. Cevoli, R. Liguori, M. Sensi, E. Lugaresi and P. Montagna (1998). "Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) with 14484/ND6 mutation in a North African patient." *J Neurol Sci* **160**(2): 183-188.

Carelli, V., A. Ghelli, L. Bucchi, P. Montagna, A. De Negri, V. Leuzzi, C. Carducci, G. Lenaz, E. Lugaresi and M. Degli Esposti (1999). "Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *Ann Neurol* **45**(3): 320-328.

Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros and A. A. Sadun (2004). "Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies." *Prog Retin Eye Res* **23**(1): 53-89.

Carroll, J., I. M. Fearnley, J. M. Skehel, R. J. Shannon, J. Hirst and J. E. Walker (2006). "Bovine complex I is a complex of 45 different subunits." *J Biol Chem* **281**(43): 32724-32727.

Castellano, I., F. Cecere, A. De Vendittis, R. Cotugno, A. Chambery, A. Di Maro, A. Michniewicz, G. Parlato, M. Masullo, E. V. Avvedimento, E. De Vendittis and M. R. Ruocco (2009). "Rat mitochondrial manganese superoxide dismutase: amino acid positions involved in covalent modifications, activity, and heat stability." *Biopolymers* **91**(12): 1215-1226.

Cerutti, R., E. Pirinen, C. Lamperti, S. Marchet, A. A. Sauve, W. Li, V. Leoni, E. A. Schon, F. Dantzer, J. Auwerx, C. Viscomi and M. Zeviani (2014). "NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease." *Cell Metab* **19**(6): 1042-1049.

Chen, I. C., W. F. Chiang, S. Y. Liu, P. F. Chen and H. C. Chiang (2013). "Role of SIRT3 in the regulation of redox balance during oral carcinogenesis." *Mol Cancer* **12**: 68.

Chen, R., I. M. Fearnley, S. Y. Peak-Chew and J. E. Walker (2004). "The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria." *J Biol Chem* **279**(25): 26036-26045.

Chevrollier, A., V. Guillet, D. Loiseau, N. Gueguen, M. A. de Crescenzo, C. Verny, M. Ferre, H. Dollfus, S. Odent, D. Milea, C. Goizet, P. Amati-Bonneau, V. Procaccio, D. Bonneau and P. Reynier (2008). "Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect." *Ann Neurol* **63**(6): 794-798.

Chinnery, P. F. and G. Hudson (2013). "Mitochondrial genetics." *Br Med Bull* **106**: 135-159.

Cino, M. and R. F. Del Maestro (1989). "Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia." *Arch Biochem Biophys* **269**(2): 623-638.

Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." *Cell* **28**(4): 693-705.

Cook, G. A., D. A. Otto and N. W. Cornell (1983). "Malonyl-CoA inhibition of carnitine palmitoyltransferase: interpretation of I50 and K1 values." *Biochem J* **212**(2): 525-527.

- Cooper, C. E., P. Nicholls and J. A. Freedman (1991). "Cytochrome c oxidase: structure, function, and membrane topology of the polypeptide subunits." *Biochem Cell Biol* **69**(9): 586-607.
- Cooper, H. M., J. Y. Huang, E. Verdin and J. N. Spelbrink (2009). "A new splice variant of the mouse SIRT3 gene encodes the mitochondrial precursor protein." *PLoS One* **4**(3): e4986.
- Cooper, J. M., V. M. Mann and A. H. Schapira (1992). "Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing." *J Neurol Sci* **113**(1): 91-98.
- Corduneanu, O., P. Janeiro and A. M. O. Brett (2006). "On the electrochemical oxidation of resveratrol." *Electroanalysis* **18**(8): 757-762.
- Csiszar, A., N. Labinskyy, J. T. Pinto, P. Ballabh, H. Zhang, G. Losonczy, K. Pearson, R. de Cabo, P. Pacher, C. Zhang and Z. Ungvari (2009). "Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(1): H13-20.
- Dasgupta, B. and J. Milbrandt (2007). "Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7217-7222.
- Daum, B., A. Walter, A. Horst, H. D. Osiewacz and W. Kuhlbrandt (2013). "Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(38): 15301-15306.
- Davies, K. M., C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gomez and W. Kuhlbrandt (2012). "Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(34): 13602-13607.
- De Haes, W., L. Froominckx, R. Van Assche, A. Smolders, G. Depuydt, J. Billen, B. P. Braeckman, L. Schoofs and L. Temmerman (2014). "Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(24): E2501-2509.
- de Kroon, A. I., D. Dolis, A. Mayer, R. Lill and B. de Kruijff (1997). "Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane?" *Biochim Biophys Acta* **1325**(1): 108-116.
- de la Lastra, C. A. and I. Villegas (2007). "Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1156-1160.
- De Marchi, U., J. Santo-Domingo, C. Castelbou, I. Sekler, A. Wiederkehr and N. Demarex (2014). "NCLX protein, but not LETM1, mediates mitochondrial Ca²⁺ extrusion, thereby limiting Ca²⁺-induced NAD(P)H production and modulating matrix redox state." *J Biol Chem* **289**(29): 20377-20385.
- de Moura, M. B., R. Uppala, Y. Zhang, B. Van Houten and E. S. Goetzman (2014). "Overexpression of mitochondrial sirtuins alters glycolysis and mitochondrial function in HEK293 cells." *PLoS One* **9**(8): e106028.
- de Santi, C., A. Pietrabissa, F. Mosca and G. M. Pacifici (2000). "Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver." *Xenobiotica* **30**(11): 1047-1054.
- De Santi, C., A. Pietrabissa, R. Spisni, F. Mosca and G. M. Pacifici (2000). "Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum." *Xenobiotica* **30**(6): 609-617.
- Delmas, D., V. Aires, E. Limagne, P. Dutartre, F. Mazue, F. Ghiringhelli and N. Latruffe (2011). "Transport, stability, and biological activity of resveratrol." *Ann N Y Acad Sci* **1215**: 48-59.
- Denton, R. M. (2009). "Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions." *Biochim Biophys Acta* **1787**(11): 1309-1316.
- Desquiret-Dumas, V., N. Gueguen, M. Barth, A. Chevrollier, S. Hancock, D. C. Wallace, P. Amati-Bonneau, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier and V. Procaccio (2012). "Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS." *Biochim Biophys Acta* **1822**(6): 1019-1029.
- Desquiret-Dumas, V., N. Gueguen, G. Leman, S. Baron, V. Nivet-Antoine, S. Chupin, A. Chevrollier, E. Vessieres, A. Ayer, M. Ferre, D. Bonneau, D. Henrion, P. Reynier and V. Procaccio (2013). "Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells." *J Biol Chem* **288**(51): 36662-36675.
- Devenish, R. J., M. Prescott and A. J. Rodgers (2008). "The structure and function of mitochondrial F1Fo-ATP synthases." *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 1-58.
- Di Lisa, F. and P. Bernardi (2005). "Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition." *Cardiovasc Res* **66**(2): 222-232.

- Di Lisa, F. and M. Ziegler (2001). "Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism." *FEBS Lett* **492**(1-2): 4-8.
- Distelmaier, F., W. J. Koopman, L. P. van den Heuvel, R. J. Rodenburg, E. Mayatepek, P. H. Willems and J. A. Smeitink (2009). "Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease." *Brain* **132**(Pt 4): 833-842.
- Distelmaier, F., H. J. Visch, J. A. Smeitink, E. Mayatepek, W. J. Koopman and P. H. Willems (2009). "The antioxidant Trolox restores mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ - stimulated ATP production in human complex I deficiency." *J Mol Med (Berl)* **87**(5): 515-522.
- Drose, S., S. Krack, L. Sokolova, K. Zwicker, H. D. Barth, N. Morgner, H. Heide, M. Steger, E. Nubel, V. Zickermann, S. Kerscher, B. Brutschy, M. Radermacher and U. Brandt (2011). "Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I." *PLoS Biol* **9**(8): e1001128.
- Du, J., Y. Zhou, X. Su, J. J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J. H. Kim, B. H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R. A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao and H. Lin (2011). "Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase." *Science* **334**(6057): 806-809.
- Dudek, J., P. Rehling and M. van der Laan (2013). "Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks." *Biochim Biophys Acta* **1833**(2): 274-285.
- Dutton, P. L., C. C. Moser, V. D. Sled, F. Daldal and T. Ohnishi (1998). "A reductant-induced oxidation mechanism for complex I." *Biochim Biophys Acta* **1364**(2): 245-257.
- Earley, F. G. and C. I. Ragan (1984). "Photoaffinity labelling of mitochondrial NADH dehydrogenase with arylazidoamorphigenin, an analogue of rotenone." *Biochem J* **224**(2): 525-534.
- Efremov, R. G., R. Baradaran and L. A. Sazanov (2010). "The architecture of respiratory complex I." *Nature* **465**(7297): 441-445.
- Eleff, S., N. G. Kennaway, N. R. Buist, V. M. Darley-Usmar, R. A. Capaldi, W. J. Bank and B. Chance (1984). "31P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(11): 3529-3533.
- Erickson, R. P. (1972). "Leber's optic atrophy, a possible example of maternal inheritance." *Am J Hum Genet* **24**(3): 348-349.
- Espin, J. C., C. Soler-Rivas and H. J. Wichers (2000). "Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical." *J Agric Food Chem* **48**(3): 648-656.
- Esterhazy, D., M. S. King, G. Yakovlev and J. Hirst (2008). "Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Escherichia coli and comparison to the enzyme from mitochondria." *Biochemistry* **47**(12): 3964-3971.
- Fassone, E. and S. Rahman (2012). "Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics." *J Med Genet* **49**(9): 578-590.
- Fato, R., C. Bergamini, M. Bortolus, A. L. Maniero, S. Leoni, T. Ohnishi and G. Lenaz (2009). "Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species." *Biochim Biophys Acta* **1787**(5): 384-392.
- Felici, R., A. Lapucci, M. Ramazzotti and A. Chiarugi (2013). "Insight into molecular and functional properties of NMNAT3 reveals new hints of NAD homeostasis within human mitochondria." *PLoS One* **8**(10): e76938.
- Fendt, S. M., E. L. Bell, M. A. Keibler, B. A. Olenchock, J. R. Mayers, T. M. Wasylenko, N. I. Vokes, L. Guarente, M. G. Vander Heiden and G. Stephanopoulos (2013). "Reductive glutamine metabolism is a function of the alpha-ketoglutarate to citrate ratio in cells." *Nat Commun* **4**: 2236.
- Fernandez-Marcos, P. J., E. H. Jenning, C. Canto, T. Harach, V. C. de Boer, P. Andreux, N. Moullan, E. Pirinen, H. Yamamoto, S. M. Houten, K. Schoonjans and J. Auwerx (2012). "Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis." *Sci Rep* **2**: 425.
- Finley, L. W., W. Haas, V. Desquirit-Dumas, D. C. Wallace, V. Procaccio, S. P. Gygi and M. C. Haigis (2011). "Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity." *PLoS One* **6**(8): e23295.
- Finsterer, J. (2008). "Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults." *Pediatr Neurol* **39**(4): 223-235.
- Floreani, M., E. Napoli, A. Martinuzzi, G. Pantano, V. De Riva, R. Trevisan, E. Bisetto, L. Valente, V. Carelli and F. Dabbeni-Sala (2005). "Antioxidant defences in cybrids harboring

mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *FEBS J* **272**(5): 1124-1135.

