



**HAL**  
open science

# Etude des altérations mitochondriales dans les neuropathies optiques associées aux mutations du gène OPA1

Mariame Selma Kane

► **To cite this version:**

Mariame Selma Kane. Etude des altérations mitochondriales dans les neuropathies optiques associées aux mutations du gène OPA1. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2016. Français. NNT : 2016ANGE0075 . tel-02612638

**HAL Id: tel-02612638**

**<https://theses.hal.science/tel-02612638>**

Submitted on 19 May 2020

**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.

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*

Ecole doctorale: Biologie Santé  
Discipline: Biochimie

Unité de recherche: BNMI UMR 3214 – INSERM 1083  
Laboratoire de Biologie Neurovasculaire & Mitochondriale Intégrée

*Soutenue le 8 Juin 2016*

# **Etude des altérations mitochondriales dans les neuropathies optiques associées aux mutations du gène *OPA1***

## Directeur de thèse:

M. Chevrollier Arnaud, Maître de conférence, Université d'Angers

## Membres du jury

Mme Lombès Anne, Directeur de recherche, Université Paris V

Mme Belenguer Pascale, Professeur des universités, Université de Toulouse

Mme Wang Jing, Chargé de recherche, Université de Montpellier

M. Pascal Reynier, Professeur des universités – Praticien hospitalier, Université d'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.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**

# *Remerciements*

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

J'exprime ma reconnaissance à l'ensemble des membres de mon jury de thèse: Madame Anne Lombès, Madame Pasacle Belenguer, Madame Jing Wang et Monsieur Pascal Reynier qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe mitolab, M. Guy Lenaers, M. Dominique Bonneau, M. Vincent procaccio, M. Pascal Reynier, Mme Patricia Amati-Bonneau, Mme Dominique Loiseau, Mme Delphine Prunier, Mme Naig Gueguen, Mme Valérie Desquiret-Dumas, M. Marc Ferré.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Dr. Arnaud Chevrollier. Merci pour tes conseils, la disponibilité dont tu as fait preuve tout au long de cette thèse. Tu as su me donner la motivation malgré toutes les difficultés auxquelles nous avons fait face. Merci de m'avoir enseignée et de m'avoir communiquée le virus de la microscopie.

Dès l'entretien je me suis rendue compte que je peux compter sur vous et je ne me suis pas trompée. Je remercie Monsieur Pascal Reynier qui m'a accueillie au sein de l'équipe mitolab. Votre bonne humeur, votre sollicitude et vos encouragements m'ont portée toutes ces années. Je vous remercie de toujours croire en notre potentiel, nous les jeunes chercheurs. Parler avec vous est toujours un bonheur, on se sent tout de suite boosté. Je n'ai jamais douté de la confiance que vous me portiez et ça m'a permis de vouloir toujours relevé ce défi qu'est la thèse.

Un remerciement spécial à ma poulette Jenny. Tu as été d'un grand soutien aussi bien professionnellement, qu'émotionnellement. Tu as toujours été présente dans les moments de difficultés, de folie, de bonheur et juste quand nous avions juste besoin d'être des femmes qui profitent de la vie. J'ai trouvé en toi une amie folle, mais une grande amie quand même qui restera dans ma vie. Avec toi ce n'était pas le grand amour les premiers jours (zoèly c'est ta faute ;-)) mais petit à petit tu t'es infiltrée dans ma vie jusqu'à en devenir un membre de la famille ;-).

Balou, Balou, un énorme merci à toi, pour ton soutien de toujours, tu me dis toujours cocotte tu vas y arriver et cela a beaucoup compté au fil des jours. Un méga Merci pour tes talents de dessins, je t'ai beaucoup exploité surtout ces dernières semaines de thèse, mon Schéma-MAN...je te revaudrai ça.

Un grand merci aux professeurs Steve Thany et Amadou A. Sall; vous avez été tous les deux des mentors pour moi. Vous avez cru en moi. Vous m'avez donné l'envie de me surpasser et je ne vous remercierai jamais assez.... Merci, Merci

A mes collègues, Gé, Gui-Gui, Céline Wetterwald, Balou, Mamie, Papi, Jamoula, Dori, Truc, Majida, Salim, Tanguy, Stéphanie, Judith, qui ont rendu ces années cool, chacun à sa manière : les discussions scientifiques, les massives, les apéros, les délires, les petits déjeuners et les fameux paris-brests...

Merci également à mes collègues de biochimie, Elvina, Lucie, Blondie, Cedric,... pour leur bonne humeur, les échanges...

A mes amis, Fatima, Ophélie, Fatima, Djibril, Marie-Catherine, Kirikou, Jean-karim les constants de ma vie. Pour votre support moral... un merci ne suffit pas pour vous témoigner ma gratitude.

Enfin à ma famille, je vous aime de tout mon cœur, ce travail est pour vous.

D'abord, Un énorme merci à ma grand-mère, parce que tu m'as élevée, une femme de courage, qui m'a toujours soutenue et encouragée à réaliser de grands projets. Tu disais que si je le voulais vraiment, je pouvais ... Merci pour l'éducation que tu m'as transmise.

Mon frère, l'homme de ma vie, mon compagnon de toute une vie... nous en avons vécu des choses n'est-ce pas ? I am so grateful to have you in my life... I love you so much

Maman, les mots me manquent pour te communiquer toute ma reconnaissance. Nous élever n'a pas toujours été facile, mais tu l'as toujours fait avec plaisir. Thank you for your unconditional support. You always say that you are the proudest Mom, I should say we are the proudest kids. You are my role model... I love you

Dad, wherever you are, I hope that this will make you smile...

And to whom it may concern, Sorry for having been such a pain during the course of this experience

# *Avant-propos*

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité mixte de recherche CNRS 6214-INSERM dirigée par le Professeur Daniel HENRION. Au sein de cette unité, l'équipe Mitolab est spécialisée dans l'étude du métabolisme mitochondrial et de ses régulations dans différentes pathologies. Ma thèse a été réalisée sous la direction du Docteur Arnaud CHEVROLLIER.

L'un des principaux axes de recherche est l'étude des pathologies neurodégénératives en relation avec des anomalies de la plasticité et de la dynamique mitochondriale. Les principaux objectifs de l'équipe sont d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans les pathologies de la dynamique mitochondriale et de tenter d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires essentiels à la production énergétique et possédant leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ainsi, chaque cellule contient quelques dizaines à quelques milliers de copies d'une molécule d'ADNmt codant pour 13 sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire. Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries forment un réseau tubulaire plus ou moins connecté dont la morphologie dépend du type tissulaire et des conditions métaboliques. Ce réseau est en équilibre constant entre deux processus fonctionnels : la fusion et la fission. Ces mécanismes déterminent le nombre, la longueur et le diamètre des mitochondries. Les modifications de ces processus de fusion et de fission, connue encore sous le terme de dynamique mitochondriale sont impliquées dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives communes telles que la maladie de Huntington. Des mutations dans deux gènes de fusion (*MFN2* et *OPA1*) conduisent à des pathologies neurodégénératives de la dynamique mitochondriale, notamment la maladie de Charcot-Marie-Tooth et l'atrophie optique autosomique dominante (ADOA). C'est sur cette dernière pathologie que s'est porté l'essentiel de mes travaux de thèse.

L'atrophie optique autosomique dominante est une maladie rare (OMIM #125250) essentiellement associée aux mutations du gène de fusion de la membrane interne mitochondriale *OPA1* (OMIM #605290). Cette pathologie touche essentiellement les



cellules ganglionnaires de la rétine conduisant à une perte de la vision. Récemment, le tableau clinique des pathologies liées aux mutations *OPA1* s'est étendu pour inclure le syndrome DOA+ et le syndrome de Behr. Le syndrome DOA+ est une forme syndromique qui est causée par des mutations hétérozygotes au niveau du gène *OPA1* associant à l'altération de la vision des atteintes multisystémiques telles qu'une ataxie, une myopathie, une ophtalmoplégie externe et une neuropathie périphérique. Ces formes sévères sont souvent dues à des mutations dans le domaine GTPase de la protéine *OPA1*. Le syndrome de Behr a également été inclus dans les formes sévères des pathologies dues aux mutations d'*OPA1*. Cette pathologie est caractérisée par une atrophie optique associée à des manifestations cliniques. Une autre particularité de ce syndrome est son caractère infantile avec une apparition très précoce, dès 3 ans. Le syndrome de Behr est associé à des mutations bi-alléliques d'*OPA1*.

La caractérisation biochimique et moléculaire sur les cellules de patients et sur les modèles murins d'*OPA1*<sup>-/-</sup> montre des déficits de la phosphorylation oxydative, une altération de la maintenance de l'ADNmt, une sensibilité cellulaire accrue à l'apoptose et une altération de la structure du réseau mitochondrial. Ce serait l'ensemble de ces altérations qui conduiraient au mécanisme de dégénérescence cellulaire. Néanmoins, nous avons observé que ces atteintes n'étaient pas communes à toutes les mutations *OPA1*, suggérant d'autres mécanismes physiopathologiques dans les atteintes liées à *OPA1*. De plus les altérations chez les patients sont moins drastiques et la pathologie souvent progressive. Un des mécanismes suggérés par les études serait une altération des voies autophagiques, un processus fréquent dans les maladies neurodégénératives communes telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

L'objectif de ma thèse était d'explorer deux pistes physiopathologiques de l'ADOA qui seraient en accord avec l'aspect progressif de la maladie. La première était d'étudier l'impact des mutations *OPA1* sur l'ADNmt, sachant que la protéine *OPA1* est impliquée dans l'ancrage des nucléoïdes à la membrane interne et que cette

membrane interne mitochondriale semble être le siège de la réplication de l'ADNmt. L'autre question adressée était de déterminer les conséquences des mutations *OPA1* sur la dégradation des mitochondries et les voies autophagiques.

Nos études sur les nucléoïdes ont montré que le nombre et la distribution des nucléoïdes étaient régulés par le réseau mitochondrial, qui est lui-même régulé par la taille du cytoplasme. Nous avons montré une baisse du nombre de nucléoïdes qui est corrélée à la baisse du volume mitochondrial constatée dans les lignées *OPA1*<sup>+/-</sup> et *OPA1*<sup>-/-</sup> présentant une fission sévère du réseau mitochondrial. Nos données montrent une augmentation du nombre de copies d'ADNmt par nucléoïde uniquement dans les modèles où la réticulation du réseau mitochondrial était impactée, donc uniquement dans les fibroblastes de patients DOA+ (Article 1).

Dans le deuxième volet de cette étude, nous avons étudié les voies autophagiques dans deux différents syndromes liés aux mutations d'*OPA1*. Cette partie de l'étude a également permis une caractérisation fonctionnelle des mitochondries dans le syndrome de Behr, sachant que très peu d'études ont été réalisées sur cette pathologie liée aux mutations d'*OPA1*. Nos données montrent une stimulation des voies autophagiques dans le DOA+ par l'altération de la structure du réseau mitochondrial et un défaut de couplage partiel des mitochondries. Aucune altération mitochondriale majeure n'a été observée dans le syndrome de Behr. Nous avons mis en évidence une altération majeure de la réponse autophagique, impliquant potentiellement ce mécanisme dans la sévérité de la pathologie (Article 2).

Une partie de ma thèse a été consacrée à l'étude bibliographique des acides lipophiliques faibles tels que le CCCP et le FCCP, des protonophores utilisés dans l'étude des fonctions mitochondriales, mais aussi récemment beaucoup utilisés dans l'induction et l'étude des voies mitophagiques et autophagiques. Cette étude bibliographique visait à mieux comprendre les mécanismes d'action de ces agents protonophores et étudier leurs cibles cellulaires et leurs cinétiques d'action.

Enfin la caractérisation de la physiopathologie de ces maladies nous a permis d'adopter une meilleure stratégie thérapeutique. Une altération commune des pathologies neurodégénérative est la fragmentation du réseau mitochondrial, une caractéristique retrouvée dans les fibroblastes de patients DOA+. L'approche thérapeutique mis en place était la stimulation de fusion mitochondriale en inhibant sélectivement une histone déacétylase HDAC6. Cette approche a déjà été mise en place avec succès dans d'autres pathologies neurodégénératives. L'inhibition des histones acétylases dans la littérature avec des inhibiteurs tels que la tubastatine A induit une hyperacétylation du cytosquelette et que cette réponse stimulait une élongation des mitochondries. Nos études montrent que la tubacine induit une élongation des mitochondries, stimule la biogénèse mitochondriale et corrige le défaut de couplage observé chez les patients DOA+. La tubacine apparait comme un agent pharmacologique prometteur dans le traitement des patients DOA+ (Article 4).

# *La liste des abréviations*

ADN mt: ADN mitochondrial

ADOA: atrophie optique autosomique dominante

AMPK: Adénosine MonoPhosphate-activated protein Kinase

ANT: adenine nucleotide translocase

BSA: bovine serum albumin

CaMK: Ca<sup>++</sup>/CalModulin-dependent protein Kinase

CCCP: carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone

CMT2A: Charcot-Marie-Tooth type 2A

COX: cytochrome c oxydase

Cyt c: Cytochrome c

DMEM: Dulbecco's modified Eagles medium

*DRP1*: dynamin-related protein 1

FAD: flavine adénine dinucléotide

FADH<sub>2</sub>: flavine adénine dinucléotide hydrogénée

FCCP: carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone

FIS1: Fission protein 1

HKII: hexokinase II

LHON: neuropathie optique héréditaire de Leber

MET: microscopie electronique à transmission

MEM: membrane externe mitochondriale

*MFN1, 2*: Mitofusine 1 et 2

MIM: membrane interne mitochondriale

NADH: nicotinamide-adénine dinucléotide hydrogéné

NRF: Nuclear Respiratory Factor

OH: origin of heavy strand mtDNA replication (Origine de replication du brin lourd)

OL: origin of light strand DNA replication

*OPA1*: optic atrophy 1

OXPHOS: phosphorylation oxydative

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

pb : paires de bases

PBS: phosphate buffered saline

PGC-1: Peroxisome proliferator-activated receptor Coactivator-1

PI: phosphate inorganique

PKA: Protéine Kinase A

PKB: Protéine Kinase B ou AKT

POLG: mitochondrial DNA polymerase gamma

PRC: PGC-1-Related Coactivator

RITOLS: ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand

ROS: espèces réactives de l'oxygène

SDH: succinate deshydrogénase

SDS: sodium-dodecyl-sulfate

SOD: superoxyde dismutase

TFAM: Transcription Factor A, Mitochondrial

TEMED: tetramethylethylenediamine

Tris: tris (hydroxyméthyl) aminométhane

UCP: uncoupling protein

VDAC: voltage-dependant anion channel

$\Delta\psi_m$ : potentiel de membrane mitochondrial

<i>LA LISTE DES ABBREVIATIONS</i> .....	<b>11</b>
<i>INTRODUCTION</i> .....	<b>18</b>
<b>LES MITOCHONDRIES</b> .....	<b>20</b>
STRUCTURE ET FONCTION .....	20
LA FONCTION ENERGETIQUE MITOCHONDRIALE .....	24
<i>La phosphorylation oxydative</i> .....	24
<b>LE GENOME MITOCHONDRIAL</b> .....	<b>37</b>
L'ADN MITOCHONDRIAL.....	37
LA MAINTENANCE DE L'ADNMT .....	39
<i>Les nucléotides:</i> .....	39
<i>La réplication de l'ADNmt</i> .....	41
<i>La régulation du nombre de copies d'ADN mitochondrial</i> .....	42
<b>DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE</b> .....	<b>48</b>
LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE .....	48
<i>La fission mitochondriale</i> .....	48
<i>La fusion mitochondriale</i> .....	54
<i>La fission sélective de la membrane interne mitochondriale</i> .....	60
ROLE DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE.....	61
<i>Relation structure-fonction énergétique</i> .....	61
<i>La Dynamique mitochondriale et le génome mitochondrial</i> .....	65
<i>Dynamique mitochondriale et transport mitochondrial</i> ..67C:\Users\mitolab\Desktop\These a imprimer\manuscrit final de thèse Selma KANE 1.docx - _Toc450819143	
<i>La Dynamique mitochondriale et le contrôle qualité des mitochondries</i> .....	69
<b>OPA1 ET DEGENERESCENCE</b> .....	<b>76</b>
OPA1 DANS LES PATHOLOGIES DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE.....	76
<i>L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA):</i> .....	76
<i>Le syndrome de Behr</i> .....	79
PHYSIOPATHOLOGIE DES PATHOLOGIES LIEES AUX MUTATIONS <i>OPA1</i> .....	80
<i>Haplo-insuffisance ou effet dominant-négatif?</i> .....	80
<i>Pourquoi les CGRs sont les premières cellules impactées dans les mutations OPA1?</i> .....	83
<i>L'hypothèse d'une sensibilité à l'apoptose</i> .....	84



<i>L'hypothèse d'un déficit énergétique</i> .....	84
<i>L'hypothèse du défaut de maintenance de l'ADNmt</i> .....	85
<i>Les autres hypothèses</i> .....	86
<b>PROBLEMATIQUES DE LA THESE</b> .....	<b>87</b>
<b><i>RESULTATS ET DISCUSSION</i></b> .....	<b>89</b>
LES MUTATIONS D' <i>OPA1</i> ET LE GENOME MITOCHONDRIAL .....	90
<i>Introduction</i> .....	93
<i>Résultats et discussion</i> .....	122
LA MITOPHAGIE ET L'AUTOPHAGIE DANS LES MUTATIONS D' <i>OPA1</i> .....	127
<i>Introduction</i> .....	129
<i>Résultats et Discussion</i> .....	152
REVUE CCCP .....	156
<i>Introduction</i> .....	158
<i>APPROCHE THERAPEUTIQUE DANS LES MUTATIONS D'OPA1</i> .....	191
<i>Introduction</i> .....	192
<i>Discussion</i> .....	211
<b><i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i></b> .....	<b>216</b>
L'IMPACT DES MUTATIONS <i>OPA1</i> SUR L'ADNMT .....	219
L'IMPACT DES MUTATIONS <i>OPA1</i> SUR LA REPONSE AUTOPHAGIQUE .....	221
L'IMPACT DE L'INHIBITION SELECTIVE DE HDAC6 SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES FIBROBLASTES <i>OPA1<sup>+/-</sup></i> .....	224
<b><i>FICHES TECHNIQUES</i></b> .....	<b>228</b>
FICHE TECHNIQUE N° 1 : CULTURE CELLULAIRE .....	229
FICHE TECHNIQUE N° 2 : DOSAGE DES PROTEINES PAR SPECTROPHOTOMETRIE .....	230
FICHE TECHNIQUE N° 4 : WESTERN BLOT .....	234
FICHE TECHNIQUE N° 5 : MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE SUR FIBROBLASTES EN CULTURE .....	237
FICHE TECHNIQUE N° 6: EXTRACTION DE L'ADN TOTAL .....	239
FICHE TECHNIQUE N° 7 : QUANTIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL .....	240
<b><i>AUTRES ACTIVITES</i></b> .....	<b>242</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b> .....	<b>246</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Morphologie des mitochondries selon les types cellulaires.