Forman, H. J. and A. Azzi (1997). "On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology." *FASEB J* **11**(5): 374-375.

Frank, V. and B. Kadenbach (1996). "Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios." *FEBS Lett* **382**(1-2): 121-124.

Fukuhara, K. and N. Miyata (1998). "Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent." *Bioorg Med Chem Lett* **8**(22): 3187-3192.

Fulco, M., Y. Cen, P. Zhao, E. P. Hoffman, M. W. McBurney, A. A. Sauve and V. Sartorelli (2008). "Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt." *Dev Cell* **14**(5): 661-673.

Gadacha, W., M. Ben-Attia, D. Bonnefont-Rousselot, E. Aouani, N. Ghanem-Boughanmi and Y. Touitou (2009). "Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night." *Redox Rep* **14**(4): 154-158.

Galati, G., O. Sabzevari, J. X. Wilson and P. J. O'Brien (2002). "Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics." *Toxicology* **177**(1): 91-104.

Galkin, A. and U. Brandt (2005). "Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*." *J Biol Chem* **280**(34): 30129-30135.

Garcia-Ruiz, I., P. Solis-Munoz, D. Fernandez-Moreira, T. Munoz-Yague and J. A. Solis-Herruzo (2013). "Pioglitazone leads to an inactivation and disassembly of complex I of the mitochondrial respiratory chain." *BMC Biol* **11**: 88.

Garrido, N., L. Griparic, E. Jokitalo, J. Wartiovaara, A. M. van der Blik and J. N. Spelbrink (2003). "Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids." *Mol Biol Cell* **14**(4): 1583-1596.

Gellerich, F. N., Z. Gizatullina, T. Gainutdinov, K. Muth, E. Seppet, Z. Orynbayeva and S. Vielhaber (2013). "The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal." *IUBMB Life* **65**(3): 180-190.

Gellerich, F. N., Z. Gizatullina, S. Trumbekaite, B. Korzeniewski, T. Gainutdinov, E. Seppet, S. Vielhaber, H. J. Heinze and F. Striggow (2012). "Cytosolic Ca²⁺ regulates the energization of isolated brain mitochondria by formation of pyruvate through the malate-aspartate shuttle." *Biochem J* **443**(3): 747-755.

Genova, M. L., B. Ventura, G. Giuliano, C. Bovina, G. Formiggini, G. Parenti Castelli and G. Lenaz (2001). "The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2." *FEBS Lett* **505**(3): 364-368.

Gertz, M., G. T. Nguyen, F. Fischer, B. Suenkel, C. Schlicker, B. Franzel, J. Tomaschewski, F. Aladini, C. Becker, D. Wolters and C. Steegborn (2012). "A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol." *PLoS One* **7**(11): e49761.

Ghanbari-Niaki, A., R. Bergeron, M. G. Latour and J. M. Lavoie (1999). "Effects of physical exercise on liver ATP levels in fasted and phosphate-injected rats." *Arch Physiol Biochem* **107**(5): 393-402.

Gille, A., E. T. Bodor, K. Ahmed and S. Offermanns (2008). "Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 79-106.

Giorgio, V., V. Petronilli, A. Ghelli, V. Carelli, M. Rugolo, G. Lenaz and P. Bernardi (2012). "The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics." *Biochim Biophys Acta* **1817**(2): 363-369.

Giralt, A. and F. Villarroya (2012). "SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging." *Biochem J* **444**(1): 1-10.

Giustarini, D., R. Rossi, A. Milzani, R. Colombo and I. Dalle-Donne (2004). "S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases." *J Cell Mol Med* **8**(2): 201-212.

Gohil, V. M. and M. L. Greenberg (2009). "Mitochondrial membrane biogenesis: phospholipids and proteins go hand in hand." *J Cell Biol* **184**(4): 469-472.

Gomes, A. P., N. L. Price, A. J. Ling, J. J. Moslehi, M. K. Montgomery, L. Rajman, J. P. White, J. S. Teodoro, C. D. Wrann, B. P. Hubbard, E. M. Mercken, C. M. Palmeira, R. de Cabo, A. P. Rolo, N. Turner, E. L. Bell and D. A. Sinclair (2013). "Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging." *Cell* **155**(7): 1624-1638.

Gong, B., Y. Pan, P. Vempati, W. Zhao, L. Knable, L. Ho, J. Wang, M. Sastre, K. Ono, A. A. Sauve and G. M. Pasinetti (2013). "Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models." *Neurobiol Aging* **34**(6): 1581-1588.

Grivennikova, V. G. and A. D. Vinogradov (2013). "Partitioning of superoxide and hydrogen peroxide production by mitochondrial respiratory complex I." *Biochim Biophys Acta* **1827**(3): 446-454.

Gu, X. S., Z. B. Wang, Z. Ye, J. P. Lei, L. Li, D. F. Su and X. Zheng (2014). "Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure." *Genet Mol Res* **13**(1): 323-335.

Guzy, R. D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K. D. Mansfield, M. C. Simon, U. Hammerling and P. T. Schumacker (2005). "Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing." *Cell Metab* **1**(6): 401-408.

Gyan, S., Y. Shiohira, I. Sato, M. Takeuchi and T. Sato (2006). "Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in Bacillus subtilis." *J Bacteriol* **188**(20): 7062-7071.

Ha, J., J. K. Lee, K. S. Kim, L. A. Witters and K. H. Kim (1996). "Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11466-11470.

Haigis, M. C., R. Mostoslavsky, K. M. Haigis, K. Fahie, D. C. Christodoulou, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, C. Wolberger, T. A. Prolla, R. Weindruch, F. W. Alt and L. Guarente (2006). "SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells." *Cell* **126**(5): 941-954.

Hallows, W. C., S. Lee and J. M. Denu (2006). "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10230-10235.

Han, Y. S., W. H. Zheng, S. Bastianetto, J. G. Chabot and R. Quirion (2004). "Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C." *Br J Pharmacol* **141**(6): 997-1005.

Hansford, R. G., B. A. Hogue and V. Mildaziene (1997). "Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age." *J Bioenerg Biomembr* **29**(1): 89-95.

Hara, N., K. Yamada, T. Shibata, H. Osago, T. Hashimoto and M. Tsuchiya (2007). "Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells." *J Biol Chem* **282**(34): 24574-24582.

Harford, S. and P. D. Weitzman (1975). "Evidence of isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies." *Biochem J* **151**(2): 455-458.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.

Hassan-Khabbar, S., C. H. Cottart, D. Wendum, F. Vibert, J. P. Clot, J. F. Savouret, M. Conti and V. Nivet-Antoine (2008). "Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery." *Liver Transpl* **14**(4): 451-459.

Hathaway, R. R. (1965). "Conversion of estradiol-17-beta by sperm preparations of sea urchins and oysters." *Gen Comp Endocrinol* **5**(5): 504-508.

Hawse, W. F. and C. Wolberger (2009). "Structure-based mechanism of ADP-ribosylation by sirtuins." *J Biol Chem* **284**(48): 33654-33661.

He, W., J. C. Newman, M. Z. Wang, L. Ho and E. Verdin (2012). "Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 467-476.

He, X., A. Zhou, H. Lu, Y. Chen, G. Huang, X. Yue, P. Zhao and Y. Wu (2013). "Suppression of mitochondrial complex I influences cell metastatic properties." *PLoS One* **8**(4): e61677.

Hebert, A. S., K. E. Dittenhafer-Reed, W. Yu, D. J. Bailey, E. S. Selen, M. D. Boersma, J. J. Carson, M. Tonelli, A. J. Balloon, A. J. Higbee, M. S. Westphall, D. J. Pagliarini, T. A. Prolla, F. Assadi-Porter, S. Roy, J. M. Denu and J. J. Coon (2013). "Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome." *Mol Cell* **49**(1): 186-199.

Herrmann, J. M. and J. Riemer (2010). "The intermembrane space of mitochondria." *Antioxid Redox Signal* **13**(9): 1341-1358.

Higashida, K., S. H. Kim, S. R. Jung, M. Asaka, J. O. Holloszy and D. H. Han (2013). "Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1alpha activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation." *PLoS Biol* **11**(7): e1001603.

- Hirano, Y., R. Kondo and K. Sakai (2002). "5 alpha-reductase inhibitory compounds produced by polymerization of resveratrol with horseradish peroxidase." *Journal of Wood Science* **48**(1): 64-68.
- Hirschey, M. D., T. Shimazu, E. Goetzman, E. Jing, B. Schwer, D. B. Lombard, C. A. Grueter, C. Harris, S. Biddinger, O. R. Ilkayeva, R. D. Stevens, Y. Li, A. K. Saha, N. B. Ruderman, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., F. W. Alt, C. R. Kahn and E. Verdin (2010). "SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation." *Nature* **464**(7285): 121-125.
- Hirst, J. (2013). "Mitochondrial complex I." *Annu Rev Biochem* **82**: 551-575.
- Hirst, J., M. S. King and K. R. Pryde (2008). "The production of reactive oxygen species by complex I." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 5): 976-980.
- Ho, L., A. S. Titus, K. K. Banerjee, S. George, W. Lin, S. Deota, A. K. Saha, K. Nakamura, P. Gut, E. Verdin and U. Kolthur-Seetharam (2013). "SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK." *Aging (Albany NY)* **5**(11): 835-849.
- Holley, A. K., V. Bakthavatchalu, J. M. Velez-Roman and D. K. St Clair (2011). "Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse." *Int J Mol Sci* **12**(10): 7114-7162.
- Hong, J., B. W. Kim, H. J. Choo, J. J. Park, J. S. Yi, D. M. Yu, H. Lee, G. S. Yoon, J. S. Lee and Y. G. Ko (2014). "Mitochondrial complex I deficiency enhances skeletal myogenesis but impairs insulin signaling through SIRT1 inactivation." *J Biol Chem* **289**(29): 20012-20025.
- Hopper, R. K., S. Carroll, A. M. Aponte, D. T. Johnson, S. French, R. F. Shen, F. A. Witzmann, R. A. Harris and R. S. Balaban (2006). "Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium." *Biochemistry* **45**(8): 2524-2536.
- Hou, X., S. Xu, K. A. Maitland-Toolan, K. Sato, B. Jiang, Y. Ido, F. Lan, K. Walsh, M. Wierzbicki, T. J. Verbeuren, R. A. Cohen and M. Zang (2008). "SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **283**(29): 20015-20026.
- Houtkooper, R. H. and J. Auwerx (2012). "Exploring the therapeutic space around NAD+." *J Cell Biol* **199**(2): 205-209.
- Houtkooper, R. H., C. Canto, R. J. Wanders and J. Auwerx (2010). "The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways." *Endocr Rev* **31**(2): 194-223.
- Howitz, K. T., K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L. L. Zhang, B. Scherer and D. A. Sinclair (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." *Nature* **425**(6954): 191-196.
- Hu, Y., J. Liu, J. Wang and Q. Liu (2011). "The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol." *Free Radic Biol Med* **51**(2): 250-256.
- Huang, B., R. Gudi, P. Wu, R. A. Harris, J. Hamilton and K. M. Popov (1998). "Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation." *J Biol Chem* **273**(28): 17680-17688.
- Hubbard, M. J. and N. J. McHugh (1996). "Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit is a calcium-binding protein." *FEBS Lett* **391**(3): 323-329.
- Hudson, G., V. Carelli, L. Spruijt, M. Gerards, C. Mowbray, A. Achilli, A. Pyle, J. Elson, N. Howell, C. La Morgia, M. L. Valentino, K. Huoponen, M. L. Savontaus, E. Nikoskelainen, A. A. Sadun, S. R. Salomao, R. Belfort, Jr., P. Griffiths, P. Y. Man, R. F. de Coo, R. Horvath, M. Zeviani, H. J. Smeets, A. Torroni and P. F. Chinnery (2007). "Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background." *Am J Hum Genet* **81**(2): 228-233.
- Hulbert, A. J., P. L. Else, S. C. Manolis and M. D. Brand (2002). "Proton leak in hepatocytes and liver mitochondria from archosaurs (crocodiles) and allometric relationships for ectotherms." *J Comp Physiol B* **172**(5): 387-397.
- Hunte, C., V. Zickermann and U. Brandt (2010). "Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I." *Science* **329**(5990): 448-451.
- Hur, J. H., D. A. Stork and D. W. Walker (2014). "Complex-I-ty in aging." *J Bioenerg Biomembr* **46**(4): 329-335.
- Huther, F. J. and B. Kadenbach (1987). "ADP increases the affinity for cytochrome c by interaction with the matrix side of bovine heart cytochrome c oxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **147**(3): 1268-1275.
- Huther, F. J. and B. Kadenbach (1988). "Intraliposomal nucleotides change the kinetics of reconstituted cytochrome c oxidase from bovine heart but not from *Paracoccus denitrificans*." *Biochem Biophys Res Commun* **153**(2): 525-534.