Figure 2: La chaîne de la phosphorylation oxydative (oxphos) dans les mitochondries de mammifères.

Figure 3: Régulation de la fonction et de la biogénèse mitochondriale.

Figure 4: La communication noyau-mitochondrie.

Figure 5: Le génome mitochondrial humain.

Figure 6 : Les modèles de réplication de l'ADNmt.

Figure 7: Les différentes structures des mitochondries.

Figure 8: Mécanisme de fission mitochondriale.

Figure 9: Les acteurs de la dynamique mitochondriale.

Figure 10: Domaines de la protéine de fusion mitochondriale humaine OPA1.

Figure 11: Représentation schématique de l'épissage d'*OPA1*.

Figure 12: Changement de la topologie la membrane interne mitochondriale associée à la transition orthodoxe à condensée.

Figure 14: Représentation schématique de l'autophagie et des acteurs de la formation des autophagosomes.

Figure 13: La machinerie de transport mitochondrial le long des axones.

Figure 15: Les différentes formes de mitophagie.

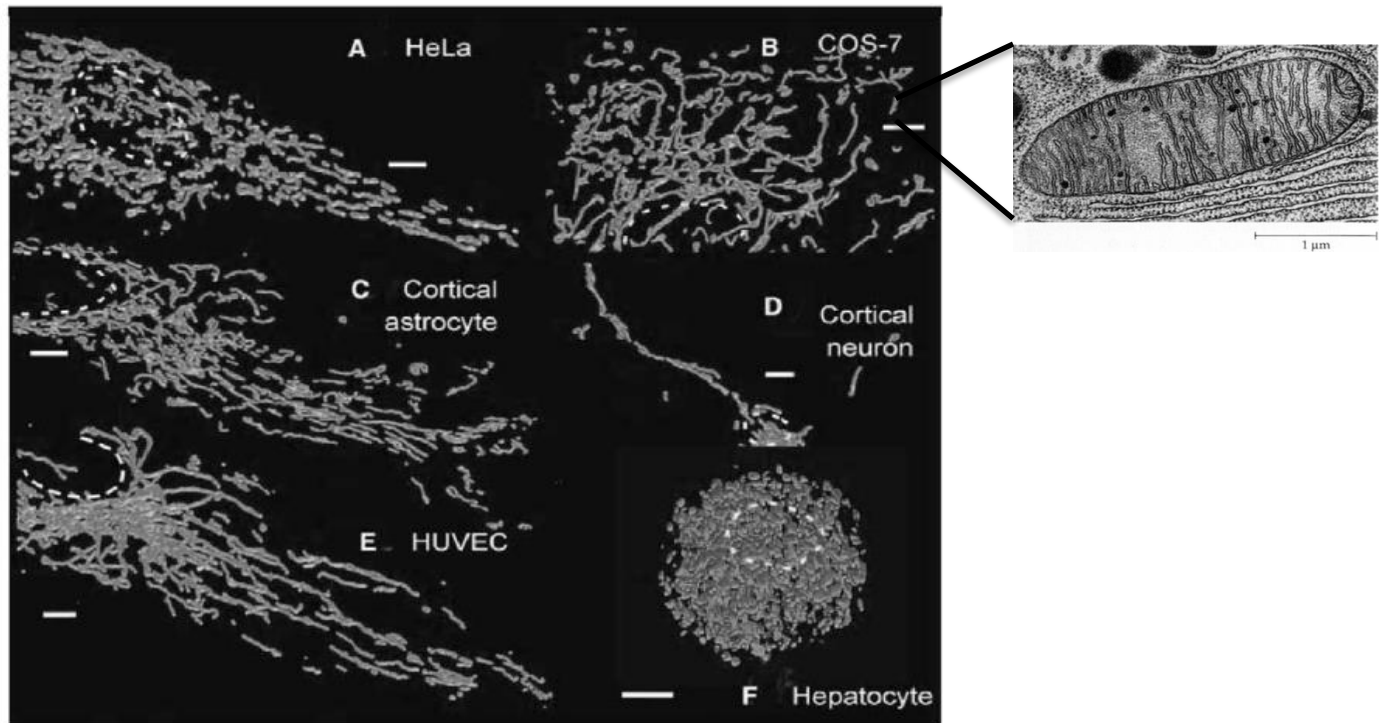
Figure 16: Les autres voies de contrôle-qualité des mitochondries.

Figure 17: Diagnostic ophtalmologique.

Figure 18: Distribution schématique des mitochondries dans les cellules ganglionnaires de la rétine.

Figure 19: Schéma synoptique de l'impact des mutations *OPA1* dans le DOA+.

# *Introduction*



**Figure 1: Morphologie des mitochondries selon les types cellulaires (Collins *et al*, 2002)**

(A-E) Reconstructions tri-dimensionnelle de la fluorescence de la protéine DsRed1 adressée à la mitochondrie Reconstruction tri-dimensionnelle de la fluorescence de la calcéine après imagerie confocale et déconvolution. (F) Une reconstitution de la fluorescence de la calcéine mitochondriale

## Les Mitochondries

### Structure et fonction

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes présents dans le cytosol de la plupart des cellules eucaryotes. Le mot mitochondrie vient du grec « mitos », fil et « chondrios », granule. L'architecture à double membrane des mitochondries a été révélée dans les années 1950 par des études de microscopie électronique (Palade 1953) (Figure 1). Ces organites ont une membrane externe et une membrane interne qui donnent naissance à deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice. La membrane interne, formant les crêtes, pénètre dans la matrice et abrite les complexes de la chaîne respiratoire. Dans les années 1980, des études de microscopie optique ont montré que les mitochondries sont des organites hautement dynamiques qui forment de grands réseaux interconnectés intracellulaires (Figure 1) (Bereiter-Hahn 1990). Dans de nombreux eucaryotes, les mitochondries se déplacent en continu le long du cytosquelette, fusionnent et se divisent. Ces activités concertées contrôlent la morphologie mitochondriale, la distribution intracellulaire et déterminent la fonction mitochondriale selon le type cellulaire (Osteryoung 2001; Y. Yoon and McNiven 2001). Les mitochondries ont un rôle central dans la conversion de l'énergie. Les mitochondries ne peuvent être générées *de novo*, mais se divisent à partir de mitochondries préexistantes. Ceci est réalisé dans un processus connu sous le nom de fission (Yisang Yoon et al. 2003). La dynamique mitochondriale permet à la cellule de répondre aux changements de conditions physiologiques. La fusion favorise la génération des mitochondries interconnectées, alors que la fission produit de nombreux fragments mitochondriaux.

La membrane externe mitochondriale (MEM) est perméable aux solutés ayant une masse moléculaire inférieure à 5,4 kDa. Elle contient un grand nombre de protéines transmembranaires appelées porines. Chez les eucaryotes ces protéines se trouvent principalement dans la membrane externe des mitochondries (Walther et al. 2009).

L'espace inter-membrane présente une composition proche de celle du cytosol, de par la perméabilité de la MEM.

La membrane interne mitochondriale (MIM) est beaucoup moins perméable que la MEM. Les protéines localisées à la MIM participent aux réactions de la chaîne respiratoire, à la synthèse d'ATP, aux échanges de petits métabolites et d'ions métalliques, à l'import des acides aminés, des hydrates de carbone, des nucléotides, et des protéines. La MIM contient la nucléotide adénine translocase ANT qui est responsable du transport de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane. La MIM est également le site de translocases de protéines, TIM23, TIM22 et Oxa1p (Neupert and Herrmann 2007). Ces translocases participent à l'import de l'essentiel des composants des mitochondries dont les sous-unités de la chaîne respiratoire qui sont codées par le génome nucléaire.

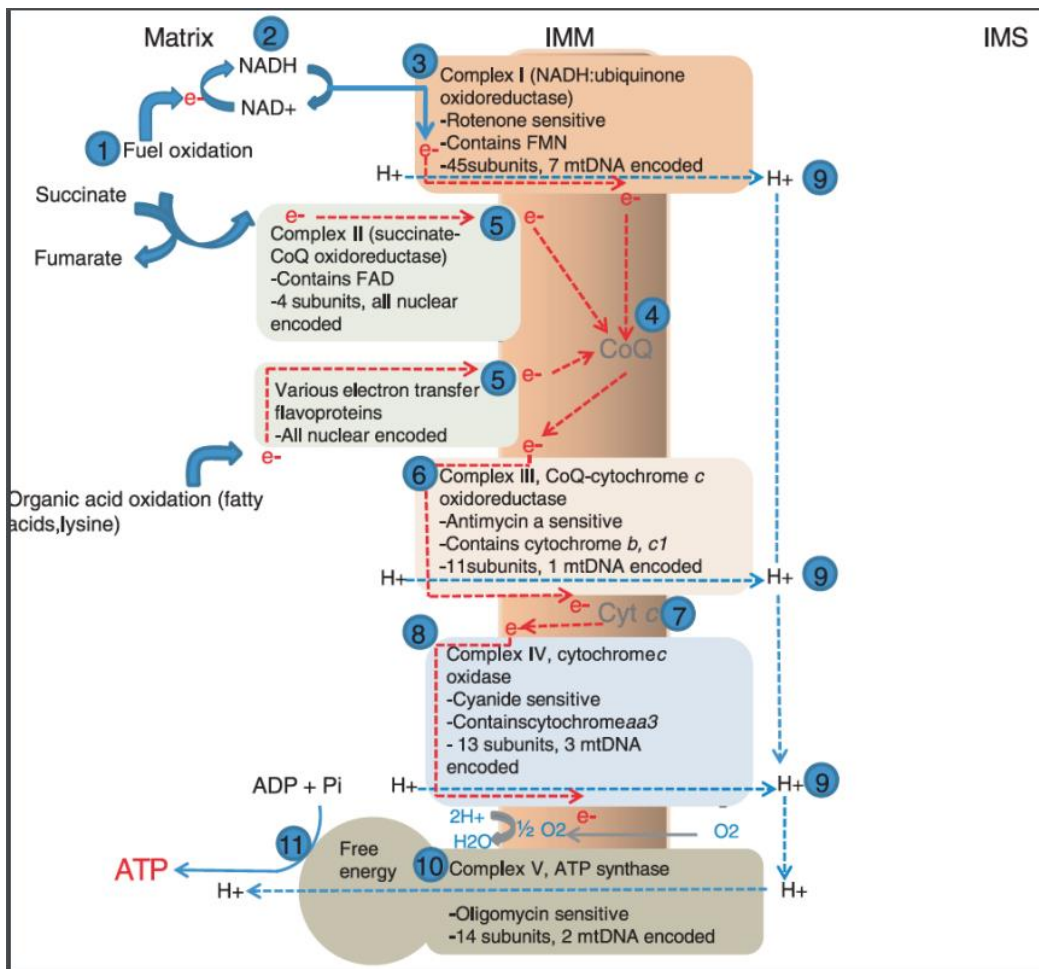
La matrice est l'espace délimité par la MIM. La matrice contient un ensemble d'enzymes, de copies d'ADN mitochondrial et de facteurs impliqués dans l'expression du génome mitochondrial tels que les ribosomes et les ARNt mitochondriaux. De nombreux processus métaboliques comme la génération de l'ATP, le cycle de Krebs et l'oxydation des acides gras se produisent dans la matrice. La diversité et la complexité des sous-compartiments mitochondriaux reflètent leurs fonctions hautement spécialisées.

Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale produisent un gradient protons de part et d'autre de la MIM de l'oxydation des substrats énergétiques et ces pompes à protons de la MIM génèrent un potentiel de membrane ( $\Delta\psi_m$ ). Le gradient de proton est ensuite utilisé pour la synthèse mitochondriale d'ATP qui produit la plus grande partie de l'ATP cellulaire essentiel pour de nombreux processus cellulaires, le métabolisme, la signalisation, la mort cellulaire programmée et les voies métaboliques impliquant les lipides, les acides aminés, et le cycle de l'hème.

Le rôle des mitochondries dans l'activation de l'apoptose passe chez les mammifères par les membres de la famille Bcl-2 qui régulent la libération de protéines pro-

apoptotiques tels que le cytochrome *c*. Une fois dans le cytosol, ces protéines activent des cystéine-protéases appelées caspases qui sont essentiels au déroulement de l'apoptose (C. Wang et Youle 2009).

Différents paramètres peuvent être utilisés comme indicateurs de la fonction mitochondriale : l'état redox des cytochromes mitochondriaux, les niveaux d'ATP cellulaire, la production de ROS, le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) et la consommation d'oxygène. Néanmoins, le paramètre le plus informatif reste la consommation d'oxygène car elle reflète l'état de la chaîne respiratoire et le transfert d'électrons (Will et al. 2006).



**Figure 2: La chaîne de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) dans les mitochondries de mammifères (Koene et Smeitink, 2009)**

Les électrons (e-) à partir des oxydations du carbone (étape 1 et les lignes en pointillés) sont transférés par l'intermédiaire du NADH (étape 2) dans le complexe I (étape 3), qui est dans la membrane mitochondriale interne (IMM), puis transportés vers la coenzyme Q (CoQ) (étape 4). Les électrons provenant de l'oxydation des acides organiques sont transférés, par l'intermédiaire d'un autre complexe contenant de la flavine (étape 5), directement à la CoQ. Le CoQ délivre des électrons par l'intermédiaire du complexe III (étape 6) et le cytochrome c (Cyt c) à l'accepteur terminal d'électrons, le complexe IV (étape 8). A cette étape l'oxygène est réduit en eau. Les électrons perdent de l'énergie libre à chaque étape de transfert, et dans les complexes I, III et IV. L'énergie est exploitée et couplée au mouvement des protons H+ (étape 9 et les lignes en pointillés) à partir de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (IMS). Le gradient de proton ainsi généré est utilisé pour la production d'ATP par le complexe V (étape 10). À l'exception des complexes II, tous les complexes contiennent des protéines codées par le génome mitochondrial et d'autres codées par le génome nucléaire.



## La fonction énergétique mitochondriale

### La phosphorylation oxydative

La conversion d'énergie s'effectue au sein des mitochondries par l'utilisation d'un gradient électrochimique transmembranaire exploité pour synthétiser des molécules d'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) (Mitchell 1976). La chaîne respiratoire mitochondriale se compose de quatre complexes enzymatiques transmembranaires (I - IV) et l'ATP synthase-foF1, forme un cinquième complexe (Figure 2). Chaque complexe OXPHOS est constitué de multiples sous-unités qui sont codées par les deux génomes mitochondriaux et nucléaires, à l'exception du complexe II, qui est codé exclusivement par le génome nucléaire. Le coenzyme Q10 et le cytochrome *c* jouent également des rôles distincts dans la phosphorylation oxydative, agissant comme transporteurs d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire.