Huttemann, M., I. Lee, L. I. Grossman, J. W. Doan and T. H. Sanderson (2012). "Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease." *Adv Exp Med Biol* **748**: 237-264.

Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaerberlein and L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* **403**(6771): 795-800.

Ingledew, W. J. and T. Ohnishi (1980). "An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria." *Biochem J* **186**(1): 111-117.

Ingles, M., J. Gambini, M. G. Miguel, V. Bonet-Costa, K. M. Abdelaziz, M. El Alami, J. Vina and C. Borrás (2014). "PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations." *Biomed Res Int* **2014**: 580852.

Iuso, A., S. Scacco, C. Piccoli, F. Bellomo, V. Petruzzella, R. Trentadue, M. Minuto, M. Ripoli, N. Capitano, M. Zeviani and S. Papa (2006). "Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I." *J Biol Chem* **281**(15): 10374-10380.

Jacobson, M. K., D. Cervantes-Laurean, M. S. Strohm, D. L. Coyle, P. M. Bummer and E. L. Jacobson (1995). "NAD glycohydrolases and the metabolism of cyclic ADP-ribose." *Biochimie* **77**(5): 341-344.

James, A. M., Y. H. Wei, C. Y. Pang and M. P. Murphy (1996). "Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations." *Biochem J* **318** (Pt 2): 401-407.

Jeong, S. M., C. Xiao, L. W. Finley, T. Lahusen, A. L. Souza, K. Pierce, Y. H. Li, X. Wang, G. Laurent, N. J. German, X. Xu, C. Li, R. H. Wang, J. Lee, A. Csibi, R. Cerione, J. Blenis, C. B. Clish, A. Kimmelman, C. X. Deng and M. C. Haigis (2013). "SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism." *Cancer Cell* **23**(4): 450-463.

Jiang, H., S. Khan, Y. Wang, G. Charron, B. He, C. Sebastian, J. Du, R. Kim, E. Ge, R. Mostoslavsky, H. C. Hang, Q. Hao and H. Lin (2013). "SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine." *Nature* **496**(7443): 110-113.

Jiang, S., W. Wang, J. Miner and M. Fromm (2012). "Cross regulation of sirtuin 1, AMPK, and PPARgamma in conjugated linoleic acid treated adipocytes." *PLoS One* **7**(11): e48874.

Jin, L., H. Galonek, K. Israelian, W. Choy, M. Morrison, Y. Xia, X. Wang, Y. Xu, Y. Yang, J. J. Smith, E. Hoffmann, D. P. Carney, R. B. Perni, M. R. Jirousek, J. E. Bemis, J. C. Milne, D. A. Sinclair and C. H. Westphal (2009). "Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3." *Protein Sci* **18**(3): 514-525.

Jing, E., B. Emanuelli, M. D. Hirschey, J. Boucher, K. Y. Lee, D. Lombard, E. M. Verdin and C. R. Kahn (2011). "Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(35): 14608-14613.

Jing, E., B. T. O'Neill, M. J. Rardin, A. Kleinriders, O. R. Ilkeyeva, S. Ussar, J. R. Bain, K. Y. Lee, E. M. Verdin, C. B. Newgard, B. W. Gibson and C. R. Kahn (2013). "Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation." *Diabetes* **62**(10): 3404-3417.

Johnson, J. E., Jr., K. Choksi and W. R. Widger (2003). "NADH-Ubiquinone oxidoreductase: substrate-dependent oxygen turnover to superoxide anion as a function of flavin mononucleotide." *Mitochondrion* **3**(2): 97-110.

Jonckheere, A. I., J. A. Smeitink and R. J. Rodenburg (2012). "Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology." *J Inherit Metab Dis* **35**(2): 211-225.

Jornayvaz, F. R. and G. I. Shulman (2010). "Regulation of mitochondrial biogenesis." *Essays Biochem* **47**: 69-84.

Joseph, A. M., H. Pilegaard, A. Litvintsev, L. Leick and D. A. Hood (2006). "Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise." *Essays Biochem* **42**: 13-29.

Kadenbach, B. (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1604**(2): 77-94.

Kaerberlein, M., T. McDonagh, B. Heltweg, J. Hixon, E. A. Westman, S. D. Caldwell, A. Napper, R. Curtis, P. S. DiStefano, S. Fields, A. Bedalov and B. K. Kennedy (2005). "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol." *J Biol Chem* **280**(17): 17038-17045.

Kaindl, U., I. Eyberg, N. Rohr-Udilova, C. Heinzle and B. Marian (2008). "The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage." *Food Chem Toxicol* **46**(4): 1320-1326.

Kanfi, Y., S. Naiman, G. Amir, V. Peshti, G. Zinman, L. Nahum, Z. Bar-Joseph and H. Y. Cohen (2012). "The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice." *Nature* **483**(7388): 218-221.

Kao, M. C., A. Matsuno-Yagi and T. Yagi (2004). "Subunit proximity in the H⁺-translocating NADH-quinone oxidoreductase probed by zero-length cross-linking." *Biochemistry* **43**(12): 3750-3755.

Karamanlidis, G., C. F. Lee, L. Garcia-Menendez, S. C. Kolwicz, Jr., W. Suthammarak, G. Gong, M. M. Sedensky, P. G. Morgan, W. Wang and R. Tian (2013). "Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure." *Cell Metab* **18**(2): 239-250.

Karpe, F. and K. N. Frayn (2004). "The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug." *Lancet* **363**(9424): 1892-1894.

Kashani-Poor, N., K. Zwicker, S. Kerscher and U. Brandt (2001). "A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I." *J Biol Chem* **276**(26): 24082-24087.

Keeney, P. M., J. Xie, R. A. Capaldi and J. P. Bennett, Jr. (2006). "Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled." *J Neurosci* **26**(19): 5256-5264.

Kendrick, A. A., M. Choudhury, S. M. Rahman, C. E. McCurdy, M. Friederich, J. L. Van Hove, P. A. Watson, N. Birdsey, J. Bao, D. Gius, M. N. Sack, E. Jing, C. R. Kahn, J. E. Friedman and K. R. Jonscher (2011). "Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation." *Biochem J* **433**(3): 505-514.

Kerbey, A. L., P. J. Randle, R. H. Cooper, S. Whitehouse, H. T. Pask and R. M. Denton (1976). "Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide." *Biochem J* **154**(2): 327-348.

Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1486**(1): 1-17.

Kerner, J., P. J. Turkaly, P. E. Minkler and C. L. Hoppel (2001). "Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(5): E1054-1062.

Kerscher, S., N. Kashani-Poor, K. Zwicker, V. Zickermann and U. Brandt (2001). "Exploring the catalytic core of complex I by *Yarrowia lipolytica* yeast genetics." *J Bioenerg Biomembr* **33**(3): 187-196.

Khan, N. A., M. Auranen, I. Paetau, E. Pirinen, L. Euro, S. Forsstrom, L. Pasila, V. Velagapudi, C. J. Carroll, J. Auwerx and A. Suomalainen (2014). "Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3." *EMBO Mol Med* **6**(6): 721-731.

Khrapko, K. and J. Vijg (2009). "Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details?" *Trends Genet* **25**(2): 91-98.

Kim, H. J., G. S. Oh, A. Shen, S. B. Lee, S. K. Choe, K. B. Kwon, S. Lee, K. S. Seo, T. H. Kwak, R. Park and H. S. So (2014). "Augmentation of NAD(+) by NQO1 attenuates cisplatin-mediated hearing impairment." *Cell Death Dis* **5**: e1292.

Kim, S. C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, N. V. Grishin, M. White, X. J. Yang and Y. Zhao (2006). "Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey." *Mol Cell* **23**(4): 607-618.

King, M. S., M. S. Sharpley and J. Hirst (2009). "Reduction of hydrophilic ubiquinones by the flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and production of reactive oxygen species." *Biochemistry* **48**(9): 2053-2062.

Kirby, D. M., D. R. Thorburn, D. M. Turnbull and R. W. Taylor (2007). "Biochemical assays of respiratory chain complex activity." *Methods Cell Biol* **80**: 93-119.

Kirches, E. (2011). "LHON: Mitochondrial Mutations and More." *Curr Genomics* **12**(1): 44-54.

Kirkinezos, I. G. and C. T. Moraes (2001). "Reactive oxygen species and mitochondrial diseases." *Semin Cell Dev Biol* **12**(6): 449-457.

Kitson, T. M., K. E. Kitson and S. A. Moore (2001). "Interaction of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase with quercetin, resveratrol and diethylstilbestrol." *Chem Biol Interact* **130-132**(1-3): 57-69.

Knuuti, J., G. Belevich, V. Sharma, D. A. Bloch and M. Verkhovskaya (2013). "A single amino acid residue controls ROS production in the respiratory Complex I from *Escherichia coli*." Mol Microbiol **90**(6): 1190-1200.

Kong, X., R. Wang, Y. Xue, X. Liu, H. Zhang, Y. Chen, F. Fang and Y. Chang (2010). "Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis." PLoS One **5**(7): e11707.

Kong, Y., S. E. Trabucco and H. Zhang (2014). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging." Interdiscip Top Gerontol **39**: 86-107.

Koopman, W. J., S. Verkaart, S. E. van Emst-de Vries, S. Grefte, J. A. Smeitink, L. G. Nijtmans and P. H. Willems (2008). "Mitigation of NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency by chronic Trolox treatment." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 853-859.

Koopman, W. J., S. Verkaart, H. J. Visch, F. H. van der Westhuizen, M. P. Murphy, L. W. van den Heuvel, J. A. Smeitink and P. H. Willems (2005). "Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth." Am J Physiol Cell Physiol **288**(6): C1440-1450.

Korshunov, S. S., V. P. Skulachev and A. A. Starkov (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett **416**(1): 15-18.

Krahenbuhl, S., C. Talos, U. Wiesmann and C. L. Hoppel (1994). "Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans." Clin Chim Acta **230**(2): 177-187.

Kruse, S. E., W. C. Watt, D. J. Marcinek, R. P. Kapur, K. A. Schenkman and R. D. Palmiter (2008). "Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy." Cell Metab **7**(4): 312-320.

Kudin, A. P., N. Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C. E. Elger and W. S. Kunz (2004). "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria." J Biol Chem **279**(6): 4127-4135.

Kudin, A. P., D. Malinska and W. S. Kunz (2008). "Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 689-695.

Kukat, C., C. A. Wurm, H. Spahr, M. Falkenberg, N. G. Larsson and S. Jakobs (2011). "Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13534-13539.

Kumar, V., V. K. Tripathi, A. K. Singh, M. Lohani and M. Kuddus (2013). "Trans-resveratrol restores the damages induced by organophosphate pesticide-monocrotophos in neuronal cells." Toxicol Int **20**(1): 48-55.

Kushnareva, Y., A. N. Murphy and A. Andreyev (2002). "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state." Biochem J **368**(Pt 2): 545-553.

Kussmaul, L. and J. Hirst (2006). "The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7607-7612.

Kuznetsov, A. V., S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Mark, W. Steurer, V. Saks, Y. Usson, R. Margreiter and E. Gnaiger (2004). "Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(5): H1633-1641.

Lagouge, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver and J. Auwerx (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α ." Cell **127**(6): 1109-1122.

Lakshminarasimhan, M., U. Curth, S. Moniot, S. Mosalaganti, S. Raunser and C. Steegborn (2013). "Molecular architecture of the human protein deacetylase Sirt1 and its regulation by AROS and resveratrol." Biosci Rep **33**(3).

Lambert, A. J. and M. D. Brand (2004). "Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." J Biol Chem **279**(38): 39414-39420.

Lazarou, M., D. R. Thorburn, M. T. Ryan and M. McKenzie (2009). "Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 78-88.

Lebovitz, R. M., H. Zhang, H. Vogel, J. Cartwright, Jr., L. Dionne, N. Lu, S. Huang and M. M. Matzuk (1996). "Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9782-9787.

Lee, C. W., L. L. Wong, E. Y. Tse, H. F. Liu, V. Y. Leong, J. M. Lee, D. G. Hardie, I. O. Ng and Y. P. Ching (2012). "AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells." *Cancer Res* **72**(17): 4394-4404.

Lee, I., A. R. Salomon, S. Ficarro, I. Mathes, F. Lottspeich, L. I. Grossman and M. Huttemann (2005). "cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity." *J Biol Chem* **280**(7): 6094-6100.

Lee, I. C., A. W. El-Hattab, J. Wang, F. Y. Li, S. W. Weng, W. J. Craigen and L. J. Wong (2012). "SURF1-associated Leigh syndrome: a case series and novel mutations." *Hum Mutat* **33**(8): 1192-1200.

Lee, J. S., A. H. Park, S. H. Lee, S. H. Lee, J. H. Kim, S. J. Yang, Y. I. Yeom, T. H. Kwak, D. Lee, S. J. Lee, C. H. Lee, J. M. Kim and D. Kim (2012). "Beta-lapachone, a modulator of NAD metabolism, prevents health declines in aged mice." *PLoS One* **7**(10): e47122.

Lenaz, G., C. Bovina, C. Castelluccio, R. Fato, G. Formiggini, M. L. Genova, M. Marchetti, M. M. Pich, F. Pallotti, G. Parenti Castelli and G. Biagini (1997). "Mitochondrial complex I defects in aging." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 329-333.

Lenzen, S. (2014). "A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status." *J Biol Chem* **289**(18): 12189-12194.

Li, J., L. Feng, Y. Xing, Y. Wang, L. Du, C. Xu, J. Cao, Q. Wang, S. Fan, Q. Liu and F. Fan (2014). "Radioprotective and antioxidant effect of resveratrol in hippocampus by activating Sirt1." *Int J Mol Sci* **15**(4): 5928-5939.

Li, Q., C. Eppolito, K. Odunsi and P. A. Shrikant (2006). "IL-12-programmed long-term CD8+ T cell responses require STAT4." *J Immunol* **177**(11): 7618-7625.

Li, X. and N. Kazgan (2011). "Mammalian sirtuins and energy metabolism." *Int J Biol Sci* **7**(5): 575-587.

Li, Y., T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace and C. J. Epstein (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* **11**(4): 376-381.

Lin, A. L., D. Coman, L. Jiang, D. L. Rothman and F. Hyder (2014). "Caloric restriction impedes age-related decline of mitochondrial function and neuronal activity." *J Cereb Blood Flow Metab* **34**(9): 1440-1443.

Lin, S. J., E. Ford, M. Haigis, G. Liszt and L. Guarente (2004). "Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." *Genes Dev* **18**(1): 12-16.

Liu, C. M., R. Y. Wang, Saijilafu, Z. X. Jiao, B. Y. Zhang and F. Q. Zhou (2013). "MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration." *Genes Dev* **27**(13): 1473-1483.

Liu, J., J. Li, W. J. Li and C. M. Wang (2013). "The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus." *J Diabetes Res* **2013**: 585897.

Liu, Y., G. Fiskum and D. Schubert (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." *J Neurochem* **80**(5): 780-787.

Llopis, J., J. M. McCaffery, A. Miyawaki, M. G. Farquhar and R. Y. Tsien (1998). "Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6803-6808.

Loeffen, J. L., J. A. Smeitink, J. M. Trijbels, A. J. Janssen, R. H. Triepels, R. C. Sengers and L. P. van den Heuvel (2000). "Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects." *Hum Mutat* **15**(2): 123-134.

Lombard, D. B., F. W. Alt, H. L. Cheng, J. Bunkenborg, R. S. Streeper, R. Mostoslavsky, J. Kim, G. Yancopoulos, D. Valenzuela, A. Murphy, Y. Yang, Y. Chen, M. D. Hirschey, R. T. Bronson, M. Haigis, L. P. Guarente, R. V. Farese, Jr., S. Weissman, E. Verdin and B. Schwer (2007). "Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8807-8814.

Lombard, D. B., D. X. Tishkoff and J. Bao (2011). "Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation." *Handb Exp Pharmacol* **206**: 163-188.

Lopes Costa, A., C. Le Bachelier, L. Mathieu, A. Rotig, A. Boneh, P. De Lonlay, M. A. Tarnopolsky, D. R. Thorburn, J. Bastin and F. Djouadi (2014). "Beneficial effects of resveratrol

on respiratory chain defects in patients' fibroblasts involve estrogen receptor and estrogen-related receptor alpha signaling." *Hum Mol Genet* **23**(8): 2106-2119.

Lopez-Lluch, G., N. Hunt, B. Jones, M. Zhu, H. Jamieson, S. Hilmer, M. V. Cascajo, J. Allard, D. K. Ingram, P. Navas and R. de Cabo (2006). "Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1768-1773.

Lopez-Nicolas, J. M. and F. Garcia-Carmona (2008). "Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption." *J Agric Food Chem* **56**(17): 7600-7605.

Lopez-Nicolas, J. M., M. Perez-Gilabert and F. Garcia-Carmona (2009). "Effect of protonation and aggregation state of (E)-resveratrol on its hydroperoxidation by lipoxygenase." *J Agric Food Chem* **57**(11): 4630-4635.

MacDonald, M. J. and L. J. Brown (1996). "Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied." *Arch Biochem Biophys* **326**(1): 79-84.

Magnifico, S., L. Saias, B. Deleglise, E. Duplus, D. Kilinc, M. C. Miquel, J. L. Viovy, B. Brugg and J. M. Peyrin (2013). "NAD⁺ acts on mitochondrial SirT3 to prevent axonal caspase activation and axonal degeneration." *FASEB J* **27**(12): 4712-4722.

Maher, P. (2005). "The effects of stress and aging on glutathione metabolism." *Ageing Res Rev* **4**(2): 288-314.

Majander, A., K. Huoponen, M. L. Savontaus, E. Nikoskelainen and M. Wikstrom (1991). "Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON)." *FEBS Lett* **292**(1-2): 289-292.

Maldonado, E. N. and J. J. Lemasters (2012). "Warburg revisited: regulation of mitochondrial metabolism by voltage-dependent anion channels in cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* **342**(3): 637-641.

Margulis, L. (1970). "Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: assortment of mitochondria and chloroplasts?" *J Theor Biol* **26**(2): 337-342.

Martins, L. A., B. P. Coelho, G. Behr, L. F. Pettenuzzo, I. C. Souza, J. C. Moreira, R. Borojevic, C. Gottfried and F. C. Guma (2014). "Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells." *Cell Biochem Biophys* **68**(2): 247-257.

Massey, V., S. Strickland, S. G. Mayhew, L. G. Howell, P. C. Engel, R. G. Matthews, M. Schuman and P. A. Sullivan (1969). "The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen." *Biochem Biophys Res Commun* **36**(6): 891-897.

Massudi, H., R. Grant, N. Braidy, J. Guest, B. Farnsworth and G. J. Guillemin (2012). "Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue." *PLoS One* **7**(7): e42357.

Mathiesen, C. and C. Hagerhall (2002). "Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters." *Biochim Biophys Acta* **1556**(2-3): 121-132.

Mattevi, A. (2006). "A close look at NAD biosynthesis." *Nat Struct Mol Biol* **13**(7): 563-564.

McKenna, M. C., H. S. Waagepetersen, A. Schousboe and U. Sonnewald (2006). "Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools." *Biochem Pharmacol* **71**(4): 399-407.

McLennan, H. R. and M. Degli Esposti (2000). "The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species." *J Bioenerg Biomembr* **32**(2): 153-162.

Menzies, K. J., K. Singh, A. Saleem and D. A. Hood (2013). "Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis." *J Biol Chem* **288**(10): 6968-6979.

Mercader, J., A. Palou and M. L. Bonet (2011). "Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes." *J Nutr Biochem* **22**(9): 828-834.

Michishita, E., R. A. McCord, E. Berber, M. Kioi, H. Padilla-Nash, M. Damian, P. Cheung, R. Kusumoto, T. L. Kawahara, J. C. Barrett, H. Y. Chang, V. A. Bohr, T. Ried, O. Gozani and K. F. Chua (2008). "SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin." *Nature* **452**(7186): 492-496.

Michishita, E., J. Y. Park, J. M. Burneskis, J. C. Barrett and I. Horikawa (2005). "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins." Mol Biol Cell **16**(10): 4623-4635.

Mimaki, M., X. Wang, M. McKenzie, D. R. Thorburn and M. T. Ryan (2012). "Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease." Biochim Biophys Acta **1817**(6): 851-862.

Miwa, S., H. Jow, K. Baty, A. Johnson, R. Czapiewski, G. Saretzki, A. Treumann and T. von Zglinicki (2014). "Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice." Nat Commun **5**: 3837.

Modis, K., D. Gero, K. Erdelyi, P. Szoleczky, D. DeWitt and C. Szabo (2012). "Cellular bioenergetics is regulated by PARP1 under resting conditions and during oxidative stress." Biochem Pharmacol **83**(5): 633-643.

Mokni, M., S. Elkahoui, F. Limam, M. Amri and E. Aouani (2007). "Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat." Neurochem Res **32**(6): 981-987.

Moniot, S., M. Weyand and C. Steegborn (2012). "Structures, substrates, and regulators of Mammalian sirtuins - opportunities and challenges for drug development." Front Pharmacol **3**: 16.