Pendant la phosphorylation oxydative, le NADH et le FADH<sub>2</sub> apportent les électrons aux complexes I et II respectivement. Ces électrons sont transférés le long des complexes de la chaîne respiratoire; l'énergie libérée est utilisée pour pomper des protons (H<sup>+</sup>) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, plus particulièrement dans les poches créées par les crêtes. Ce gradient de proton électrochimique est ensuite utilisé par le complexe V pour générer de l'ATP à partir d'ADP et Pi.

### *Composition du système de phosphorylation oxydative*

Plus de quatre-vingts protéines différentes parmi lesquelles seules treize sont codées par l'ADN mitochondrial composent le système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) : les complexes I à IV qui composent la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Ces complexes sont eux-mêmes organisés en super-complexes ou respirasomes. Ces unités fonctionnelles ont été révélées par des expériences de co-immunoprécipitation et d'électrophorèse sur gel en condition native (Hermann Schagger and Pfeiffer 2000a). Les supercomplexes peuvent résulter de la

coexistence des complexes I + III + CIV. Ainsi les supercomplexes I+III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>, I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> ont été décrits dans différents organismes dont *Arabidopsis thaliana* où la première identification des supercomplexes a été réalisée (Dudkina et al. 2005; Hermann Schägger and Pfeiffer 2000b; Cruciat et al. 2000). L'association des complexes II en supercomplexe reste controversée (Acín-Pérez et al. 2008; Moreno-Lastres et al. 2012). Le complexe V existe en dimère et cette conformation a été décrite pour la première fois chez la levure (Arnold et al. 1998). Cet assemblage comporte trois sous-unités spécifiques, les sous-unités e, g et k. L'assemblage de l'ATP-synthase en dimère est essentiel à la structuration des crêtes mitochondriales (Giraud et al. 2002; Dautant, Velours, and Giraud 2010). Deux sous-unités sont impliquées dans cette organisation supramoléculaire, les sous-unités e et g. Les délétions des gènes codant pour ces sous-unités n'ont pas d'effet sur l'ensemble des monomères d'ATP synthase ou de l'activité de cette enzyme, cependant la dimérisation et l'oligomérisation sont affectées (Johann Habersetzer et al. 2013). Chez le mammifère l'absence de dimérisation de l'ATP synthase a des conséquences fonctionnelles sur la chaîne respiratoire conduisant à une diminution de l'activité OXPHOS. Enfin, ces altérations structurales et fonctionnelles de l'ATP synthase ont un fort impact sur la mitochondrie, conduisant à la fission du réseau mitochondrial et la désorganisation ultrastructurale des crêtes (Johan Habersetzer et al. 2013).

L'association des complexes de la chaîne respiratoire en supercomplexes offrent des avantages structurels et fonctionnels, tels que la prévention de leur déstabilisation et leur dégradation, une amélioration de l'efficacité du transport des électrons et des substrats. L'implication des supercomplexes dans la diminution des fuites d'électrons ou de protons a également été suggérée (Lenaz et Genova 2009).

**Complexe I ou NADH ubiquinone oxydoréductase:** Le complexe I est le principal point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, ceci étant couplé à la translocation de quatre protons à travers la membrane interne mitochondriale. Le complexe I est

constitué de quarante-six sous-unités dont sept sont codées par l'ADNmt (gènes ND1-ND6 et ND4L), le reste des sous-unités étant codé par des gènes nucléaires. Le complexe I est composé d'un bras hydrophobe enchâssé dans la membrane interne mitochondriale contenant notamment les sous-unités codées par l'ADNmt, qui constituent le site catalytique de l'enzyme, et d'un bras périphérique hydrophile orienté dans la matrice. Cette structure engendre trois modules fonctionnels: le module déshydrogénase responsable de l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>, le module hydrogénase, responsable du transfert d'électrons à l'ubiquinone et le module de translocation des protons constituant la majeure partie du bras membranaire ((Fernández-Vizarra, Tiranti, et Zeviani 2009). Les déficits du complexe I sont responsables de plusieurs pathologies mitochondriales, telles que le syndrome de Leigh (OMIM #256000), le LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy ; OMIM #535000) ou de MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes ; OMIM #540000). Ces pathologies sont associées pour la plupart à une production de ROS assez importante, certainement due au rôle important du complexe I dans la génération et la détoxification des ROS.

**Complexe II ou succinate ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase:** Ce complexe est un deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il transfère des électrons du succinate à l'ubiquinone connectant ainsi directement le cycle de Krebs à la chaîne respiratoire. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à la translocation de protons. Le complexe II est constitué de quatre sous-unités (A à D). Ce complexe contrairement aux autres complexes de la chaîne respiratoire est codé uniquement par le génome nucléaire. Les mutations sur le complexe II ont été associées à des encéphalopathies mitochondriales (OMIM # 252011) et des processus tumoraux (OMIM # 168000).

**Complexe III: ubiquinol cytochrome c oxydoréductase ou complexe cytochrome bc1:** Ce complexe présent sous forme de dimère transfère les électrons de l'ubiquinone réduite (ou ubiquinol) au cytochrome c. Ce transfert est couplé à la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire. Chez les mammifères, chaque monomère est composé de onze sous-unités structurales

différentes (H. Schägger et al. 1986). Trois sous-unités contiennent les centres métalliques responsables du transfert d'électrons : le cytochrome *b*, le cytochrome *c1* et la protéine Rieske Fe-S. Les présentations cliniques des déficits en complexe III sont principalement des intolérances à l'effort.

**Complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX) :** Le complexe IV composé de treize sous-unités différentes catalyse le transfert d'électrons du cytochrome *c* à l'oxygène. Parmi ces treize sous-unités, les trois codées par l'ADNmt sont impliquées dans le transfert des électrons (COXI et II) et le pompage des protons, tandis que les sous-unités restantes sont codées par le génome nucléaire et seraient impliquées dans la stabilisation du complexe. Les déficits du complexe IV sont cliniquement hétérogènes, avec une présentation clinique allant de myopathie isolée à des maladies multi-systémiques sévères (OMIM #220110).

**ATP synthase :** L'ATP synthase synthétise l'ATP en utilisant la force protomotrice ( $\Delta p$ ) à travers la membrane interne de la mitochondrie. Cependant, en l'absence de gradient de protons, l'ATP synthase est capable d'hydrolyser l'ATP matriciel et pomper les protons hors de la matrice, c'est le fonctionnement reverse. L'ATP synthase est un complexe composé de plusieurs sous-unités qui constituent deux domaines fonctionnels : un domaine hydrophobe membranaire F<sub>0</sub> et un domaine catalytique hydrophile. Seules deux sous-unités sont codées par le génome mitochondrial, l'ATPase 6 et l'ATPase 8. Des mutations des sous-unités de l'ATP synthase, qu'elles soient d'origine génétique nucléaire ou mitochondrial, conduisent à des pathologies du système neuromusculaire qui se manifestent principalement chez les enfants, très souvent, peu de temps après la naissance (Houstek et al. 2006; Kucharczyk et al. 2009).

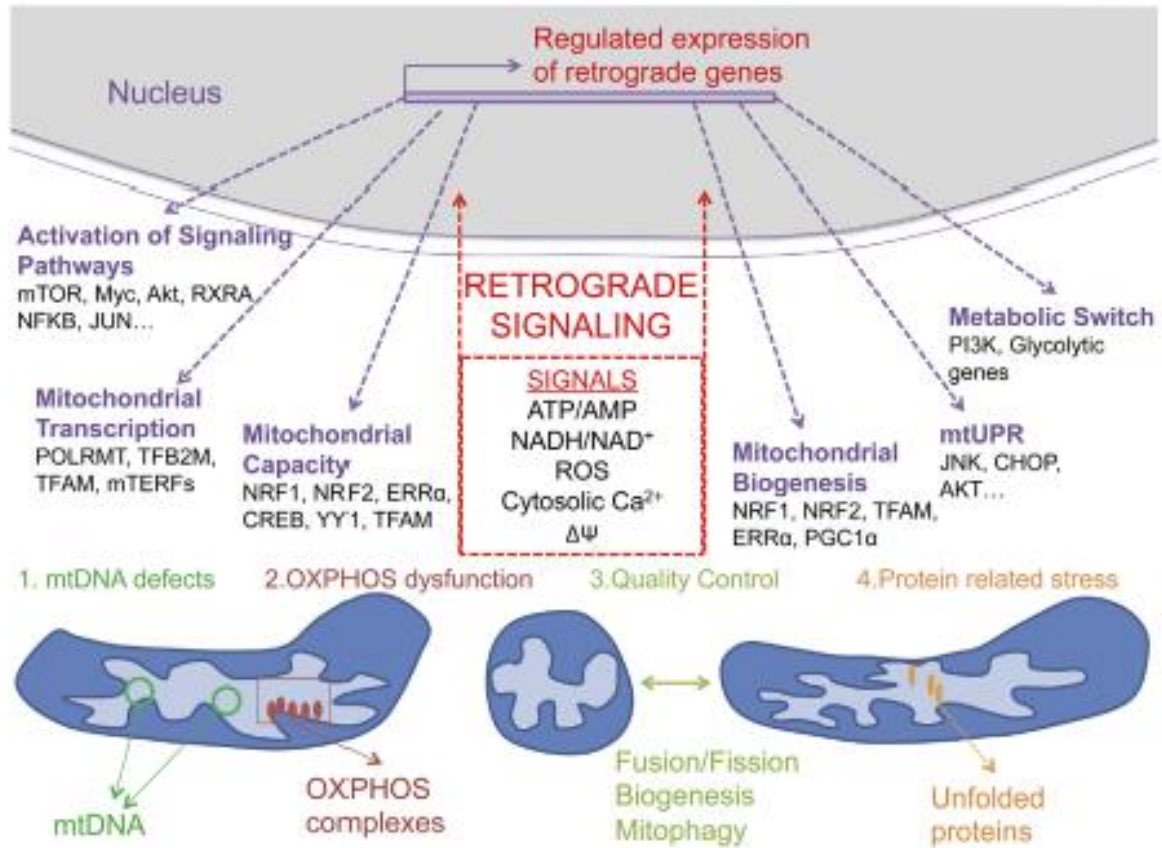


### *Régulation de la phosphorylation oxydative et de l'efficacité bioénergétique*

Régulation transcriptionnelle: L'expression des gènes mitochondriaux nécessite une communication entre le noyau et la mitochondrie. PGC-1 $\alpha$  régule directement et indirectement l'expression de gènes mitochondriaux codés par le génome nucléaire, et parmi ceux-ci, certains régulent l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (Brenmoehl and Hoeflich 2013) (Figure 3). PGC-1 $\alpha$  participe à la régulation de la phosphorylation oxydative en contrôlant l'expression des facteurs nucléaires respiratoires 1 et 2 (NRF1 et NRF2), des facteurs de transcription impliqués dans l'expression du facteur de transcription mitochondriale A (TFAM). La surexpression de PGC-1 $\alpha$  conduit à une régulation positive de 151 gènes qui codent pour des protéines mitochondriales impliquées dans de nombreuses fonctions métaboliques des mitochondries tels que la  $\beta$ -oxydation des acides gras, le cycle de l'acide tricarboxylique et de la phosphorylation oxydative, ainsi que de la machinerie ribosomale mitochondriale et le transport membranaire mitochondriale des protéines (Stotland et Gottlieb 2015).

PGC-1 $\alpha$  est activée par la voie de la calcineurine A et celle de la CaMKII (Handschin et al. 2003). La voie PGC-1 $\alpha$  est donc modulée par les variations du calcium Ca $^{2+}$  intracellulaire. D'autres études ont montré que PGC1 $\alpha$  pouvait être modulé par d'autres facteurs tels que la MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) pendant l'effort physique (Akimoto et al. 2005) et l'AMPK (AMP-dependent Kinase) et la voie AKT pendant la privation en nutriments (M. Zhong, Lu, and Foster 2002). La voie PGC-1 $\alpha$  est donc également sensible aux taux ATP/ADP cellulaire. L'activité de PGC-1 $\alpha$  est également modulée par la déacétylation catalysée par Sirt1. Cette déacétylation entraîne une augmentation de l'activité de PGC-1 $\alpha$  et donc une activation de la transcription de ses cibles. Toutes ces voies et acteurs très sensibles aux variations des besoins énergétiques de la cellule, et donc toute variation des rapports NAD $^{+}$ /NADH par exemple vont activer les voies de PGC1- $\alpha$ , dont NRF2 (Houtkooper et al. 2010)(Jäger et al. 2007; Cantó et al. 2009). D'autres co-activateurs de PGC-1 $\alpha$  tels que PRC (PGC1-related-coactivator) peuvent également activer les NRF1 et NRF2 (Andersson and Scarpulla 2001) (Figure 3).





**Figure 4: La communication noyau-mitochondrie (Cagin et Enriquez, 2015)**

Vue d'ensemble de la signalisation rétrograde. Les dysfonctionnements mitochondriaux conduisent à la génération d'au moins cinq types de signaux: ATP / AMP, NADH / NAD<sup>+</sup>, ROS, Ca<sup>2+</sup> cytosolique, la réduction du potentiel de membrane. L'activation des signaux rétrogrades (flèches rouges) provoque des changements dans l'expression des gènes nucléaires qui favorisent diverses réponses représentées par des flèches violettes

La phosphorylation et l'acétylation sont des modifications pos-traductionnelles qui peuvent réguler les voies de production du NADH et FADH<sub>2</sub> et le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire. En effet il a été montré que l'activité du complexe I et celle du complexe IV était régulé par phosphorylation (Scacco et al. 2000). Une mutation dans la sous-unité NDUF54 par exemple est corrélée à une baisse de la phosphorylation et donc une diminution de l'activité et de la respiration liée au complexe I (Iuso et al. 2006).

L'acétylation reste un des régulateurs clé de la fonction mitochondriale. Cette acétylation est majoritairement médiée par la déacétylase mitochondriale SIRT3. Une étude récente a identifiée plus de 400 sites d'acétylation potentiels dans une souris déplétée du gène *SIRT3* (Sol et al. 2012). Ces sites étaient identifiés dans des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS), la métabolisation des acides gras et la dégradation des acides aminés (Hirschev et al. 2011; Ahn et al. 2008; Lombard et al. 2007; Schwer et al. 2006). Outre la déacétylase mitochondriale SIRT3, une autre déacétylase SIRT1 est également impliquée dans la régulation de la fonction et la biogénèse mitochondriale. L'acétylation de même que la phosphorylation régule la fonction énergétique mitochondriale par des mécanismes de senseur de la variation des rapports AMP/ATP et NAD/NAD<sup>+</sup> (Figure 4). En Concert avec AMPK, SIRT1 est capable de réguler l'activité transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  de par sa capacité à lier directement PGC-1 $\alpha$  et le déacétyler (L. Zhong and Mostoslavsky 2011; Nemoto, Fergusson, and Finkel 2005). L'expression de SIRT3 est également essentielle à la biogénèse et l'expression de gènes de la fonction mitochondriale. L'inhibition de SIRT3 conduit à une baisse de la biogénèse mitochondriale certainement médiée par l'inhibition des cibles de PGC-1 $\alpha$ , NRF1 et NRF2 (Kong et al. 2010a). SIRT3 contrôle directement la production d'ATP en activant les complexes de la chaîne respiratoire par déacétylation. La déplétion de SIRT3 dans un modèle de souris conduit à 50% de réduction de la production d'ATP (Ahn et al. 2008).



**Respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP:** Les phosphorylations oxydatives assurent la production d'ATP à partir de l'oxygène et des nutriments. Le catabolisme de ces nutriments conduit à la réduction de coenzymes (NAD<sup>+</sup> et FAD). Les équivalents réduits, le NADH et FADH<sub>2</sub>, tous deux produits lors de différentes voies cataboliques dont la glycolyse, le cycle de Krebs, sont fournis à la chaîne d'oxydoréduction constituée de quatre complexes et de deux transporteurs d'électrons, l'ubiquinone et le cytochrome c. Ces coenzymes réduits sont alors réoxydés par le transfert de leurs électrons le long de cette chaîne vers un accepteur final, l'O<sub>2</sub>. Ce transfert d'électrons repose sur une série de réactions d'oxydoréductions au niveau de la chaîne respiratoire. Ce transfert est essentiel, car le NADH et le FADH<sub>2</sub> sont riches en énergie et seraient incapables de réagir d'emblée avec l'oxygène. Le transfert progressif permet donc la libération des électrons de sorte que seuls les électrons de basse énergie réagissent avec l'oxygène. Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce mouvement de protons crée un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) et engendre un potentiel de membrane ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) au travers de la membrane interne. La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique de protons, la force proton-motrice, qui permet le retour des protons dans la matrice au travers du complexe F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase. La théorie chimio-osmotique émise par Mitchell repose sur ce couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP par la force proton-motrice (Mitchell 1961).