Mootha, V. K., J. Bunkenborg, J. V. Olsen, M. Hjerrild, J. R. Wisniewski, E. Stahl, M. S. Bolouri, H. N. Ray, S. Sihag, M. Kamal, N. Patterson, E. S. Lander and M. Mann (2003). "Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria." Cell **115**(5): 629-640.

Moran, M., H. Rivera, M. Sanchez-Arago, A. Blazquez, B. Merinero, C. Ugalde, J. Arenas, J. M. Cuezva and M. A. Martin (2010). "Mitochondrial bioenergetics and dynamics interplay in complex I-deficient fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1802**(5): 443-453.

Moreira, A. C., A. M. Silva, M. S. Santos and V. A. Sardao (2013). "Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: investigation of the role of gender." Food Chem Toxicol **53**: 18-26.

Morgan, D. J. and L. A. Sazanov (2008). "Three-dimensional structure of respiratory complex I from *Escherichia coli* in ice in the presence of nucleotides." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 711-718.

Morita, Y., O. Wada-Hiraike, T. Yano, A. Shirane, M. Hirano, H. Hiraike, S. Koyama, H. Oishi, O. Yoshino, Y. Miyamoto, K. Sone, K. Oda, S. Nakagawa, K. Tsutsui and Y. Taketani (2012). "Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary." Reprod Biol Endocrinol **10**: 14.

Mracek, T., Z. Drahota and J. Houstek (2013). "The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues." Biochim Biophys Acta **1827**(3): 401-410.

Mukherjee, S., J. I. Dudley and D. K. Das (2010). "Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits." Dose Response **8**(4): 478-500.

Mullinax, T. R., J. N. Mock, A. J. McEvily and J. H. Harrison (1982). "Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Evidence for an allosteric citrate-binding site." J Biol Chem **257**(22): 13233-13239.

Munin, A. and F. Edwards-Levy (2011). "Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review." Pharmaceutics **3**(4): 793-829.

Murai, M., K. Sekiguchi, T. Nishioka and H. Miyoshi (2009). "Characterization of the inhibitor binding site in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase by photoaffinity labeling using a quinazoline-type inhibitor." Biochemistry **48**(4): 688-698.

Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.

Nakagawa, T., D. J. Lomb, M. C. Haigis and L. Guarente (2009). "SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle." Cell **137**(3): 560-570.

Nakahata, Y., S. Sahar, G. Astarita, M. Kaluzova and P. Sassone-Corsi (2009). "Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1." Science **324**(5927): 654-657.

Nakamura, Y., M. Ogura, D. Tanaka and N. Inagaki (2008). "Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5." Biochem Biophys Res Commun **366**(1): 174-179.

Napiwotzki, J. and B. Kadenbach (1998). "Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV." Biol Chem **379**(3): 335-339.

Napiwotzki, J., K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and B. Kadenbach (1997). "ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity." *Biol Chem* **378**(9): 1013-1021.

Nasrin, N., V. K. Kaushik, E. Fortier, D. Wall, K. J. Pearson, R. de Cabo and L. Bordone (2009). "JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity." *PLoS One* **4**(12): e8414.

Nemoto, S., M. M. Fergusson and T. Finkel (2004). "Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway." *Science* **306**(5704): 2105-2108.

Nemoto, S., M. M. Fergusson and T. Finkel (2005). "SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}." *J Biol Chem* **280**(16): 16456-16460.

Nemoto, S., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans and T. Finkel (2000). "Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7311-7318.

Newman, J. C., W. He and E. Verdin (2012). "Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease." *J Biol Chem* **287**(51): 42436-42443.

Nicholls, D. G. and R. M. Locke (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiol Rev* **64**(1): 1-64.

Nikiforov, A., C. Dolle, M. Niere and M. Ziegler (2011). "Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation." *J Biol Chem* **286**(24): 21767-21778.

Nikoskelainen, E. K., R. J. Marttila, K. Huoponen, V. Juvonen, T. Lamminen, P. Sonninen and M. L. Savontaus (1995). "Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **59**(2): 160-164.

Ogbi, M. and J. A. Johnson (2006). "Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning." *Biochem J* **393**(Pt 1): 191-199.

Ohnishi, S. T., T. Ohnishi, S. Muranaka, H. Fujita, H. Kimura, K. Uemura, K. Yoshida and K. Utsumi (2005). "A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* **37**(1): 1-15.

Ohnishi, T., S. T. Ohnishi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and R. T. Weber (2012). "EPR detection of two protein-associated ubiquinone components (SQ(Nf) and SQ(Ns)) in the membrane in situ and in proteoliposomes of isolated bovine heart complex I." *Biochim Biophys Acta* **1817**(10): 1803-1809.

Onyango, P., I. Celic, J. M. McCaffery, J. D. Boeke and A. P. Feinberg (2002). "SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13653-13658.

Ozden, O., S. H. Park, H. S. Kim, H. Jiang, M. C. Coleman, D. R. Spitz and D. Gius (2011). "Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress." *Aging (Albany NY)* **3**(2): 102-107.

Pacholec, M., J. E. Bleasdale, B. Chrnyk, D. Cunningham, D. Flynn, R. S. Garofalo, D. Griffith, M. Griffor, P. Loulakis, B. Pabst, X. Qiu, B. Stockman, V. Thanabal, A. Varghese, J. Ward, J. Withka and K. Ahn (2010). "SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1." *J Biol Chem* **285**(11): 8340-8351.

Pagliarini, D. J. and J. E. Dixon (2006). "Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage?" *Trends Biochem Sci* **31**(1): 26-34.

Pagniez-Mammeri, H., S. Loublie, A. Legrand, P. Benit, P. Rustin and A. Slama (2012). "Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin I. Structural genes." *Mol Genet Metab* **105**(2): 163-172.

Palace, J. (2009). "Multiple sclerosis associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy." *J Neurol Sci* **286**(1-2): 24-27.

Papa, S., A. Francavilla, G. Paradies and B. Meduri (1971). "The transport of pyruvate in rat liver mitochondria." *FEBS Lett* **12**(5): 285-288.

Papa, S., V. Petruzzella, S. Scacco, R. Vergari, D. Panelli, R. Tamborra, P. Corsi, M. Picciariello, R. Lambo, E. Bertini and F. M. Santorelli (2004). "Respiratory complex I in brain development and genetic disease." *Neurochem Res* **29**(3): 547-560.

Parajuli, N., A. Marine, S. Simmons, H. Saba, T. Mitchell, T. Shimizu, T. Shirasawa and L. A. Macmillan-Crow (2011). "Generation and characterization of a novel kidney-specific manganese superoxide dismutase knockout mouse." *Free Radic Biol Med* **51**(2): 406-416.

Parikh, S., R. Saneto, M. J. Falk, I. Anselm, B. H. Cohen, R. Haas and T. M. Medicine Society (2009). "A modern approach to the treatment of mitochondrial disease." Curr Treat Options Neurol **11**(6): 414-430.

Park, C. E., M. J. Kim, J. H. Lee, B. I. Min, H. Bae, W. Choe, S. S. Kim and J. Ha (2007). "Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase." Exp Mol Med **39**(2): 222-229.

Park, J., Y. Chen, D. X. Tishkoff, C. Peng, M. Tan, L. Dai, Z. Xie, Y. Zhang, B. M. Zwaans, M. E. Skinner, D. B. Lombard and Y. Zhao (2013). "SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways." Mol Cell **50**(6): 919-930.

Pasinetti, G. M., J. Wang, P. Marambaud, M. Ferruzzi, P. Gregor, L. A. Knable and L. Ho (2011). "Neuroprotective and metabolic effects of resveratrol: therapeutic implications for Huntington's disease and other neurodegenerative disorders." Exp Neurol **232**(1): 1-6.

Pastoris, O., F. Boschi, M. Verri, P. Baiardi, G. Felzani, J. Vecchiet, M. Dossena and M. Catapano (2000). "The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects." Exp Gerontol **35**(1): 95-104.

Paulin, R., P. Dromparis, G. Sutendra, V. Gurtu, S. Zervopoulos, L. Bowers, A. Haromy, L. Webster, S. Provencher, S. Bonnet and E. D. Michelakis (2014). "Sirtuin 3 Deficiency Is Associated with Inhibited Mitochondrial Function and Pulmonary Arterial Hypertension in Rodents and Humans." Cell Metab.

Peng, C., Z. Lu, Z. Xie, Z. Cheng, Y. Chen, M. Tan, H. Luo, Y. Zhang, W. He, K. Yang, B. M. Zwaans, D. Tishkoff, L. Ho, D. Lombard, T. C. He, J. Dai, E. Verdin, Y. Ye and Y. Zhao (2011). "The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme." Mol Cell Proteomics **10**(12): M111 012658.

Perry, S. W., J. P. Norman, J. Barbieri, E. B. Brown and H. A. Gelbard (2011). "Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide." Biotechniques **50**(2): 98-115.

Pervaiz, S. (2003). "Resveratrol: from grapevines to mammalian biology." FASEB J **17**(14): 1975-1985.

Peterson, C. M., D. L. Johannsen and E. Ravussin (2012). "Skeletal muscle mitochondria and aging: a review." J Aging Res **2012**: 194821.

Pettit, F. H., J. W. Pelley and L. J. Reed (1975). "Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD ratios." Biochem Biophys Res Commun **65**(2): 575-582.

Pfitzner, U., K. Hoffmeier, A. Harrenga, A. Kannt, H. Michel, E. Bamberg, O. M. Richter and B. Ludwig (2000). "Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **39**(23): 6756-6762.

Picard, M., D. Ritchie, K. J. Wright, C. Romestaing, M. M. Thomas, S. L. Rowan, T. Taivassalo and R. T. Hepple (2010). "Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers." Aging Cell **9**(6): 1032-1046.

Pimentel, C., L. Batista-Nascimento, C. Rodrigues-Pousada and R. A. Menezes (2012). "Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Oxid Med Cell Longev **2012**: 132146.

Pinto Mdel, C., J. A. Garcia-Barrado and P. Macias (2003). "Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase." J Agric Food Chem **51**(6): 1653-1657.

Pirinen, E., C. Canto, Y. S. Jo, L. Morato, H. Zhang, K. J. Menzies, E. G. Williams, L. Mouchiroud, N. Moullan, C. Hagberg, W. Li, S. Timmers, R. Imhof, J. Verbeek, A. Pujol, B. van Loon, C. Viscomi, M. Zeviani, P. Schrauwen, A. A. Sauve, K. Schoonjans and J. Auwerx (2014). "Pharmacological Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases improves fitness and mitochondrial function in skeletal muscle." Cell Metab **19**(6): 1034-1041.

Pittelli, M., R. Felici, V. Pitozzi, L. Giovannelli, E. Bigagli, F. Cialdai, G. Romano, F. Moroni and A. Chiarugi (2011). "Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis." Mol Pharmacol **80**(6): 1136-1146.

Pittelli, M., L. Formentini, G. Faraco, A. Lapucci, E. Rapizzi, F. Cialdai, G. Romano, G. Moneti, F. Moroni and A. Chiarugi (2010). "Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool." J Biol Chem **285**(44): 34106-34114.

Plaut, G. W., C. P. Cheung, R. J. Suhadolnik and T. Aogaichi (1979). "Cosubstrate and allosteric modifier activities of structural analogues of NAD and ADP for NAD-specific isocitrate dehydrogenase from bovine heart." Biochemistry **18**(15): 3430-3438.

Porter, R. K., A. J. Hulbert and M. D. Brand (1996). "Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition." *Am J Physiol* **271**(6 Pt 2): R1550-1560.

Potluri, P., N. Yadava and I. E. Scheffler (2004). "The role of the ESSS protein in the assembly of a functional and stable mammalian mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase)." *Eur J Biochem* **271**(15): 3265-3273.

Prabu, S. K., H. K. Anandatheerthavarada, H. Raza, S. Srinivasan, J. F. Spear and N. G. Avadhani (2006). "Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury." *J Biol Chem* **281**(4): 2061-2070.

Price, N. L., A. P. Gomes, A. J. Ling, F. V. Duarte, A. Martin-Montalvo, B. J. North, B. Agarwal, L. Ye, G. Ramadori, J. S. Teodoro, B. P. Hubbard, A. T. Varela, J. G. Davis, B. Varamini, A. Hafner, R. Moaddel, A. P. Rolo, R. Coppari, C. M. Palmeira, R. de Cabo, J. A. Baur and D. A. Sinclair (2012). "SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function." *Cell Metab* **15**(5): 675-690.

Pryde, K. R. and J. Hirst (2011). "Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer." *J Biol Chem* **286**(20): 18056-18065.

Puomila, A., P. Hamalainen, S. Kivioja, M. L. Savontaus, S. Koivumaki, K. Huoponen and E. Nikoskelainen (2007). "Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland." *Eur J Hum Genet* **15**(10): 1079-1089.

Qiu, X., K. Brown, M. D. Hirschey, E. Verdin and D. Chen (2010). "Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation." *Cell Metab* **12**(6): 662-667.

Quinlan, C. L., A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, J. R. Treberg, B. A. Ackrell and M. D. Brand (2012). "Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions." *J Biol Chem* **287**(32): 27255-27264.

Ramsey, K. M., J. Yoshino, C. S. Brace, D. Abrassart, Y. Kobayashi, B. Marche, H. K. Hong, J. L. Chong, E. D. Buhr, C. Lee, J. S. Takahashi, S. Imai and J. Bass (2009). "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis." *Science* **324**(5927): 651-654.

Rardin, M. J., W. He, Y. Nishida, J. C. Newman, C. Carrico, S. R. Danielson, A. Guo, P. Gut, A. K. Sahu, B. Li, R. Uppala, M. Fitch, T. Riiff, L. Zhu, J. Zhou, D. Mulhern, R. D. Stevens, O. R. Ilkayeva, C. B. Newgard, M. P. Jacobson, M. Hellerstein, E. S. Goetzman, B. W. Gibson and E. Verdin (2013). "SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks." *Cell Metab* **18**(6): 920-933.

Rascon, B., B. P. Hubbard, D. A. Sinclair and G. V. Amdam (2012). "The lifespan extension effects of resveratrol are conserved in the honey bee and may be driven by a mechanism related to caloric restriction." *Aging (Albany NY)* **4**(7): 499-508.

Ren, J., Q. Li, S. Wu, S. Y. Li and S. A. Babcock (2007). "Cardiac overexpression of antioxidant catalase attenuates aging-induced cardiomyocyte relaxation dysfunction." *Mech Ageing Dev* **128**(3): 276-285.

Revollo, J. R., A. Korner, K. F. Mills, A. Satoh, T. Wang, A. Garten, B. Dasgupta, Y. Sasaki, C. Wolberger, R. R. Townsend, J. Milbrandt, W. Kiess and S. Imai (2007). "Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme." *Cell Metab* **6**(5): 363-375.

Reznick, R. M., H. Zong, J. Li, K. Morino, I. K. Moore, H. J. Yu, Z. X. Liu, J. Dong, K. J. Mustard, S. A. Hawley, D. Befroy, M. Pypaert, D. G. Hardie, L. H. Young and G. I. Shulman (2007). "Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis." *Cell Metab* **5**(2): 151-156.

Rieger, T., J. Napiwotzki, F. J. Huther and B. Kadenbach (1995). "The number of nucleotide binding sites in cytochrome C oxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **217**(1): 34-40.

Ristow, M. (2014). "Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits." *Nat Med* **20**(7): 709-711.

Ristow, M. and K. Schmeisser (2014). "Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)." *Dose Response* **12**(2): 288-341.

Robb, E. L., M. M. Page, B. E. Wiens and J. A. Stuart (2008). "Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD." *Biochem Biophys Res Commun* **367**(2): 406-412.

Robb, E. L. and J. A. Stuart (2010). "trans-Resveratrol as a neuroprotectant." *Molecules* **15**(3): 1196-1212.

- Robb, E. L., L. Winkelmoen, N. Visanji, J. Brotchie and J. A. Stuart (2008). "Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain." Biochem Biophys Res Commun **372**(1): 254-259.
- Roche, T. E. and Y. Hiromasa (2007). "Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer." Cell Mol Life Sci **64**(7-8): 830-849.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman and P. Puigserver (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.
- Rouleau, M., A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann and G. G. Poirier (2010). "PARP inhibition: PARP1 and beyond." Nat Rev Cancer **10**(4): 293-301.
- Rowles, J., S. W. Scherer, T. Xi, M. Majer, D. C. Nickle, J. M. Rommens, K. M. Popov, R. A. Harris, N. L. Riebow, J. Xia, L. C. Tsui, C. Bogardus and M. Prochazka (1996). "Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human." J Biol Chem **271**(37): 22376-22382.
- Ruderman, N. B., X. J. Xu, L. Nelson, J. M. Cacicedo, A. K. Saha, F. Lan and Y. Ido (2010). "AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?" Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(4): E751-760.
- Rustin, P., D. Chretien, T. Bourgeron, J. LeBidois, D. Sidi, A. Rotig and A. Munnich (1993). "Investigation of respiratory chain activity in human heart." Biochem Med Metab Biol **50**(1): 120-126.
- Rutanen, J., N. Yaluri, S. Modi, J. Pihlajamaki, M. Vanttinen, P. Itkonen, S. Kainulainen, H. Yamamoto, M. Lagouge, D. A. Sinclair, P. Elliott, C. Westphal, J. Auwerx and M. Laakso (2010). "SIRT1 mRNA expression may be associated with energy expenditure and insulin sensitivity." Diabetes **59**(4): 829-835.
- Rutter, G. A. and R. M. Denton (1988). "Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios." Biochem J **252**(1): 181-189.
- Ryu, D., Y. S. Jo, G. Lo Sasso, S. Stein, H. Zhang, A. Perino, J. U. Lee, M. Zeviani, R. Romand, M. O. Hottiger, K. Schoonjans and J. Auwerx (2014). "A SIRT7-Dependent Acetylation Switch of GABPbeta1 Controls Mitochondrial Function." Cell Metab.
- Saada, A., M. Bar-Meir, C. Belaiche, C. Miller and O. Elpeleg (2004). "Evaluation of enzymatic assays and compounds affecting ATP production in mitochondrial respiratory chain complex I deficiency." Anal Biochem **335**(1): 66-72.
- Sadun, A. A., C. F. Chicani, F. N. Ross-Cisneros, P. Barboni, M. Thoolen, W. D. Shrader, K. Kubis, V. Carelli and G. Miller (2012). "Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy." Arch Neurol **69**(3): 331-338.
- Sanders, B. D., B. Jackson and R. Marmorstein (2010). "Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't." Biochim Biophys Acta **1804**(8): 1604-1616.
- Santidrian, A. F., A. Matsuno-Yagi, M. Ritland, B. B. Seo, S. E. LeBoeuf, L. J. Gay, T. Yagi and B. Felding-Habermann (2013). "Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression." J Clin Invest **123**(3): 1068-1081.
- Sanz, A. and R. K. Stefanatos (2008). "The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view." Curr Aging Sci **1**(1): 10-21.
- Sasaki, T., B. Maier, K. D. Koclega, M. Chruszcz, W. Gluba, P. T. Stukenberg, W. Minor and H. Scoble (2008). "Phosphorylation regulates SIRT1 function." PLoS One **3**(12): e4020.
- Sassi, N., A. Mattarei, M. Azzolini, P. Bernardi, I. Szabo, C. Paradisi, M. Zoratti and L. Biasutto (2014). "Mitochondria-targeted resveratrol derivatives act as cytotoxic pro-oxidants." Curr Pharm Des **20**(2): 172-179.
- Sauve, A. A. (2010). "Sirtuin chemical mechanisms." Biochim Biophys Acta **1804**(8): 1591-1603.
- Sauve, A. A., C. Wolberger, V. L. Schramm and J. D. Boeke (2006). "The biochemistry of sirtuins." Annu Rev Biochem **75**: 435-465.
- Sazanov, L. A., J. Carroll, P. Holt, L. Toime and I. M. Fearnley (2003). "A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the Escherichia coli NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)." J Biol Chem **278**(21): 19483-19491.
- Sazanov, L. A. and P. Hinchliffe (2006). "Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus." Science **311**(5766): 1430-1436.

- Scacco, S., R. Vergari, R. C. Scarpulla, Z. Technikova-Dobrova, A. Sardanelli, R. Lambo, V. Lorusso and S. Papa (2000). "cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures." *J Biol Chem* **275**(23): 17578-17582.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." *Free Radic Biol Med* **30**(11): 1191-1212.
- Schagger, H., H. Bentlage, W. Ruitenbeek, K. Pfeiffer, S. Rotter, C. Rother, A. Bottcher-Purkl and E. Lodemann (1996). "Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation." *Electrophoresis* **17**(4): 709-714.
- Schatz, G. (1995). "Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1271**(1): 123-126.
- Scher, M. B., A. Vaquero and D. Reinberg (2007). "SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress." *Genes Dev* **21**(8): 920-928.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." *EMBO J* **26**(7): 1749-1760.
- Schiff, M., P. Benit, R. El-Khoury, D. Schlemmer, J. F. Benoist and P. Rustin (2011). "Mouse studies to shape clinical trials for mitochondrial diseases: high fat diet in Harlequin mice." *PLoS One* **6**(12): e28823.
- Schlicker, C., M. Gertz, P. Papatheodorou, B. Kachholz, C. F. Becker and C. Steegborn (2008). "Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5." *J Mol Biol* **382**(3): 790-801.
- Schnell, D. J. and D. N. Hebert (2003). "Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes." *Cell* **112**(4): 491-505.
- Schuler, F. and J. E. Casida (2001). "Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling." *Biochim Biophys Acta* **1506**(1): 79-87.
- Schulz, T. J., K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer and M. Ristow (2007). "Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress." *Cell Metab* **6**(4): 280-293.
- Schuster, S., M. Penke, T. Gorski, S. Petzold-Quinque, G. Damm, R. Gebhardt, W. Kiess and A. Garten (2014). "Resveratrol differentially regulates NAMPT and SIRT1 in Hepatocarcinoma cells and primary human hepatocytes." *PLoS One* **9**(3): e91045.
- Schwer, B., J. Bunkenborg, R. O. Verdin, J. S. Andersen and E. Verdin (2006). "Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10224-10229.
- Schwer, B., B. J. North, R. A. Frye, M. Ott and E. Verdin (2002). "The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase." *J Cell Biol* **158**(4): 647-657.
- Sharma, L. K., J. Lu and Y. Bai (2009). "Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases." *Curr Med Chem* **16**(10): 1266-1277.
- Sherwood, S. and J. Hirst (2006). "Investigation of the mechanism of proton translocation by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria: does the enzyme operate by a Q-cycle mechanism?" *Biochem J* **400**(3): 541-550.
- Shin, S. M., I. J. Cho and S. G. Kim (2009). "Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3beta inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway." *Mol Pharmacol* **76**(4): 884-895.
- Short, K. R., M. L. Bigelow, J. Kahl, R. Singh, J. Coenen-Schimke, S. Raghavakaimal and K. S. Nair (2005). "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15): 5618-5623.
- Shrikhande, D. Y., P. Kalakoti, M. M. Syed, K. Ahya and G. Singh (2010). "A rare mitochondrial disorder: Leigh syndrome--a case report." *Ital J Pediatr* **36**: 62.
- Singh, G. and R. S. Pai (2014). "Optimized PLGA nanoparticle platform for orally dosed trans-resveratrol with enhanced bioavailability potential." *Expert Opin Drug Deliv* **11**(5): 647-659.