**Contrôle de la respiration mitochondriale :** En réponse à la demande d'énergie et en fonction de la disponibilité en substrat, l'organisme s'adapte en ajustant à la fois sa capacité et/ou l'efficacité de production d'ATP. L'efficacité bioénergétique mitochondriale est définie comme étant le nombre d'ATP produit dans les mitochondries par molécule de substrats utilisés ou d'oxygène consommé. La capacité de synthèse mitochondriale d'ATP est définie comme étant la vitesse à laquelle l'ATP est produite par unité de temps. Ces changements d'efficacité bioénergétique et de capacité de synthèse d'ATP mitochondriale sont dépendants de

la réorganisation des surpercomplexes et du remodelage mitochondrial (voir dynamique mitochondriale et métabolisme énergétique). Néanmoins d'autres facteurs régulent la respiration mitochondriale. Un des premiers facteurs est le taux d'ADP disponible. La respiration des mitochondries isolées est stimulée en présence d'ADP puis diminue au fur et à mesure de la conversion de l'ADP en ATP. La dépendance de la vitesse de consommation d'oxygène du ratio ATP/ADP est connue sous le terme de contrôle respiratoire. D'autres ratios tels que le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et la consommation d'oxygène vont également moduler la respiration mitochondriale.

**La régulation de l'efficacité de la synthèse d'ATP:** La synthèse d'ATP résulte du couplage entre la respiration et la phosphorylation mitochondriale par la force proton-motrice (Mitchell, 1961). Néanmoins, ce système n'est pas totalement hermétique. Tous les protons ne passent pas par l'ATP-synthase pour la formation d'ATP. Dans ce cas, on parle de découplage de la chaîne oxydative. Le niveau de découplage reflète l'efficacité bioénergétique. Ce découplage dépend de plusieurs facteurs :

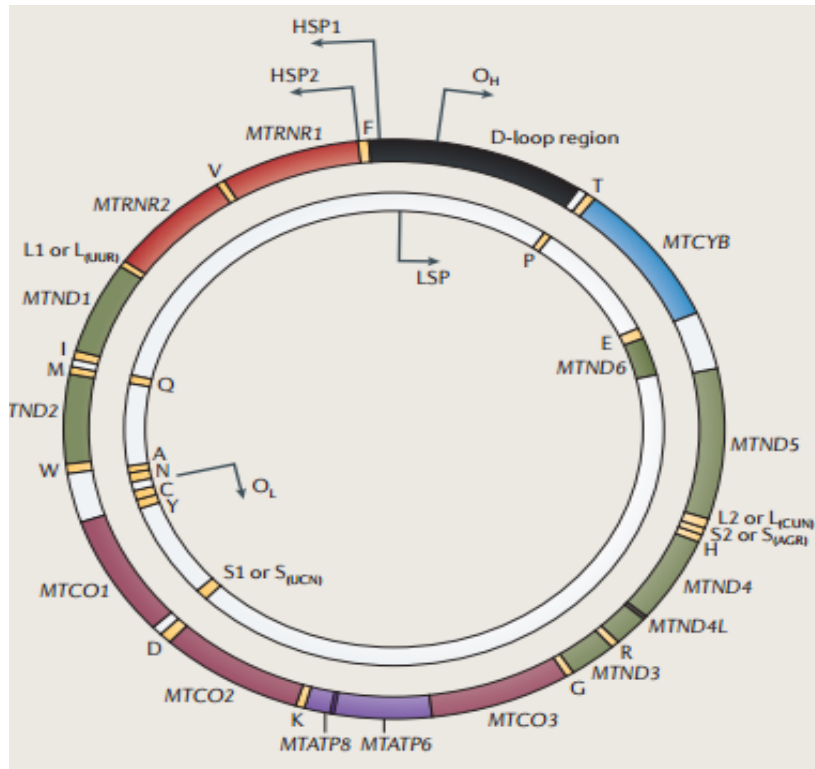
- La perméabilité des membranes aux protons et la présence de protéines découplantes (UCPs et ANT)
- L'efficacité des pompes à protons

On distingue donc le découplage intrinsèque et le découplage extrinsèque. Le découplage extrinsèque implique tous les mécanismes qui provoquent une dissipation du gradient de protons en augmentant la perméabilité de la membrane interne aux protons ou aux cations. Le découplage intrinsèque aussi connu sous le terme de « slipping » entraîne une diminution de l'efficacité des pompes à protons, c'est-à-dire une diminution de la stœchiométrie proton/électron (H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>) ou une augmentation de la stœchiométrie protons/ATP (H<sup>+</sup>/ATP).

La fuite des protons par exemple est due à une perméabilité accrue de la membrane aux protons permettant une dissipation du gradient de protons,  $\Delta P$ . Ainsi pour maintenir la force proton-motrice, l'activité de la chaîne respiratoire dans son

ensemble est activée et la consommation d'oxygène est alors très élevée, comme c'est le cas avec l'utilisation d'agents protonophores, qui dissipent le  $\Delta P$ . Cette fuite de protons est observable à l'état basal, et est plus ou moins importante selon le type cellulaire. Cette fuite de protons a un rôle dans la physiologie des cellules car elle représente environ 16-31% de la respiration mitochondriale (Rolfe and Brand 1996). Il existe deux types de fuite de protons : la fuite basale des protons et la fuite induite des protons qui fait intervenir les protéines découplantes (UCPs) et les translocateurs (ANTs). Plusieurs pathologies humaines ou le vieillissement sont caractérisés par une hausse de la fuite de protons. Le rôle de cette fuite reste encore mal-connu. Plusieurs études s'accordent sur un effet protecteur d'un découplage partiel (Skulachev 1997). En effet, une surexpression des UCPs a été observée dans les lésions cérébrales traumatiques, suite à une ischémie ou dans certains modèles de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. Cette surexpression participerait à une neuro-protection et une meilleure survie cellulaire (Sullivan et al. 2004; Pandya, Pauly, and Sullivan 2009; Mattiasson et al. 2003). De nombreuses études impliquent les UCPs dans la régulation de la production de ROS. L'augmentation du  $\Delta\Psi_m$ , de même que la déplétion des UCPs sont corrélées à une production de ROS accrue (Kadenbach 2003; Ježek et al. 2014). Le découplage partiel en entraînant une faible diminution du potentiel de membrane mitochondrial diminue fortement la production de ROS sans affecter la production énergétique (Skulachev 1997). Cette modulation du  $\Delta\Psi_m$  permet de diminuer la probabilité d'un transfert inverse des électrons du complexe II au complexe I. Ce type de transfert inverse survient lors d'une augmentation du  $\Delta\Psi_m$  et augmente la production de ROS dans divers tissus (Turrens 2003). Les taux respiratoires plus élevés augmentent la consommation d'oxygène, entraînant ainsi une diminution des tensions d'oxygène dans le microenvironnement mitochondrial, empêchant de ce fait la production d'anions superoxydes (Kitahara, Li-Korotky, et Balaban 2005). Le deuxième effet sur la production de ROS serait par le biais d'un maintien des intermédiaires de transport d'électrons, en particulier les complexes I et III, à des états plus oxydés ne peuvent pas faire don d'un électron à l'oxygène. Enfin, la

production de ROS est également régulée par une modulation de la disponibilité en NAD<sup>+</sup> par les taux de respiration (Starkov et al. 2004; Caldeira da Silva et al. 2008).



**Figure 5: Le génome mitochondrial humain (Stewart et Chinnery, 2015)**

Le génome ADN mitochondrial humain (ADNmt) comprend 16,569 paires de bases, qui forment un (L) brin «léger» intérieur et un (H) brin «lourd» externe (les noms reflètent la teneur en guanine brin, ce qui affecte le poids moléculaire). Les gènes codant pour les sous-unités ADNmt structurelles de la chaîne respiratoire mitochondriale comprennent: NADH déshydrogénase 1 (MTND1) -MTND6 et MTND4L (complexe I), cytochrome b (MTCYB; complexe III), cytochrome c oxydase I (MTCO1) -MTCO3 (Complexe IV), l'ATP synthase 6 (MT ATP6) et l'ATP8 (complexe V). L'ADNmt code aussi pour 22 ARNt et 2 ARNr.

## Le génome mitochondrial

### L'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des structures d'origine procaryote établies au sein des cellules eucaryotes (Dayhoff and Schwartz 1981). Cette origine endosymbiotique explique le fait que les mitochondries contiennent leur propre matériel génétique l'ADN mitochondrial, ADNmt dont la transmission est maternelle. Ce génome est sous forme d'un ADN bicaténaire circulaire composé de 16 569 paires de bases (pb) (Figure 5) (Kogelnik et al. 1996).

Cet ADNmt contient les gènes qui codent pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire, ainsi que les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt) essentiels pour la synthèse des protéines mitochondriales (Bonawitz, Clayton, and Shadel 2006; Scarpulla 2008). L'ADNmt comporte une région non-codante, la D-Loop, qui comprend les éléments régulateurs de la transcription et de la traduction et ne comporte pas d'intron (Shadel et Clayton 1997). Le maintien de l'intégrité de l'ADNmt dépend du génome nucléaire qui code pour des protéines essentielles à la structure et à la fonction du génome mitochondrial (Wallace 2005) (Thèse en ligne Marc Ferré).

L'ADNmt est présent par centaines de copies par cellule et est organisé en complexes nucléoprotéiques appelés nucléoïdes distribués dans le réseau mitochondrial (Iborra, Kimura, and Cook 2004; D. F. Bogenhagen, Rousseau, and Burke 2008; Legros et al. 2004). Les études suggèrent que les nucléoïdes sont organisés de manière à faciliter la maintenance, la transcription, la traduction et la biogenèse dans son environnement immédiat. Cela constitue également la base de l'hypothèse selon laquelle chaque nucléoïde a une sphère d'influence limitée qui pourrait entraîner une carence en sous-unités OXPHOS mitochondriales locale si cette région mitochondriale contient de l'ADNmt muté (Kowald et Kirkwood 2011). Ce confinement du nucléoïde est un sujet essentiel dans la compréhension de la physiopathologie de nombreuses maladies impliquant les défauts de maintenance de l'ADNmt.

Les dommages de l'ADNmt, de même que l'ADN nucléaire peuvent avoir un impact sur la principale source de production d'énergie cellulaire. Les mutations de l'ADNmt sont la cause de nombreuses maladies telles que le LHON, le MELAS, ou encore le Syndrome de Kearns-Sayre (Wallace, Fan, et Procaccio 2010), tandis que des mutations du génome nucléaire peuvent aboutir à des syndromes multisystémiques telles que la maladie de Charcot Marie Tooth2A (CMT2A), ou les neuropathies optiques (Delettre et al. 2000; Cassereau et al. 2009). Une mutation pathogène de l'ADNmt ne conduit pas forcément aux phénotypes cliniques. En effet, l'ADNmt existe en de nombreuses copies par mitochondrie et donc par cellule. Ces copies peuvent être aussi différentes les unes des autres, un état qui est connu sous le terme d'hétéroplasmie. De par cette coexistence, une mutation de l'ADNmt peut rester silencieuse jusqu'à ce que le seuil de tolérance soit dépassé, c'est le shift d'hétéroplasmie. Dans le cas du MELAS qui est dû majoritairement à une mutation en position 3243 de l'ADNmt, le phénotype pathologique se met en place à partir d'un seuil d'environ 70% de copies mutantes.

Les dommages de l'ADN mitochondrial provoquent des maladies rares et leur accumulation conditionnerait le processus de vieillissement. En effet, plusieurs études ont montré que les délétions multiples de l'ADNmt s'accumulent avec l'âge (Busch, Kowald, et Spelbrink 2014). Les premières études réalisées sur du tissu musculaire, montraient une accumulation des délétions. Les études récentes sur cellule unique confirment ce mécanisme d'hétéroplasmie, avec des cellules contenant ne que des molécules d'ADN de type sauvage alors que d'autres ne contiennent que des mutants. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'expansion clonale des mutations dans les cellules avec l'âge (Ian J. Holt, Speijer, and Kirkwood 2014). L'ADNmt est plus instable que l'ADN nucléaire, soit à l'échelle des individus par l'accumulation de délétions dans les tissu-post-mitotiques lors du vieillissement, soit à l'échelle des générations. En effet une étude portant sur 3000 sangs de cordons à la naissance a montré qu'un individu sur 200 portait, en général avec un faible taux d'hétéroplasmie, une mutation pathogène de l'ADNmt (Elliott et al. 2008). Cependant, un processus actif lors de l'ovogenèse

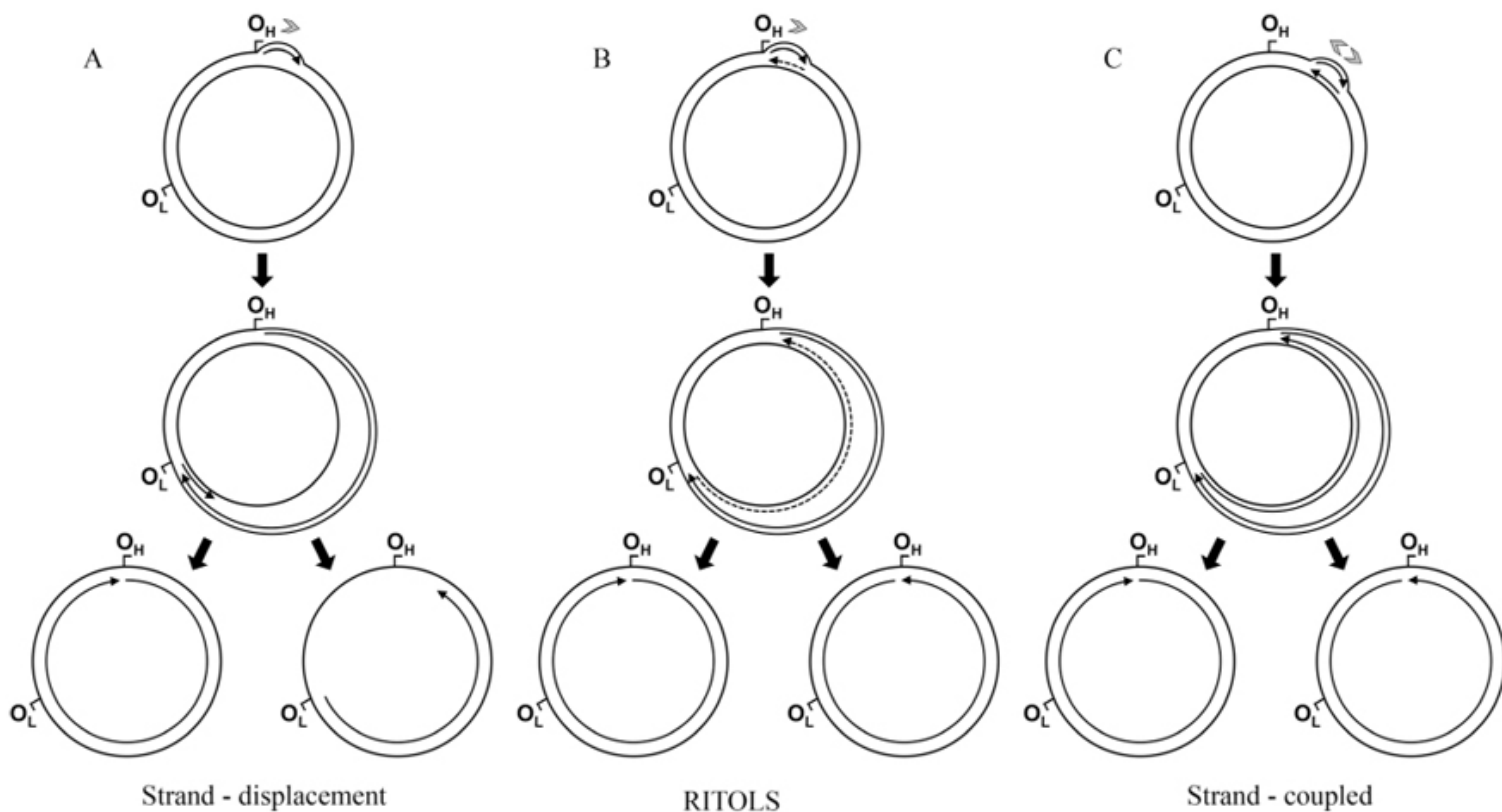
permet de limiter l'expansion des mutations pathogènes et de rendre les ovocytes homoplasmiques, selon la théorie dite de la bottleneck (H.-S. Lee et al. 2012). Les études les plus récentes en séquençage à haut débit montrent que les cellules présentent tout de même souvent de faibles taux d'hétéroplasmies (Mishra and Chan 2014a).