Sofou, K., I. F. De Coo, P. Isohanni, E. Ostergaard, K. Naess, L. De Meirleir, C. Tzoulis, J. Uusimaa, I. B. De Angst, T. Lonnqvist, H. Pihko, K. Mankinen, L. A. Bindoff, M. Tulinius and N. Darin (2014). "A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival." *Orphanet J Rare Dis* **9**: 52.

Spelbrink, J. N. (2010). "Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges." *IUBMB Life* **62**(1): 19-32.

Spriet, L. L. and G. J. Heigenhauser (2002). "Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in human skeletal muscle during exercise." *Exerc Sport Sci Rev* **30**(2): 91-95.

Spruijt, L., D. N. Kolbach, R. F. de Coo, A. S. Plomp, N. J. Bauer, H. J. Smeets and C. E. de Die-Smulders (2006). "Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy." *Am J Ophthalmol* **141**(4): 676-682.

Stein, L. R. and S. Imai (2012). "The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 420-428.

Steuber, J. (2001). "The Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I." *J Bioenerg Biomembr* **33**(3): 179-186.

Steverding, D. and B. Kadenbach (1991). "Influence of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline modification on proton translocation and membrane potential of reconstituted cytochrome-c oxidase support "proton slippage"." *J Biol Chem* **266**(13): 8097-8101.

Stock, D., A. G. Leslie and J. E. Walker (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." *Science* **286**(5445): 1700-1705.

Stojanovic, S., H. Sprinz and O. Brede (2001). "Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation." *Arch Biochem Biophys* **391**(1): 79-89.

Strumilo, S. (2005). "Short-term regulation of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by energy-linked and some other effectors." *Biochemistry (Mosc)* **70**(7): 726-729.

Svensson, K. and C. Handschin (2014). "MicroRNAs emerge as modulators of NAD⁺-dependent energy metabolism in skeletal muscle." *Diabetes* **63**(5): 1451-1453.

Tao, R., M. C. Coleman, J. D. Pennington, O. Ozden, S. H. Park, H. Jiang, H. S. Kim, C. R. Flynn, S. Hill, W. Hayes McDonald, A. K. Olivier, D. R. Spitz and D. Gius (2010). "Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress." *Mol Cell* **40**(6): 893-904.

Tapia, P. C. (2006). "Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality." *Med Hypotheses* **66**(4): 832-843.

Tatarkova, Z., S. Kuka, P. Racay, J. Lehotsky, D. Dobrota, D. Mistuna and P. Kaplan (2011). "Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart." *Physiol Res* **60**(2): 281-289.

Tillu, D. V., O. K. Melemedjian, M. N. Asiedu, N. Qu, M. De Felice, G. Dussor and T. J. Price (2012). "Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain." *Mol Pain* **8**: 5.

Tiranti, V., P. Corona, M. Greco, J. W. Taanman, F. Carrara, E. Lamantea, L. Nijtmans, G. Uziel and M. Zeviani (2000). "A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome." *Hum Mol Genet* **9**(18): 2733-2742.

Tocilescu, M. A., U. Fendel, K. Zwicker, S. Drose, S. Kerscher and U. Brandt (2010). "The role of a conserved tyrosine in the 49-kDa subunit of complex I for ubiquinone binding and reduction." *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 625-632.

Tome-Carneiro, J., M. Larrosa, A. Gonzalez-Sarrias, F. A. Tomas-Barberan, M. T. Garcia-Conesa and J. C. Espin (2013). "Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence." *Curr Pharm Des* **19**(34): 6064-6093.

Toppo, S., L. Flohe, F. Ursini, S. Vanin and M. Maiorino (2009). "Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme." *Biochim Biophys Acta* **1790**(11): 1486-1500.

Treberg, J. R., C. L. Quinlan and M. D. Brand (2011). "Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Biol Chem* **286**(31): 27103-27110.

Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2004). "Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase." *J Neurosci* **24**(36): 7771-7778.

Tretter, L., K. Takacs, V. Hegedus and V. Adam-Vizi (2007). "Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H₂O₂ generation in brain mitochondria." *J Neurochem* **100**(3): 650-663.

Tucker, E. J., A. G. Compton, S. E. Calvo and D. R. Thorburn (2011). "The molecular basis of human complex I deficiency." *IUBMB Life* **63**(9): 669-677.

Turkan, A., Y. Hiromasa and T. E. Roche (2004). "Formation of a complex of the catalytic subunit of pyruvate dehydrogenase phosphatase isoform 1 (PDP1c) and the L2 domain forms a Ca²⁺ binding site and captures PDP1c as a monomer." *Biochemistry* **43**(47): 15073-15085.

Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344.

Tyler, D. D. (1975). "Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver." *Biochem J* **147**(3): 493-504.

Ugalde, C., R. H. Triepels, M. J. Coenen, L. P. van den Heuvel, R. Smeets, J. Uusimaa, P. Briones, J. Campistol, K. Majamaa, J. A. Smeitink and L. G. Nijtmans (2003). "Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene." *Ann Neurol* **54**(5): 665-669.

Um, J. H., S. J. Park, H. Kang, S. Yang, M. Foretz, M. W. McBurney, M. K. Kim, B. Viollet and J. H. Chung (2010). "AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol." *Diabetes* **59**(3): 554-563.

Ungvari, Z., N. Labinskyy, P. Mukhopadhyay, J. T. Pinto, Z. Bagi, P. Ballabh, C. Zhang, P. Pacher and A. Csiszar (2009). "Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(5): H1876-1881.

Valenzano, D. R., E. Terzibasi, T. Genade, A. Cattaneo, L. Domenici and A. Cellierino (2006). "Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate." *Curr Biol* **16**(3): 296-300.

Valsecchi, F., C. Monge, M. Forkink, A. J. de Groof, G. Benard, R. Rossignol, H. G. Swarts, S. E. van Emst-de Vries, R. J. Rodenburg, M. A. Calvaruso, L. G. Nijtmans, B. Heeman, P. Roestenberg, B. Wieringa, J. A. Smeitink, W. J. Koopman and P. H. Willems (2012). "Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblasts." *Biochim Biophys Acta* **1817**(10): 1925-1936.

van der Veer, E., C. Ho, C. O'Neil, N. Barbosa, R. Scott, S. P. Cregan and J. G. Pickering (2007). "Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase." *J Biol Chem* **282**(15): 10841-10845.

Van Maldergem, L., F. Trijbels, S. DiMauro, P. J. Sindelar, O. Musumeci, A. Janssen, X. Delberghe, J. J. Martin and Y. Gillerot (2002). "Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters." *Ann Neurol* **52**(6): 750-754.

Van Raamsdonk, J. M. and S. Hekimi (2009). "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *PLoS Genet* **5**(2): e1000361.

Vaquero, A., M. B. Scher, D. H. Lee, A. Sutton, H. L. Cheng, F. W. Alt, L. Serrano, R. Sternglanz and D. Reinberg (2006). "SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis." *Genes Dev* **20**(10): 1256-1261.

Vassilopoulos, A., J. D. Pennington, T. Andersson, D. M. Rees, A. D. Bosley, I. M. Fearnley, A. Ham, C. R. Flynn, S. Hill, K. L. Rose, H. S. Kim, C. X. Deng, J. E. Walker and D. Gius (2014). "SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress." *Antioxid Redox Signal* **21**(4): 551-564.

Venturini, C. D., S. Merlo, A. A. Souto, C. Fernandes Mda, R. Gomez and C. R. Rhoden (2010). "Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes." *Oxid Med Cell Longev* **3**(6): 434-441.

Verdin, E., M. D. Hirschey, L. W. Finley and M. C. Haigis (2010). "Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling." *Trends Biochem Sci* **35**(12): 669-675.

Verkaart, S., W. J. Koopman, J. Cheek, S. E. van Emst-de Vries, L. W. van den Heuvel, J. A. Smeitink and P. H. Willems (2007). "Mitochondrial and cytosolic thiol redox state are not detectably altered in isolated human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency." *Biochim Biophys Acta* **1772**(9): 1041-1051.

Verkaart, S., W. J. Koopman, S. E. van Emst-de Vries, L. G. Nijtmans, L. W. van den Heuvel, J. A. Smeitink and P. H. Willems (2007). "Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency." *Biochim Biophys Acta* **1772**(3): 373-381.

Vieira de Almeida, L. M., C. C. Pineiro, M. C. Leite, G. Brolese, R. B. Leal, C. Gottfried and C. A. Goncalves (2008). "Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures." *Neurochem Res* **33**(1): 8-15.

Vinogradov, A. D. and V. G. Grivennikova (2005). "Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria." *Biochemistry (Mosc)* **70**(2): 120-127.

Vinothkumar, K. R., J. Zhu and J. Hirst (2014). "Architecture of mammalian respiratory complex I." *Nature*.

Voets, A. M., M. Huigsloot, P. J. Lindsey, A. M. Leenders, W. J. Koopman, P. H. Willems, R. J. Rodenburg, J. A. Smeitink and H. J. Smeets (2012). "Transcriptional changes in OXPHOS complex I deficiency are related to anti-oxidant pathways and could explain the disturbed calcium homeostasis." *Biochim Biophys Acta* **1822**(7): 1161-1168.

Wallace, D. C., G. Singh, M. T. Lott, J. A. Hodge, T. G. Schurr, A. M. Lezza, L. J. Elsas, 2nd and E. K. Nikoskelainen (1988). "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." *Science* **242**(4884): 1427-1430.

Walther, D. M., D. Papic, M. P. Bos, J. Tommassen and D. Rapaport (2009). "Signals in bacterial beta-barrel proteins are functional in eukaryotic cells for targeting to and assembly in mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2531-2536.

Wang, Q., Y. Zhang, C. Yang, H. Xiong, Y. Lin, J. Yao, H. Li, L. Xie, W. Zhao, Y. Yao, Z. B. Ning, R. Zeng, Y. Xiong, K. L. Guan, S. Zhao and G. P. Zhao (2010). "Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux." *Science* **327**(5968): 1004-1007.

Wei, S. J., J. H. Xing, B. L. Wang, L. Xue, J. L. Wang, R. Li, W. D. Qin, J. Wang, X. P. Wang, M. X. Zhang and Y. G. Chen (2013). "Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents reactive oxygen species induced inhibition of aldehyde dehydrogenase2 activity." *Biochim Biophys Acta* **1833**(3): 479-486.

Wenzel, E. and V. Somoza (2005). "Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol." *Mol Nutr Food Res* **49**(5): 472-481.

Weyemi, U., P. R. Parekh, C. E. Redon and W. M. Bonner (2012). "SOD2 deficiency promotes aging phenotypes in mouse skin." *Aging (Albany NY)* **4**(2): 116-118.

Williams, M. D., H. Van Remmen, C. C. Conrad, T. T. Huang, C. J. Epstein and A. Richardson (1998). "Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice." *J Biol Chem* **273**(43): 28510-28515.

Williamson, D. H., P. Lund and H. A. Krebs (1967). "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver." *Biochem J* **103**(2): 514-527.

Xiong, S., G. Salazar, N. Patrushev and R. W. Alexander (2011). "FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression." *J Biol Chem* **286**(7): 5289-5299.

Yadava, N., P. Potluri and I. E. Scheffler (2008). "Investigations of the potential effects of phosphorylation of the MWFE and ESSS subunits on complex I activity and assembly." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(3): 447-460.

Yamakuchi, M. and C. J. Lowenstein (2009). "MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop." *Cell Cycle* **8**(5): 712-715.

Yamamoto, T., N. Shibata, F. Muramatsu, N. Sakayori and M. Kobayashi (2002). "Oxidative stress in the human fetal brain: an immunohistochemical study." *Pediatr Neurol* **26**(2): 116-122.

Yang, Y., W. Fu, J. Chen, N. Olashaw, X. Zhang, S. V. Nicosia, K. Bhalla and W. Bai (2007). "SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress." *Nat Cell Biol* **9**(11): 1253-1262.

Yankovskaya, V., R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini and S. Iwata (2003). "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation." *Science* **299**(5607): 700-704.

Yen, M. Y., A. G. Wang and Y. H. Wei (2006). "Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease." *Prog Retin Eye Res* **25**(4): 381-396.

Ying, W. (2008). "NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences." *Antioxid Redox Signal* **10**(2): 179-206.

Yonemura, Y., T. Takashima, K. Miwa, I. Miyazaki, H. Yamamoto and H. Okamoto (1984). "Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration." *Diabetes* **33**(4): 401-404.

Yoshino, J., K. F. Mills, M. J. Yoon and S. Imai (2011). "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice." *Cell Metab* **14**(4): 528-536.

Yu, W., K. E. Dittenhafer-Reed and J. M. Denu (2012). "SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status." *J Biol Chem* **287**(17): 14078-14086.

Yu-Wai-Man, P. and P. F. Chinnery (1993). Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*(R). R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al. Seattle (WA).

Zhang, M., E. Mileykovskaya and W. Dowhan (2002). "Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane." *J Biol Chem* **277**(46): 43553-43556.

Zhang, Q., S. Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J. V. Rocheleau, D. W. Piston and R. H. Goodman (2007). "Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 829-833.

Zhang, Z., M. Tsukikawa, M. Peng, E. Polyak, E. Nakamaru-Ogiso, J. Ostrovsky, S. McCormack, E. Place, C. Clarke, G. Reiner, E. McCormick, E. Rappaport, R. Haas, J. A. Baur and M. J. Falk (2013). "Primary respiratory chain disease causes tissue-specific dysregulation of the global transcriptome and nutrient-sensing signaling network." *PLoS One* **8**(7): e69282.

Zhao, S., W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, J. Yao, L. Zhou, Y. Zeng, H. Li, Y. Li, J. Shi, W. An, S. M. Hancock, F. He, L. Qin, J. Chin, P. Yang, X. Chen, Q. Lei, Y. Xiong and K. L. Guan (2010). "Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation." *Science* **327**(5968): 1000-1004.

Zhao, Y., Z. B. Wang and J. X. Xu (2003). "Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O₂⁻ and H₂O₂ in mitochondria." *J Biol Chem* **278**(4): 2356-2360.

Zheng, J. and V. D. Ramirez (2000). "Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals." *Br J Pharmacol* **130**(5): 1115-1123.

Zhu, Y., Y. Yan, D. R. Principe, X. Zou, A. Vassilopoulos and D. Gius (2014). "SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis." *Cancer Metab* **2**: 15.

Zini, R., C. Morin, A. Bertelli, A. A. Bertelli and J. P. Tillement (1999). "Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain." *Drugs Exp Clin Res* **25**(2-3): 87-97.

Zoccarato, F., C. Miotto, L. Cavallini and A. Alexandre (2011). "The control of mitochondrial succinate-dependent H₂O₂ production." *J Bioenerg Biomembr* **43**(4): 359-366.

Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release." *Physiol Rev* **94**(3): 909-950.

Zschoernig, B. and U. Mahlknecht (2009). "Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by protein kinase CK2." *Biochem Biophys Res Commun* **381**(3): 372-377.

Zwicker, K., A. Galkin, S. Drose, L. Grgic, S. Kerscher and U. Brandt (2006). "The Redox-Bohr group associated with iron-sulfur cluster N₂ of complex I." *J Biol Chem* **281**(32): 23013-23017.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e)
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **jj / mm / aaaa**

**Cet engagement de non plagiat doit être
signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex



université
angers

Thèse de Doctorat

Géraldine LEMAN

Régulation de la fonction mitochondriale par le rapport NADH/NAD⁺ : le rôle clé du complexe I

Résumé

Le NAD⁺ apparaît comme un régulateur majeur du fonctionnement mitochondrial. En effet, ce cofacteur régule non seulement l'activité de nombreuses enzymes impliqués dans le métabolisme énergétique (enzymes de la β -oxydation des acides gras, du cycle de Krebs) mais joue également un rôle dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le NAD⁺ est aussi le cofacteur des sirtuines, des enzymes déacétylases régulatrices notamment du métabolisme mitochondrial. De plus, la mitochondrie est l'organite au sein duquel la concentration en NAD⁺ est la plus élevée (jusqu'à 70% du NAD cellulaire). Le complexe I, qui possède une activité NADH déshydrogénase, pourrait être l'un des régulateurs majeurs du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial. L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial dans le métabolisme énergétique et l'implication du complexe I dans les pathologies mitochondriales. Nous avons mis en évidence qu'une modulation du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial (augmentation par un activateur pharmacologique ou diminution consécutive à une mutation touchant une sous-unité du complexe I, modifie de manière drastique le métabolisme énergétique notamment en activant ou inhibant la protéine SIRT3, isoforme mitochondriale des sirtuines. Le complexe I semble jouer un rôle majeur dans cette modulation. Le resveratrol, ciblant le complexe I, ainsi que le NMN, un précurseur du NAD⁺, permettent de restaurer ce rapport et d'améliorer ainsi le métabolisme mitochondrial. Nos résultats suggèrent donc que le rapport NADH/NAD⁺ pourrait être une cible thérapeutique particulièrement intéressante dans les déficits du complexe I.

Mots clés :

Complexe I, NADH/NAD⁺, métabolisme mitochondrial, SIRT3, thérapeutique, Resveratrol.

Abstract

NAD⁺ appears as a main regulator of the mitochondrial function. Indeed, this compound not only regulates the enzymatic activity of enzymes involved in energetic metabolism (fatty acid oxidation, tricarboxylic acid cycle) but is also involved in ROS production. NAD⁺ is also the cofactor of sirtuins, deacetylase enzymes, in particular regulating the mitochondrial function. Moreover, mitochondria sequester most of the cellular NAD⁺ (up to 70%). The complex I, which possesses an NADH dehydrogenase activity, is thought to be the most important regulator of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio. The work presented here aimed at studying the role of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio in mitochondrial metabolism and to test the involvement of the complex I in mitochondrial disorders. We show that a modulation of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio (increase by a pharmacological agent or decrease in complex-I mutated fibroblasts) severely affects the mitochondrial energetic function especially by interacting with SIRT3 a mitochondrial sirtuin isoform. The NADH/NAD⁺ ratio is highly regulated by complex I activity. Resveratrol, which targets the complex I, as well as NMN, a NAD⁺ precursor, improves the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio and consequently increases the mitochondrial metabolism. Our results strongly suggest that the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio could be an interesting therapeutic target especially in complex I-deficient patients.

Key Words :

Complex I, NADH/NAD⁺, mitochondrial metabolism, SIRT3, therapeutic, Resveratrol.

Thèse de Doctorat

Géraldine LEMAN

Régulation de la fonction mitochondriale par le rapport NADH/NAD⁺ : le rôle clé du complexe I

Résumé

Le NAD⁺ apparaît comme un régulateur majeur du fonctionnement mitochondrial. En effet, ce cofacteur régule non seulement l'activité de nombreuses enzymes impliqués dans le métabolisme énergétique (enzymes de la β -oxydation des acides gras, du cycle de Krebs) mais joue également un rôle dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le NAD⁺ est aussi le cofacteur des sirtuines, des enzymes déacétylases régulatrices notamment du métabolisme mitochondrial. De plus, la mitochondrie est l'organite au sein duquel la concentration en NAD⁺ est la plus élevée (jusqu'à 70% du NAD cellulaire). Le complexe I, qui possède une activité NADH déshydrogénase, pourrait être l'un des régulateurs majeurs du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial. L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial dans le métabolisme énergétique et l'implication du complexe I dans les pathologies mitochondriales. Nous avons mis en évidence qu'une modulation du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial (augmentation par un activateur pharmacologique ou diminution consécutive à une mutation touchant une sous-unité du complexe I, modifie de manière drastique le métabolisme énergétique notamment en activant ou inhibant la protéine SIRT3, isoforme mitochondriale des sirtuines. Le complexe I semble jouer un rôle majeur dans cette modulation. Le resveratrol, ciblant le complexe I, ainsi que le NMN, un précurseur du NAD⁺, permettent de restaurer ce rapport et d'améliorer ainsi le métabolisme mitochondrial. Nos résultats suggèrent donc que le rapport NADH/NAD⁺ pourrait être une cible thérapeutique particulièrement intéressante dans les déficits du complexe I.

Mots clés :

Complexe I, NADH/NAD⁺, métabolisme mitochondrial, SIRT3, thérapeutique, Resveratrol.

Abstract

NAD⁺ appears as a main regulator of the mitochondrial function. Indeed, this compound not only regulates the enzymatic activity of enzymes involved in energetic metabolism (fatty acid oxidation, tricarboxylic acid cycle) but is also involved in ROS production. NAD⁺ is also the cofactor of sirtuins, deacetylase enzymes, in particular regulating the mitochondrial function. Moreover, mitochondria sequester most of the cellular NAD⁺ (up to 70%). The complex I, which possesses an NADH dehydrogenase activity, is thought to be the most important regulator of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio. The work presented here aimed at studying the role of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio in mitochondrial metabolism and to test the involvement of the complex I in mitochondrial disorders. We show that a modulation of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio (increase by a pharmacological agent or decrease in complex-I mutated fibroblasts) severely affects the mitochondrial energetic function especially by interacting with SIRT3 a mitochondrial sirtuin isoform. The NADH/NAD⁺ ratio is highly regulated by complex I activity. Resveratrol, which targets the complex I, as well as NMN, a NAD⁺ precursor, improves the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio and consequently increases the mitochondrial metabolism. Our results strongly suggest that the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio could be an interesting therapeutic target especially in complex I-deficient patients.

Key Words :

Complex I, NADH/NAD⁺, mitochondrial metabolism, SIRT3, therapeutic, Resveratrol.

Regulation of NAD metabolism by complex I and its implication for mitochondrial function