La première hypothèse serait que les mitochondries endommagées génèrent plus de radicaux libres de l'oxygène (ROS) et que ces derniers provoqueraient, à leur tour plus de dommages à l'ADN mitochondrial (Bandy et Davison 1990). La deuxième hypothèse repose sur une dérégulation des machineries répliquatives et d'élimination des molécules d'ADNmt mutées favorisant de ce fait l'expansion clonale des copies mutées (Chinnery et Samuels 1999). L'hypothèse serait que les mitochondries altérées sont dégradées par mitophagie, contribuant ainsi à conserver l'intégrité du génome mitochondrial (Mishra and Chan 2014a).

## La maintenance de l'ADNmt

**Les nucléoïdes:** L'ADNmt dans les mitochondries est organisé en structures compactes appelées nucléoïdes. Les nucléoïdes peuvent être visualisés en microscopie optique à fluorescence, suite à un marquage de l'ADN par des anticorps (anti-ADN, anti-TFAM), le BrdU, ou d'autres agents intercalants fluorescents, tels que le DAPI et Picogreen (Legros et al. 2004). Ces mesures sont corrélées à la quantité d'ADNmt obtenue par la PCR quantitative. Par conséquent, le nombre de nucléoïdes détecté par cellule, ainsi que le nombre de molécule d'ADNmt qu'il contient, dépendent des propriétés du système optique utilisé, telles que la résolution optique et de l'efficacité de la PCR quantitative. Cela peut expliquer pourquoi les valeurs de contenu d'ADNmt par nucléoïde varient considérablement dans la littérature. La plus faible estimation rapportée du nombre de molécules d'ADNmt par nucléoïde est de 1,4 par super-résolution (STORM et STED) (Kukat et al. 2011). Cependant il n'est pas exclu que ce nombre varie selon le type cellulaire.





**Figure 6 : Les modèles de réplication de l'ADNmt (McKinney et Oliveira, 2013)**

- (A) Le modèle de déplacement asymétrique. La réplication du brin lourd est initiée au niveau de l' Ori-H avec accompagnement du déplacement du brin-H formant ainsi une boucle D. Cette synthèse se déroule jusqu'à ce que l' Ori-L soit exposée, la synthèse du brin léger est initiée dans le sens opposé.
- (B) Le modèle RITOLS. La réplication du brin lourd est initiée de façon similaire au modèle de déplacement de brin, mais le brin retardé est initialement transcrit sous forme d'ARN (ligne pointillée) avant d'être converti en ADN.
- (C) Le modèle synchrone. La réplication bidirectionnelle est initiée à partir d'une zone proche de l' Ori-H.

Les nucléoïdes sont des structures ovoïdes d'environ 100 nm de diamètre (Kukat et al. 2011; Brown et al. 2011). Ils sont associés à la membrane interne mitochondriale et se trouvent dans l'espace intra-crêtes, suggérant peu d'échange entre les nucléoïdes. L'ADNmt est hautement compacté par le facteur de transcription mitochondriale (TFAM) (D. F. Bogenhagen 2012; Farge et al. 2012). TFAM se lie spécifiquement et directement à l'ADNmt, aux promoteurs HSP1 et LSP pour faciliter la transcription et la réplication. Le compactage de l'ADNmt quant à lui fait intervenir une liaison non spécifique de TFAM à l'ADNmt. Ce processus de compactage dépend de la dimérisation de TFAM, qui est médiée par les domaines de HMGA (Ngo et al. 2014).

**La réplication de l'ADNmt** : La réplication de l'ADNmt s'effectue avec une relative autonomie par rapport au cycle cellulaire (D. Bogenhagen et Clayton 1977). Les facteurs essentiels à la réplication mitochondriale sont d'origine nucléaire et comprennent TFAM, mtSSB, Twinkle, et Poly (Oliveira, Haukka, et Kaguni 2015). L'ADN polymérase  $\gamma$  (POLG) est la seule ADN polymérase répliquative décrite dans les mitochondries de mammifères. Cette enzyme est responsable de la réplication et la réparation de l'ADN mitochondrial. Elle est composée d'une grande sous-unité catalytique et de deux sous-unités accessoires. La sous-unité catalytique possède l'activité de correction 3'→ 5' exonucléase, et l'activité lyase phosphate 5'-désoxyribose. Les sous-unités accessoires sont impliquées dans liaison à l'ADN et la processivité de l'enzyme. Récemment, une nouvelle ADN-polymérase humaine a été identifiée dans les mitochondries, la PrimPol. Cette enzyme a une fonction accessoire et faciliterait la progression de la fourche de réplication, en agissant comme une ADN-primase qui bloquerait la synthèse lors de la réplication de l'ADN mitochondrial (Garcia-Gomes et al. 2013). Plusieurs modèles de réplication de l'ADNmt sont proposés chez les mammifères : le modèle asynchrone et asymétrique (Clayton 1982), le modèle synchrone (I. J. Holt, Lorimer, et Jacobs 2000) et le modèle d'incorporation de ribonucléotides (RITOLS) (Yasukawa et al. 2006) (Figure 6).

Dans le premier modèle, les deux brins H et L de l'ADN mitochondrial sont répliqués de manière asynchrone et asymétrique à partir de deux origines de réplication distinctes OH et OL (Shadel et Clayton, 1997).

Le modèle de Holt consiste en une synthèse simultanée du brin lourd et du brin léger et serait comparable à celui de l'ADN nucléaire avec une fourche de réplication bidirectionnelle et une synthèse discontinue du brin L par fragments d'Okasaki successifs. Dans ce modèle, il y aurait un seul site d'initiation appelé OriZ (single zone of replication initiation) (Holt et al. 2000).

Le modèle RITOLs (Ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand) suggère que le brin tardif est synthétisé en ARN avant d'être maturé en ADN (Yasukawa et al. 2006). Ce modèle est cohérent avec les études récentes utilisant des anticorps spécifiques aux hybrides ARN / ADN, montrent que l'ADNmt en réplication était essentiellement sous forme duplexe avec des régions riches en ARN dans un brin (Pohjoismäki et al. 2010).

**La régulation du nombre de copies d'ADN mitochondrial:** La transcription et la réplication de l'ADNmt sont étroitement couplées. L'expression des gènes de l'ADNmt, et donc la capacité d'une cellule à générer de l'ATP par la phosphorylation oxydative (OXPHOS), ne se produit que lorsque l'ADNmt est continuellement répliqué (Trounce 2000). Les cellules à fort besoin énergétique, tels que le cœur, le muscle, les neurones et les cellules hépatiques sont caractérisées par un nombre élevé de copies d'ADNmt, alors que les cellules qui dépendent peu de la phosphorylation oxydative présentent un faible nombre de copies d'ADNmt. Le nombre de copies d'ADNmt est donc un bon indicateur quant à la capacité de la cellule à utiliser la phosphorylation oxydative pour générer l'ATP. L'importance du nombre de copies de l'ADNmt est mieux décrite par l'insuffisance ovarienne et les échecs de fécondations. Pour que le processus de fécondation se produise, il est essentiel que le nombre de copies de l'ADNmt dépasse un seuil critique. La supplémentation de ces ovocytes en ADNmt augmente les taux de fertilisation et

facilite le développement embryonnaire, suggérant donc que la déplétion des copies d'ADNmt est un mécanisme majeur de la physiopathologie de l'insuffisance ovarienne (Spikings, Alderson, et St John 2007; May-Panloup et al. 2005). Le nombre de copies d'ADNmt diffère selon le type cellulaire, le stade de développement ou le besoin énergétique. De la même manière, qu'une déplétion ou une augmentation de l'ADNmt sont généralement associés à des pathologies mitochondriales, suggèrent donc l'existence d'une machinerie de régulation. La réplication de l'ADNmt serait contrôlée par une régulation épigénétique de la polymérase gamma (PolG) qui peut être méthylée. A ce jour, seules les modifications épigénétiques sur la PolG ont été montrées, mais il n'est pas exclu que l'activité des autres facteurs de transcription et de réplication soient également régulée par le génome nucléaire (W. Lee et al. 2015). La régulation du nombre de copies d'ADNmt reste très complexe. Plusieurs mécanismes semblent influencer sur le contenu en ADNmt par cellule. Plusieurs études lient une augmentation du contenu en ADNmt cellulaire à une augmentation de la biogénèse mitochondriale qui elle-même est sous le contrôle de PGC1 $\alpha$  et ses coactivateurs (Brenmoehl et Hoeflich 2013).

L'abondance de l'ADNmt corrèle généralement avec des niveaux de protéines TFAM élevés. Les données suggèrent que la réplication et la transcription mitochondriale sont régulées par le niveau d'expression protéique de TFAM. Les études sur la cardio-protection montrent que la surexpression de TFAM augmente le nombre de copies d'ADNmt et qu'à son tour cette augmentation est corrélée à une diminution de la production de ROS mitochondriaux (Ikeda et al. 2015). La suppression de TFAM chez les souris aboutit à une mort des embryons due à une déplétion de l'ADNmt, mettant en avant le rôle clé de TFAM dans le maintien du génome mitochondrial (Larsson et al. 1998). La régulation de TFAM a longtemps fait débat. Des études récentes impliquent des protéases de la matrice mitochondriale dans la régulation de TFAM. La protéase matricielle LON est impliquée dans la stabilisation du ratio TFAM/mtDNA, en dégradant le TFAM-non-lié à l'ADNmt. En effet, la déplétion de la protéase LON est accompagnée d'une augmentation de TFAM et du nombre de copies d'ADNmt. La libération de TFAM avec l'ADNmt est médiée par la

phosphorylation des résidus Ser55 et Ser56 par la protéine PKA suivie de la dégradation par LON (Lu et al. 2013).

Le nombre de copies d'ADNmt dépend aussi d'une ségrégation correcte des mitochondries et donc de la dynamique mitochondriale. La dynamique mitochondriale est essentielle à la distribution des nucléoïdes lors de la biogenèse mitochondriale. Plusieurs études s'accordent sur le fait qu'il n'y ait pas de synthèse *de novo* des nucléoïdes, ce qui rend les événements de fusion et de fission critiques dans la diffusion du génome mitochondrial vers les nouveaux tubules mitochondriaux (Jayashankar et Rafelski 2014). Les mécanismes qui régissent l'organisation, la distribution et la dynamique des nucléoïdes restent encore mal compris chez les mammifères. Récemment, les acteurs de la fusion et de la fission mitochondriales ont été impliqués dans l'organisation des nucléoïdes et la maintenance de l'ADNmt (Ban-Ishihara et al. 2013; Elachouri et al. 2011). Chez les mammifères, les Mitofusines 1 et 2 et OPA1 sont nécessaires pour la fusion mitochondriale alors que DRP1 est illustrée comme le principal acteur de la fission (H. Chen, McCaffery, et Chan 2007). Ces protéines de fusion et de fission mitochondriale ont été montrées pour influencer directement la distribution des nucléoïdes et donc de l'ADNmt à travers le réseau mitochondrial. Des modèles de délétion de *MFN1/2* ou *OPA1* sont caractérisées par l'absence d'ADNmt dans certaines mitochondries isolées (H. Chen, McCaffery, et Chan 2007).

Lorsque la fission mitochondriale est diminuée, les nucléoïdes se regroupent, leur taille augmente et leur distribution à travers le réseau mitochondrial est totalement perdue. Cette organisation anormale de l'ADNmt à son tour, peut modifier la morphologie des mitochondries et donc aboutir à un défaut du transport de ces dernières. En effet, dans les cellules normales, la fission mitochondriale est produite souvent adjacente aux nucléoïdes, étant donné la localisation des facteurs de fission Mff et DRP1. Ainsi, la fission mitochondriale adjacente aux nucléoïdes devrait empêcher leur regroupement en maintenant des nucléoïdes plus petites et fragmentées (Ban-Ishihara et al. 2013). La délétion de *DRP1* aboutit à un regroupement accru des nucléoïdes qui est corrélé à la formation de structures de

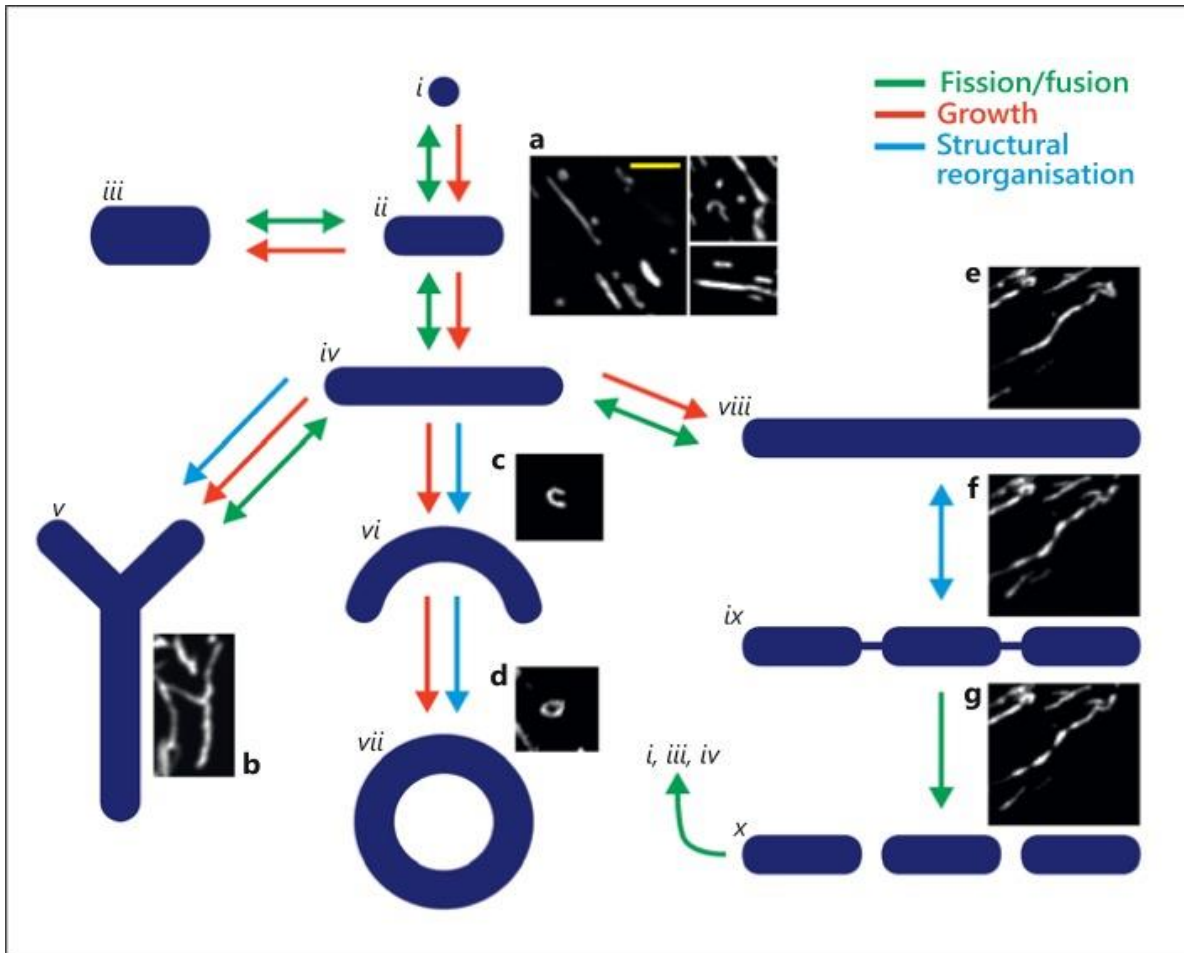
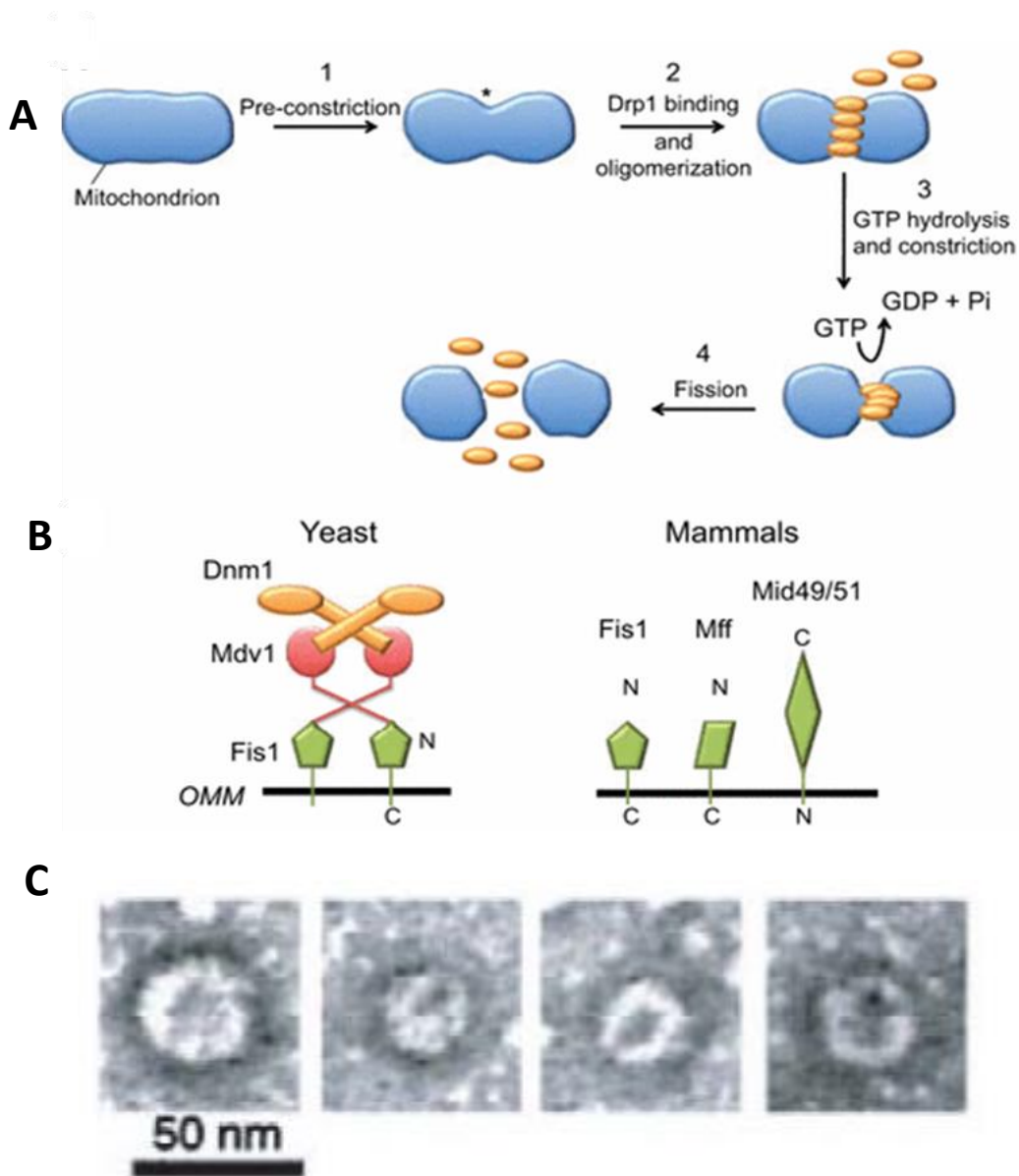


Figure 7: Les différentes structures des mitochondries (McCarron *et al*, 2013)

crêtes plus denses. La formation de crêtes plus dense inhibe donc le relargage du cytochrome c, protégeant ainsi les cellules de l'apoptose (Ban-Ishihara et al. 2013). Ces événements étaient associés à un gonflement des mitochondries. En l'absence de nucléoïdes, la délétion de *DRP1* ne conduit pas à un remodelage mitochondrial, ni une protection contre l'apoptose. La dynamique mitochondriale régulerait donc les signaux pro-apoptotiques mitochondriaux de par son rôle sur la structure et la distribution des nucléoïdes.



**Figure 8: Mécanisme de fission mitochondriale (Hatch *et al*, 2014)**

(A) Représentation schématique des étapes générales de la fission mitochondriale.

Étape 1: un site de scission est marqué par un mécanisme inconnu avant l'arrivée de DRP1 (orange).

Étape 2: DRP1 se lie au site de pré-rétrécissement et s'oligomérisse.

Étape 3: l'hydrolyse du GTP par le DRP1 oligomérisé provoque une constriction du site de scission.

Étape 4: la fission s'opère

(B) DNM1 / DRP1 dans la levure bourgeonnante (à gauche) et chez les mammifères (à droite). Dans la levure bourgeonnante, la protéine Fis1 se lie à la protéine adaptatrice Mdv1, qui à son tour se lie au dimère DNM1 (son domaine GTPase est représenté par la forme ovale). Une seconde protéine adaptatrice, Caf4, peut agir à la place de Mdv1. Chez les mammifères, quatre protéines de la MOM sont postulées pour agir en tant que récepteurs de DRP1: FIS1, MFF, MiD49 et MiD51. Aucune des protéines adaptatrices homologues à Mdv1 ou Caf4 n'ont été identifiés chez les mammifères.

(C) L'auto-assemblage sous forme d'anneaux de DRP1 (Smirnova *et al*, 2001) structures formées en présence de GDP et fluorure d'aluminium visualisées par microscopie électronique après coloration négative



## **Dynamique mitochondriale**

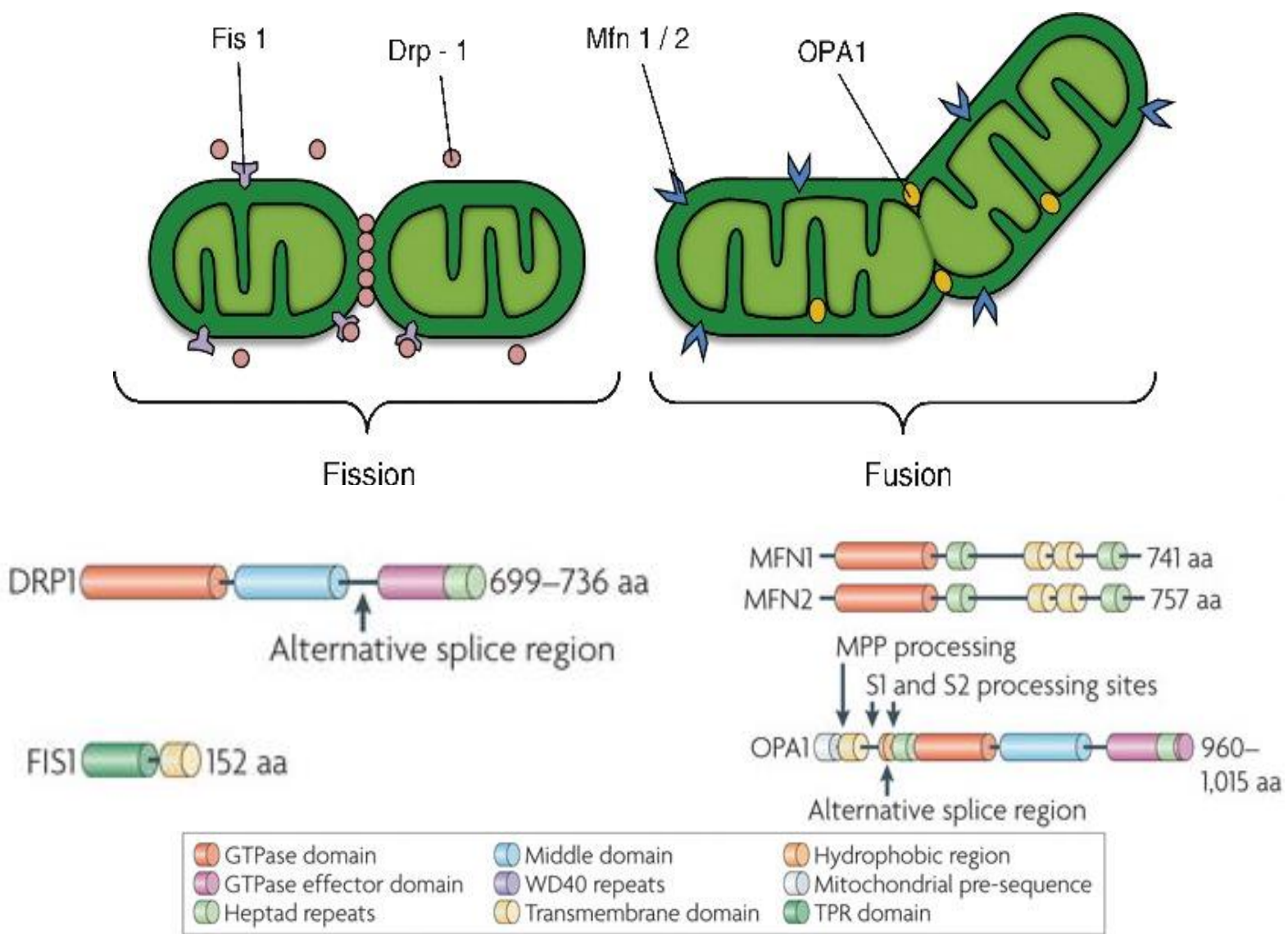
### **La dynamique mitochondriale**

La morphologie des mitochondries est inextricablement liée à ses fonctions, qui incluent la production d'ATP par la phosphorylation oxydative, la régulation de la mort cellulaire programmée, l'homéostasie du calcium, le métabolisme et la génération et le contrôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La fusion et la fission façonnent les mitochondries pour répondre aux besoins métaboliques et pour assurer l'élimination des organites endommagés. Bien que les changements ultrastructuraux ont longtemps été observés en réponse à des altérations du métabolisme oxydatif, il est devenu de plus en plus clair que des changements de morphologies mitochondriales globales peuvent également avoir des effets dramatiques sur le métabolisme cellulaire (Figure 7). L'importance de la balance fusion-fission est soulignée par le nombre croissant de pathologies impliquant les protéines de la dynamique mitochondriale, certainement due à leur rôle dans le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial, l'échange métabolique, la régulation du nombre et de la qualité des mitochondries (I. Kim, Rodriguez-Enriquez, and Lemasters 2007).

### **La fission mitochondriale**

La fission mitochondriale est essentielle à différents mécanismes cellulaires tels que la biogenèse, la dégradation des mitochondries ou la distribution de l'ADN mitochondrial. La fission mitochondriale se produit en réponse à un dysfonctionnement pour faciliter leur élimination par autophagie et permettre l'adaptation des activités mitochondriales aux demandes physiologiques.

Plusieurs protéines ont été impliquées dans la fission mitochondriale (Figure8). Deux de ces protéines, DRP1 et FIS1, sont conservées à travers l'évolution. La protéine DRP1 est une protéine de 736 acides aminés appartenant à la famille des dynamines et codée par le gène nucléaire DNML1 (dynamine like 1) localisé en



**Figure 9: Les acteurs de la dynamique mitochondriale**

12p11.21 (Howng et al. 2004; Shin et al. 1997). Elle possède un domaine GTPase C-terminal, un domaine central et un domaine GTPase effecteur qui régule l'hydrolyse du GTP (Figure9). DRP1 est localisée dans le cytosol et est recruté au niveau des sites fission par FIS1. FIS1 est une protéine de 152 acides aminés codée par le gène FIS localisé en 7q22.1 (Yisang Yoon et al. 2003). FIS1 est constituée d'un domaine transmembranaire C-terminal ancré dans la membrane mitochondriale externe et d'un domaine N-terminal exposé vers le cytoplasme, qui est composé de six hélices  $\alpha$  antiparallèles incluant deux domaines tétratricopeptides (TPR). Ce domaine serait impliqué dans le recrutement de DRP1.

Le mécanisme de fission reste encore mal connu. Il semblerait que DRP1 s'assemble sur la mitochondrie au niveau de la MEM de façon à former un anneau de constriction qui faciliterait la fission. L'hydrolyse du GTP permet soit une constriction d'un anneau de protéines Drp1, soit un étirement d'une spirale de protéines Drp1 pour effectuer la fission. Le mécanisme de fission induit par DRP1 repose sur le mode d'action des dynamines qui sont impliquées dans la libération des vésicules couvertes de clathrine au cours de l'endocytose. Des études *in vitro* ont montré que l'oligomérisation de la dynamine induit un étirement du cou de la vésicule et une fission des membranes à l'issue de la dépolymérisation de la dynamine induite par l'hydrolyse du GTP (Bashkirov et al. 2008). Ce mécanisme d'action de DRP1 qui est également une dynamine semble probable ; néanmoins, des études d'oligomérisation *in vitro* montrent que l'assemblage de DRP1 résulte en un anneau d'un diamètre d'environ 50nm, bien en dessous du diamètre moyen d'une mitochondrie (Smirnova et al. 2001). Plusieurs études ont mis en évidence une multitude de partenaires qui faciliteraient le recrutement de DRP1 au niveau de la mitochondrie et parmi ceux-ci il y a la plus reconnue, FIS1, mais également MFF (Mitochondrial fission factor), MID49 et MID51 (Mitochondrial dynamics proteins 49 et 51) (Otera et al. 2010; Palmer et al. 2013). Le rôle de FIS1 en tant que récepteur de DRP1 dans la fission est remis en question. En effet, la déplétion de FIS1 n'empêche pas le recrutement de DRP1 à la surface mitochondriale (Y. Lee et al. 2004). La protéine MFF (OMIM \*614785) est codée par le gène nucléaire *MFF*,

localisé en 2q36.3. MFF est une protéine de 342 acides aminés qui contient 2 motifs courts de répétition près de l'extrémité N-terminale, suivie d'un domaine en superhélice, d'un domaine transmembranaire et une courte queue C-terminale. Cette protéine existerait sous huit isoformes, l'expression de ces isoformes étant dépendant de la présence ou l'absence de l'exon1. La délétion des isoformes MFF aboutit à la formation d'un réseau mitochondrial hyper-connecté ; cette hyper-connectivité n'est pas altérée par des traitements chimiques pro-fission, impliquant donc MFF dans la fission mitochondriale (Gandre-Babbe et van der Blik 2008). Des études récentes montrent une coopération de MFF et DRP1 au niveau de la MEM. Un auto-assemblage prématuré de DRP1 altère les interactions fonctionnelles avec MFF qui est ancrée à la MEM. Donc lors de la fission, des dimères de DRP1 sont sélectivement recrutés par MFF pour l'assemblage d'un complexe de fission fonctionnelle. Le domaine super-enroulé (coil-coiled domain) ne serait pas essentiel à cette coopération, mais faciliterait néanmoins l'oligomérisation de DRP1 (Clinton et al. 2015). Une étude sur une population saoudienne (10 familles consanguines) implique le gène *MFF* dans des pathologies mitochondriales. Shamseldin et collègues, ont identifié une mutation MFF\_p.Q64X qui est due à une transition 190C-T dans l'exon 4 du gène *MFF*. Cette mutation induit une perte du domaine transmembranaire de la protéine. Les deux enfants identifiés pour cette mutation présentaient un retard de développement, une microcéphalie, une pâleur des disques optiques et une hypotonie avec des réflexes vifs (Shamseldin et al. 2012).

MID49 (OMIM \*615498) aussi connue sous le nom de MIEF2 (mitochondrial elongation factor) est une protéine de 454 acides aminés qui possède un domaine transmembranaire à proximité de l'extrémité N-terminal. Cette protéine codée par le gène nucléaire *MIEF2*, localisé en 17p11.2, possède 45% d'homologie d'acides aminés avec MID51, ou MIEF1 (OMIM \*61497). MID51 est une protéine de 463 acides aminés codée par le gène *MIEF1*, localisé en 22q13.1 (Zhao et al. 2011). Des expériences de digestion par la protéase ont révélé que ces deux protéines étaient ancrées dans la MEM par leur extrémité N-terminale, leur extrémité C-terminal faisant face au cytoplasme (Palmer et al. 2013).

Outre ces acteurs de la dynamique mitochondriale, des études récentes indiquent que la F-actine participerait également à la fission mitochondriale aussi bien en condition physiologique qu'en présence de protonophores ou encore dans les pathologies neurodégénératives (Li et al. 2015). En effet, les auteurs suggèrent que l'assemblage de la F-actine sur la membrane externe mitochondriale, altèrerait d'une manière ou d'une autre cette dernière, facilitant ainsi la division mitochondriale médiée par DRP1. Cette hypothèse vient d'études sur la scission de membranes non-mitochondriales, où l'assemblage de la F-actine induirait une réorganisation des lipides membranaires, facilitant ainsi la fission des membranes (Dason et al. 2014). Dans leur étude, Li et ses collègues n'excluent pas la possibilité d'une fission médiée par IFN2 et donc du rôle du réticulum endoplasmique dans la fission mitochondriale. L'implication du réticulum endoplasmique a déjà été soulevée, celui-ci servant de point de constriction dans la fission mitochondriale (Friedman et al. 2011).

Les études de l'équipe de Sesaki montrent également que DRP1 seul ne peut aboutir à une fragmentation du réseau. En l'absence de la cortactine (OMIM \*164765) et de la cofiline (OMIM \*604765), des protéines régulatrices de la F-actine, on observe une accumulation de DRP1 au niveau de la mitochondrie, associée plutôt à une hyperfusion du réseau mitochondrial (Li et al. 2015). La cofiline existe sous deux formes la cofiline 2 (m-cofilin or muscle cofilin) qui est spécifique aux tissus musculaires et la cofiline 1 (n-cofilin or non-muscle cofilin) qui est ubiquitaire. La délétion de la cofiline 1 chez les souris aboutit à une létalité embryonnaire et des délétions conditionnelles des tissus du cerveau montrent un développement anormal du cortex traduit chez les souris mutées par un retard de croissance, ataxie et des signes de crises d'épilepsie (Bellenchi et al. 2007).

L'étude de la fission mitochondriale fait donc intervenir plusieurs acteurs, dont *DRP1* qui reste un des acteurs fondamentaux de la fission mitochondriale associée également à une pathologie létale décrite (Waterham et al. 2007). D'autres études montrent également une régulation de la fission mitochondriale par des modifications post-traductionnelles essentiellement de DRP1. DRP1 peut être

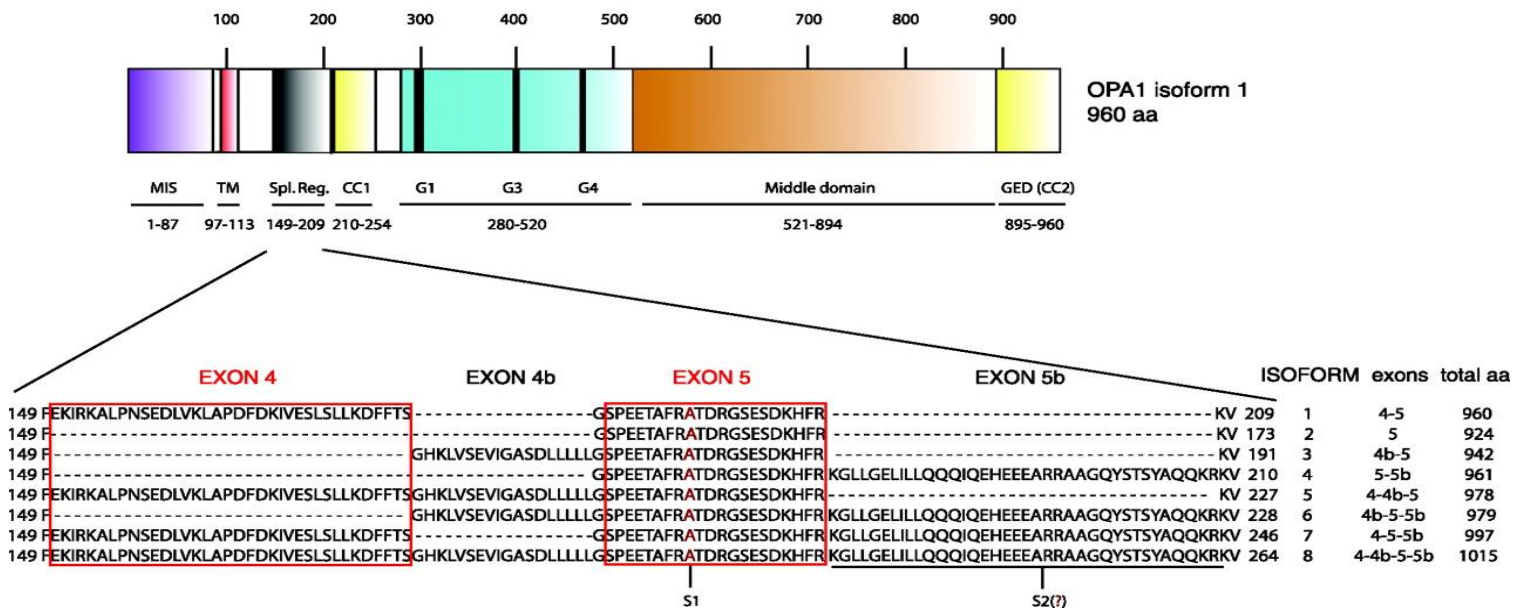
phosphorylée, sumoylée, ubiquitinée ou encore nitrosylée. DRP1 peut être phosphorylée sur plusieurs sites. La phosphorylation de la sérine 637 dans le domaine GED de la protéine, inhibe sa fonction GTPase et donc une inhibition de son activité pro-fission (Cribbs et Strack 2007). La phosphorylation d'autres sites, n'affecte par contre pas son activité GTPase, mais entrainerait plutôt une augmentation de son activité de fission mitochondriale, en augmentant l'interaction de DRP1 avec ses récepteurs. Pendant le processus de reprogrammation de cellules souches pluripotentes induites (iPS), les cellules somatiques passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique, une transition associée à une profonde réorganisation mitochondriale. La fission mitochondriale favorise le passage à la glycolyse aérobie dans différents types de cellules. Cette phosphorylation de DRP1 dépend de l'activation d'ERK (Extracellular signal-regulated kinases) au début de la reprogrammation cellulaire (Prieto et al. 2016).

En Outre, des travaux ont montré que la sumoylation de DRP1 stimulait la fission mitochondriale et que cette modification était réalisée par MAPL (Mitochondrial-anchored protein ligase), une SUMO-E3 ligase mitochondriale (Braschi, Zunino, et McBride 2009). Cette sumoylation est médiée par la machinerie apoptotique et serait essentielle à la stabilisation de DRP1 à la MEM (Wasiak, Zunino, and McBride 2007). Des études récentes montrent que cette modification de DRP1 est essentielle pour libération du cytochrome *c*, par la stabilisation des sites de constriction entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Prudent et al. 2015).

## La fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est essentielle dans la maintenance d'une population mitochondriale homogène en permettant les phénomènes de complémentation et en protégeant les organelles d'une dégradation potentielle lors de restriction calorique ou encore d'une induction de la mort programmée des cellules. La fusion mitochondriale se fait en deux temps, d'abord une fusion des membranes externes sous le contrôle des mitofusines 1 et 2 (MFN 1 et MFN2) suivie de la fusion des membranes internes sous le contrôle d'OPA1 (Optic Atrophy 1) (Malka, Lombès, et Rojo 2006). MFN2 et OPA1 sont essentiels à la fusion des membranes, une mutation sur le gène *OPA1* aboutit à une fragmentation du réseau mitochondrial (Delettre et al. 2000; H. Chen et al. 2003). Les défauts de fusion mitochondriale ont été impliqués dans diverses pathologies humaines.

**MFN2 et MFN1:** Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) font partie de la famille des dynamines GTPases. Elles sont codées par les gènes nucléaires *MFN1* et *MFN2*, localisés respectivement en 3q25-q26 et 1p36.22. Elles sont localisées à la membrane mitochondriale externe et sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal orienté vers le cytosol deux domaines transmembranaires nécessaires à la localisation mitochondriale de ces protéines et deux régions répétées hydrophobes HR1 et HR2 (heptad repeat) HR2 étant essentielle à l'oligomérisation de MFN2 et donc à l'attache entre les mitochondries (A. Santel and Fuller 2001; Koshiba et al. 2004) (Figure 9). MFN1 (OMIM# 608506) est une protéine de 741 acides aminés qui présentent 60% d'homologie avec MFN2 (OMIM# 608507) une protéine de 757 acides aminés exprimée de façon ubiquitaire, mais reste néanmoins prédominante dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Ansgar Santel et al. 2003). MFN2 est également localisée sur le réticulum endoplasmique permettant ainsi une interaction entre les deux organites (de Brito et Scorrano 2008). Cette interaction semble indispensable dans la régulation et l'absorption du  $Ca^{2+}$  par la mitochondrie. L'absence de MFN2 abolit les contacts entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries, perturbe l'homéostasie calcique et induit la fragmentation du RE (de Brito and Scorrano 2008).



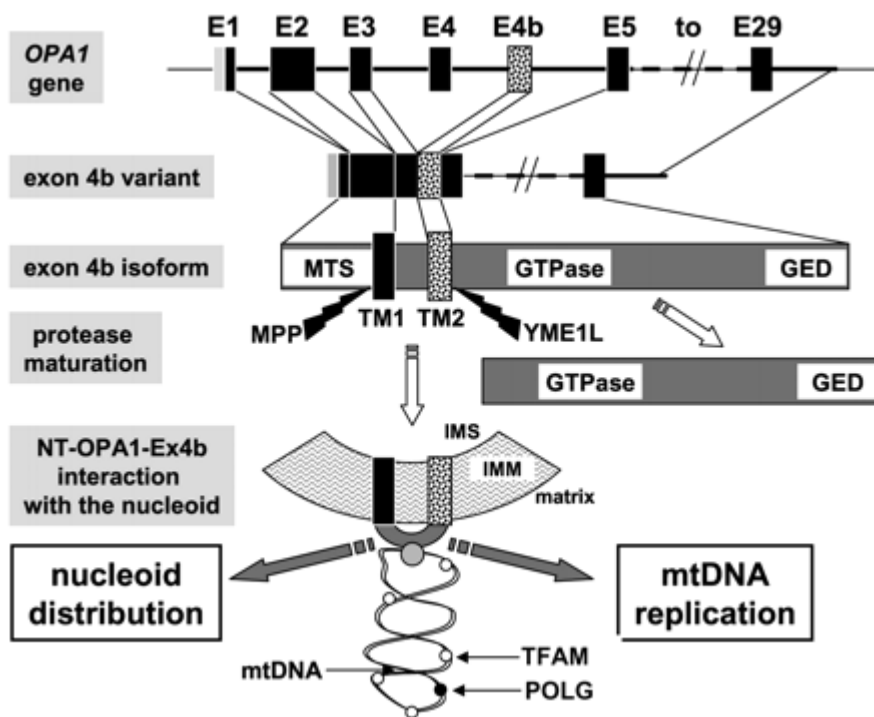
**Figure 10: Domaines de la protéine de fusion mitochondriale humaine OPA1**

La taille et la topologie en acides aminés pour chaque région et chaque domaine sont représentées. La séquence primaire pour chaque isoforme d'OPA1 à l'issue de l'épissage. L'épissage alternatif des exons 4, 4b, 5b génère huit isoformes d'OPA1. Toutes les isoformes d'OPA1 contiennent l'exon 5 avec le site de clivage S1. Les isoformes avec l'exon 5b contiennent un second site de clivage S2.



MFN2 permet également l'ancrage des mitochondries à la kinesin-1 par le complexe Miro1/Milton. Cet ancrage permettrait le transport des mitochondries le long des axones dans les nerfs (A. Misko et al. 2010; A. L. Misko et al. 2012). Cette perturbation du transport axonal est un mécanisme responsable de la dégénérescence des axones dans les neuropathies périphériques dans des maladies telles que le CMT (maladie de Charcot-Marie-Tooth) (Baloh et al. 2007). Les mutations sur *MFN2* sont d'ailleurs associées au type 2A axonal dominant du CMT (CMT2A). Les mutations de *MFN2* sont néanmoins difficiles à caractériser sur le plan phénotypique, de par la redondance fonctionnelle conférée par MFN1. En effet, à part dans les nerfs périphériques, MFN1 compense les défauts de MFN2 et de ce fait, les fibroblastes de patients CMT2A ne présentent aucune altération de la morphologie des mitochondries ou une augmentation de la connectivité du réseau mitochondrial, ni de baisse de l'ADNmt, et pas d'atteintes de la respiration mitochondriale (Amiott et al. 2008; L. Chen et al. 2012; Loiseau et al. 2007). MFN1 semble donc avoir un rôle important dans la fusion mitochondriale, certainement dû à son activité GTPase plus importante que MFN2. En effet, des études *in vitro* ont montré que MFN1 hydrolysait plus rapidement le GTP que MFN2 pour qui l'affinité pour le GTP est très importante ; or la fusion est dépendante du GTP (Ishihara et al. 2003). Pour l'heure, MFN2 est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation. L'ubiquitinylation de MFN2 favoriserait la fission mitochondriale et le recrutement de p62, un acteur de la mitophagie. Ce processus est importante dans le contrôle qualité et la dégradation des mitochondries par mitophagie, en empêchant une fusion éventuelle de la mitochondrie altérée (Tanaka et al. 2010; Gegg et al. 2010).

**OPA1:** *OPA1* (OMIM#165500) de par son implication dans l'atrophie optique autosomique dominante, a fait l'objet d'un très grand nombre d'études. Il a été localisé sur le chromosome 3q28q29 et séquencé dès le début des années 2000 (Delettre et al. 2000; Alexander et al. 2000). Cette description initiale a été la première implication de la dynamique mitochondriale dans une pathologie



**Figure 11: Représentation schématique de l'épissage d'OPA1 (Elachouri *et al*, 2011)**

Représentation schématique montrant les différentes étapes d'épissage du gène *OPA1* à la génération du peptide NT-OPA1 exon4b et son interaction avec le nucléoïde mitochondrial. Chez les humains, la production du peptide NT-OPA1-exon4b nécessite deux étapes spécifiques: l'insertion de la séquence de l'exon 4b de la transcription des *OPA1* et le clivage des isoformes correspondantes par la protéase mitochondrial YME1L.

humaine. Depuis plusieurs études se sont penchées sur ce gène et on lui découvre plusieurs fonctions de par son rôle essentiel dans la dynamique mitochondriale, notamment dans la fusion des mitochondries et dans la maintenance de la structure des crêtes mitochondriales. En régulant la morphologie des crêtes mitochondriales, OPA1 joue un rôle aussi bien dans la survie cellulaire que dans la production d'énergie par une amélioration de la respiration mitochondriale (Frezza et al. 2006; Scorrano et al. 2002; Cogliati et al. 2013; Civiletto et al. 2015). Ceci explique probablement pourquoi OPA1 se distingue par une diversité clinique très importante.

Le gène *OPA1* est composé de 30 exons parmi-lesquels 3 sont des exons alternatifs (4, 4b et 5b) résultant donc en huit transcrits alternatifs et isoformes protéiques (Olichon et al. 2002; Delettre et al. 2001). La protéine OPA1 peut donc varier en taille, allant de 960 acides aminés, qui comprend tout le cadre de lecture (ORF, open reading frame) sauf les exons 4b et 5b pour l'une des isoformes, à 1015 acides aminés pour l'isoforme la plus longue comprenant tous les exons alternatifs (Delettre et al. 2001). OPA1 est exprimé de façon ubiquitaire, mais reste néanmoins prédominant dans le cerveau, la rétine, le cœur et le muscle (Alexander *et al*, 2000; Delettre *et al*, 2001) (Figure 10). Les principaux domaines d'OPA1 sont : la séquence d'adressage mitochondrial en N-terminal, les domaines superhélice (coiled-coil) et GED (GTPase effector domain) putatif C-terminaux, le domaine GTPase et la région centrale dynamine. La protéine contient également une région transmembranaire (TM1) impliquée dans l'association d'OPA1 à la MIM. Les domaines transmembranaires TM2a et TM2b sont présents que dans les variants alternatifs 4b et 5b (Figure 11).

OPA1 est impliquée aussi bien dans la fusion des membranes internes des mitochondries que dans la fission induite par le stress, selon l'expression de son isoforme longue (OPA1-L) ou courte (OPA1-S) (Song et al. 2007). L'épissage alternatif d'OPA1 donne lieu à des formes longues (OPA1-L, notée a et b) qui sont protéolytiquement clivées pour donner des formes courtes (OPA1-S; noté c, d et e) par deux peptidases de la MIM: OMA1 et la protéase YME1L (Anand et al. 2014).

L'accumulation de la forme courte favorise une fission du tubule mitochondrial. Les clivages protéolytiques se font au niveau des sites spécifiques de clivage S1 et S2 qui sont localisés au niveau des exons 5 et 5b respectivement (Ishihara et al. 2006; Song et al. 2007). Ainsi, le clivage de la forme OPA1-L constitue aussi un mécanisme régulateur important qui permet de préserver la structure du réseau mitochondrial en équilibrant les événements de fusion et fission mitochondriale (Anand et al. 2014). La présence et la balance de ces isoformes longues et courtes sont indispensables à la fusion ; une majorité des isoformes courtes aboutirait à un réseau mitochondrial hyper-fragmenté (Cipolat et al. 2006; Ishihara et al. 2006; Song et al. 2007), de même que l'épissage alternatif de l'exon 4 est essentiel à l'ancrage et l'intégrité de l'ADNmt (Elachouri et al. 2011). Le gène *OPA1* humain contient de multiples éléments de fixation de NF-kappaB à proximité du site de début de transcription ; or NF-kappaB contrôle l'homéostasie énergétique et adaptation métabolique en augmentant la respiration mitochondriale (Mauro et al. 2011; Müller-Rischart et al. 2013). L'analyse *in silico* a indiqué la présence d'un site de liaison à NFkB évolutivement conservées dans le promoteur d'*OPA1* (Parra et al. 2014). Les niveaux ARNm et de la protéine OPA1 augmentent rapidement en réponse aux activateurs de NF-kappaB, TNF-alpha et IKK-bêta. Lors d'un stress cellulaire suite aux traitements protonophoriques ou pro-apoptotiques, PARKIN confère une protection anti-apoptotique via NEMO (NF-kappaB essential modulator) (OMIM\*300248), NF-kappaB, et OPA1. En réponse au stress cellulaire, PARKIN augmente l'activité de LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) qui alors ubiquitinye NEMO, activant ainsi le complexe-kinase IKK-bêta. NF-kappaB est alors activé et régule la transcription des gènes de NF-kappaB dont OPA1 (Muller-Rischart et al. 2013). Par ailleurs d'autres études sur l'impact de l'insuline sur la morphologie et donc la fonction mitochondriale lient NF-KappaB à OPA1 (Parra *et al*, 2013). L'insuline augmente la fonction mitochondriale dans les cardiomyocytes par la voie de signalisation Akt-mTOR-NFkB ; NF-kappaB module alors l'expression d'OPA1 (Parra et al. 2014). OPA1 fait enfin l'objet d'une régulation post-traductionnelle par déacétylation médiée par SIRT3. Des études récentes ont

montré que dans les cas de maladies cardiovasculaires sévères, OPA1 est hyperacétylée. Cette modification post-traductionnelle réduit l'activité GTPase de la protéine. En condition physiologique, la déacétylase mitochondriale SIRT3 déacétyle OPA1 sur les lysines 926 et 931, ce faisant augmente son activité GTPase (Samant et al. 2014).

**La régulation de la fusion:** La dynamique mitochondriale est régulée non seulement par des modifications post-traductionnelles de ces acteurs, mais des conditions de stress cellulaire ont mis en évidence d'autres acteurs qui régulent la fusion mitochondriale. En effet dans l'hyperfusion mitochondriale induite par le stress (SIMH), des études ont montré l'implication de SLP-2 (Stomatin-Like Protein 2) (OMIM \*608292) en plus d'OPA1-L et MFN1. Cette protéine située dans l'espace intermembranaire empêche le clivage des formes longues d'OPA1 (Tondera et al. 2009). La fusion et la fission mitochondriales sont également régulées par la composition lipidique des membranes mitochondriales. L'hypothèse serait que des modifications locales de la composition de phospholipides sur la MEM induiraient des courbures de la membrane ou déstabiliser les bicouches membranaires pour favoriser la fusion ou de fission entre les organelles. L'importance de la modulation de phospholipides mitochondriaux pendant le processus de fusion membranaire a été mis en évidence par la découverte de mitoPLD (OMIM \*614960), un membre de la famille de la phospholipase D. MitoPLD est codée par *Pld6* et est ancrée à la MEM par le domaine transmembranaire C-terminale, le domaine catalytique étant en N-terminal et faisant face au cytosol. MitoPLD convertie la cardiolipine (CL) en acide phosphatidique (PA) à la MEM, induisant ce faisant la fusion mitochondriale (Choi et al. 2005). La délétion de MitoPLD provoque la fragmentation mitochondriale *in vitro* et induirait chez la souris (MitoPLD *-/-*) l'arrêt de la méiose, des lésions de l'ADN et une stérilité des mâles (Huang et al. 2011).

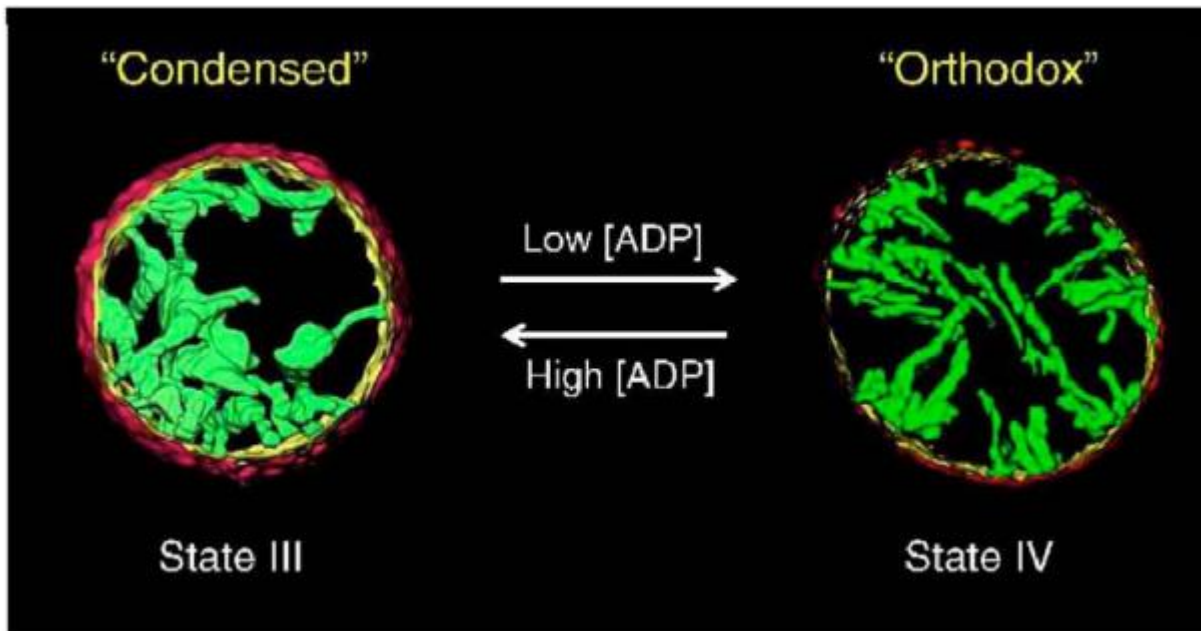
### **La fission sélective de la membrane interne mitochondriale**

Plusieurs études émettent l'hypothèse selon laquelle qu'une constriction de la MEM seule médiée par DRP1 ne serait pas suffisant pour conduire à une scission de

laMIM. L'existence d'une machinerie supplémentaire à l'IM reste encore incertaine. Néanmoins, deux protéines, MTP18 et l'isoforme courte d'OPA1 (OPA1-S), ont été proposées pour faire partie de la machinerie de fission de la MIM et donc avoir un rôle important dans la fission mitochondriale. La protéine mitochondriale de 18 kDa (MTP18) est une protéine membranaire intégrale qui est nécessaire pour le maintien de la morphologie des mitochondries. Une délétion de MTP18 provoque une élongation des mitochondries, tandis que l'expression ectopique entraîne une fragmentation du réseau mitochondrial, impliquant cette protéine dans la fission mitochondriale (Tondera et al. 2005). OPA1-S est générée par le clivage protéolytique d'OPA1-L par les protéases YME1L ou OMA1. L'expression ectopique de constructions d'OPA1-S ciblées à la MIM conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial, indiquant que l'accumulation de la forme OPA1-S accélère la fission. De plus, les protéines OPA1-S colocalisent avec les composants de la machinerie de fission de la MEM sur les sites de contact ER-mitochondries, suggérant une activité pro-fission de la forme OPA1-S de la MIM (Anand et al. 2014).

## Rôle de la dynamique mitochondriale

**Relation structure-fonction énergétique:** La morphologie des mitochondries est inextricablement liée à ses fonctions, qui incluent la production d'ATP par la phosphorylation oxydative, la régulation de la mort cellulaire programmée, l'homéostasie de calcium et la génération et la détoxification des ROS. Une balance fusion-fission façonne les mitochondries pour répondre aux demandes métaboliques et assurer l'élimination des organites endommagés. Il a été démontré qu'une modulation spécifique de la bioénergétique mitochondriale peut provoquer une altération de la morphologie mitochondriale, mais également la structuration des crêtes. En effet, les travaux de Hackenbrock montrent que la mitochondrie passe d'une configuration « orthodoxe » ou relâchée à une forme condensée, suite à l'activation de la production d'ATP par l'ajout d'ADP (Hackenbrock 1981). L'état orthodoxe est caractérisé par une large matrice et des crêtes mitochondriales fines et tubulaires reliées à la membrane interne par très peu de jonctions. Les



**Figure 12: Changement de la topologie la membrane interne mitochondrial associée à la transition orthodoxe à condensé (Manella *et al*, 2006)**

Analyses tridimensionnelles des mitochondries de foie de rat dans différents états indiquent des différences importantes dans la topologie de membrane interne. Les crêtes dans l'état orthodoxe (matrice expansée) sont tubulaires avec peu de jonctions (1-2) dans la région périphérique de la membrane interne. Les mitochondries condensés (matrice compactée) ont de plus grands compartiments internes ayant de multiples connexions tubulaires les unes aux autres mais aussi avec la zone périphérique. Ces transitions de la membrane interne sont dépendant de la dynamique mitochondriale et donc de la fusion et de la fission.

mitochondries condensées ont une matrice très réduite avec des crêtes (Figure 12). Depuis, des études ont mis en évidence l'implication des acteurs de la fusion et de la fission mitochondriale dans ce remodelage des crêtes. L'augmentation du nombre de crêtes mitochondriales est associée à une augmentation de l'état fusogène des mitochondries. L'augmentation du nombre de crêtes mitochondriale est due à la dimérisation de l'ATP-synthase et est caractérisée par une augmentation de l'activité de synthèse d'ATP (Gomes, Di Benedetto, et Scorrano 2011). Les changements en faveur de la fusion mitochondriale sont associés à des situations nécessitant une capacité accrue de synthèse d'ATP. En effet, les mitochondries forment un réseau fortement interconnecté dans les cellules exposées à des stress sélectifs. Ce processus précède la fission mitochondriale lorsqu'elle est déclenchée par des stimuli pro-apoptotiques tels que l'irradiation UV. Cette hyper-fusion mitochondriale induit par le stress est indépendant de MFN2, BAX / BAK, mais nécessite la présence de l'isoforme longue de la protéine OPA1. L'hyperfusion mitochondriale due au stress est accompagnée par une augmentation de la production d'ATP mitochondriale et représente une nouvelle réponse adaptative contre le stress (Tondera et al. 2009). La structure du réseau mitochondrial et accessoirement la topologie de la membrane interne jouent un rôle essentiel dans les processus d'autophagie ou encore de l'apoptose. Des études ont montré que l'apport nutritif dans un milieu de culture altérait de façon majeure le réseau mitochondrial. Ainsi, lorsque les apports nutritifs sont en excès, le réseau mitochondrial est hyper-fragmenté, alors qu'une privation en glucose ou en sérum résulte en un réseau hyper-tubulaire. Ce changement de morphologie des mitochondries serait corrélé à une régulation du contrôle qualité : une augmentation de la fission accroîtrait la sensibilité à l'apoptose et la dégradation des mitochondries, alors que l'hyper-fusion des mitochondries aurait un effet pro-survie (Molina et al. 2009; Twig et al. 2008). La privation en glucose ou en facteurs de croissance provoque une inhibition de la fission mitochondriale en inhibant le recrutement de DRP1 aux mitochondries, favorisant donc une hyper-connectivité du réseau mitochondrial (Rambold et al. 2011; Gomes, Di Benedetto, et Scorrano 2011).

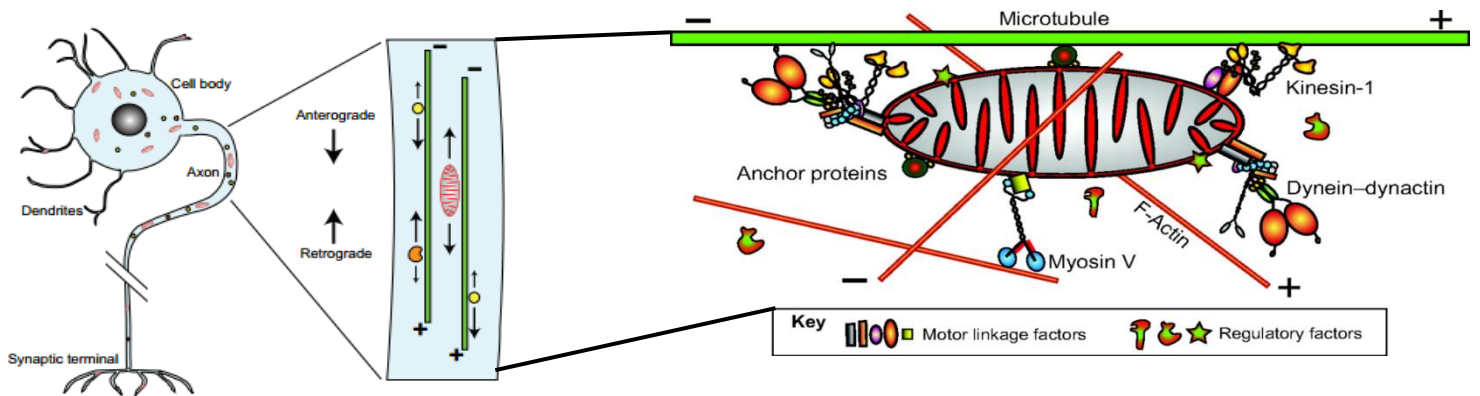


Ces études montrent que l'élongation empêche l'élimination des mitochondries par l'autophagie. L'ablation génétique des acteurs clés de la fusion ou de la fission induit des changements métaboliques mitochondriaux, suggérant un rôle de la dynamique mitochondriale dans le métabolisme cellulaire autre que l'efficacité bioénergétique seule et qui expliquerait certaines conditions pathologiques. Des études récentes ont montré que l'altération de l'expression d'OPA1 dans les souris déplétées en *OPA1* (souris *OPA1*<sup>-/-</sup>) induit une insulino-résistance et une altération de l'homéostasie du glucose et de la thermogénèse. Les souris *OPA1*<sup>-/-</sup> développent des défauts métaboliques similaires à ceux observés dans le cadre d'alimentation riche en graisses, illustrant l'importance d'un bon équilibre entre les formes L et S de OPA1 pour le maintien de la fonction mitochondriale (Quirós et al. 2012). Des études réalisées *in vivo* sur des souris, ont montré que les souris dépourvues du gène *OPA1* dans les cellules bêta développaient une hyperglycémie. Dans ces modèles, la quantité et l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire ont été significativement diminuées conduisant à une altération de la production d'ATP (K. Zhang 2010). De la même manière, l'inhibition de la fission mitochondriale par la modulation de DRP1 altère la fonction mitochondriale. Une expression réduite de DRP1 conduit également à une activité réduite complexe IV et une diminution du taux de synthèse d'ATP maximal (Benard et al. 2008). Une altération du complexe IV reste commune dans ces atteintes de l'activité bioénergétique ; néanmoins pour le moment aucune étude ne vient éclairer le mécanisme de la perte complexe IV dans les mutations d'*OPA1* par exemple.

Ces études montrent que la structure des mitochondries module l'efficacité bioénergétique, mais le type cellulaire et leur dépendance à un métabolisme glycolytique ou oxydatif pourraient être déterminants quant à la régulation de la morphologie des mitochondries et l'efficacité bioénergétique. Il reste difficile d'établir la chronologie des événements et la répartition des rôles lorsque la dynamique mitochondriale et l'efficacité bioénergétique sont modifiées ; mais les études s'accordent sur une régulation bidirectionnelle de la structure et la fonction énergétique mitochondriale.

**La Dynamique mitochondriale et le génome mitochondrial** : Un des rôles de la dynamique mitochondriale est la transmission des mitochondries au cours de la division cellulaire. La ségrégation des mitochondries pendant la division cellulaire se fait par la fission mitochondriale avec l'aide du cytosquelette et du réticulum endoplasmique pour une bonne répartition de la masse mitochondriale. La dynamique mitochondriale joue ainsi un rôle dans la distribution des molécules d'ADNmt aux cellules filles, la complémentation de l'ADNmt, l'élimination de l'ADNmt altérée. Dans les cellules de mammifères qui se divisent symétriquement, la ségrégation est supposée être un processus essentiellement passif et aléatoire. La ségrégation est facilitée par l'induction de la fission mitochondriale dans les phases G2 et la mitose du cycle cellulaire et par l'interaction des mitochondries avec le cytosquelette et le réticulum endoplasmique (ER). La fusion et fission mitochondriales sont régulées au cours du cycle cellulaire. La fusion accrue est associée à la transition de phases G1 à S, où les mitochondries ont tendance à former des réseaux interconnectés ; alors que la mitose est marquée par une fission accrue en conséquence d'une activation de DRP1 par une phosphorylation sélective (Mitra et al. 2009). Chez la levure, la division est asymétrique et la ségrégation mitochondriale est un événement contrôlé mettant en jeu différents acteurs tels que num1, Arp2/3 (Mishra and Chan 2014a). Ces mécanismes actifs qui permettraient une ségrégation contrôlée des mitochondries ne sont pas encore connus dans les cellules de mammifères.

La dynamique mitochondriale n'est pas seulement essentielle à la transmission des mitochondries au cours de la division cellulaire, elle favorise aussi un échange continu des molécules d'ADNmt entre les différentes mitochondries, et donc par cette complémentation permet le maintien de mitochondries fonctionnelles au sein des cellules. La déplétion et l'accumulation des mutations de l'ADNmt dans les modèles de défaut de fusion montre l'importance de la fusion dans la maintenance du génome mitochondrial (Amati-Bonneau et al. 2008; Rouzier et al. 2012; Vielhaber et al. 2013)

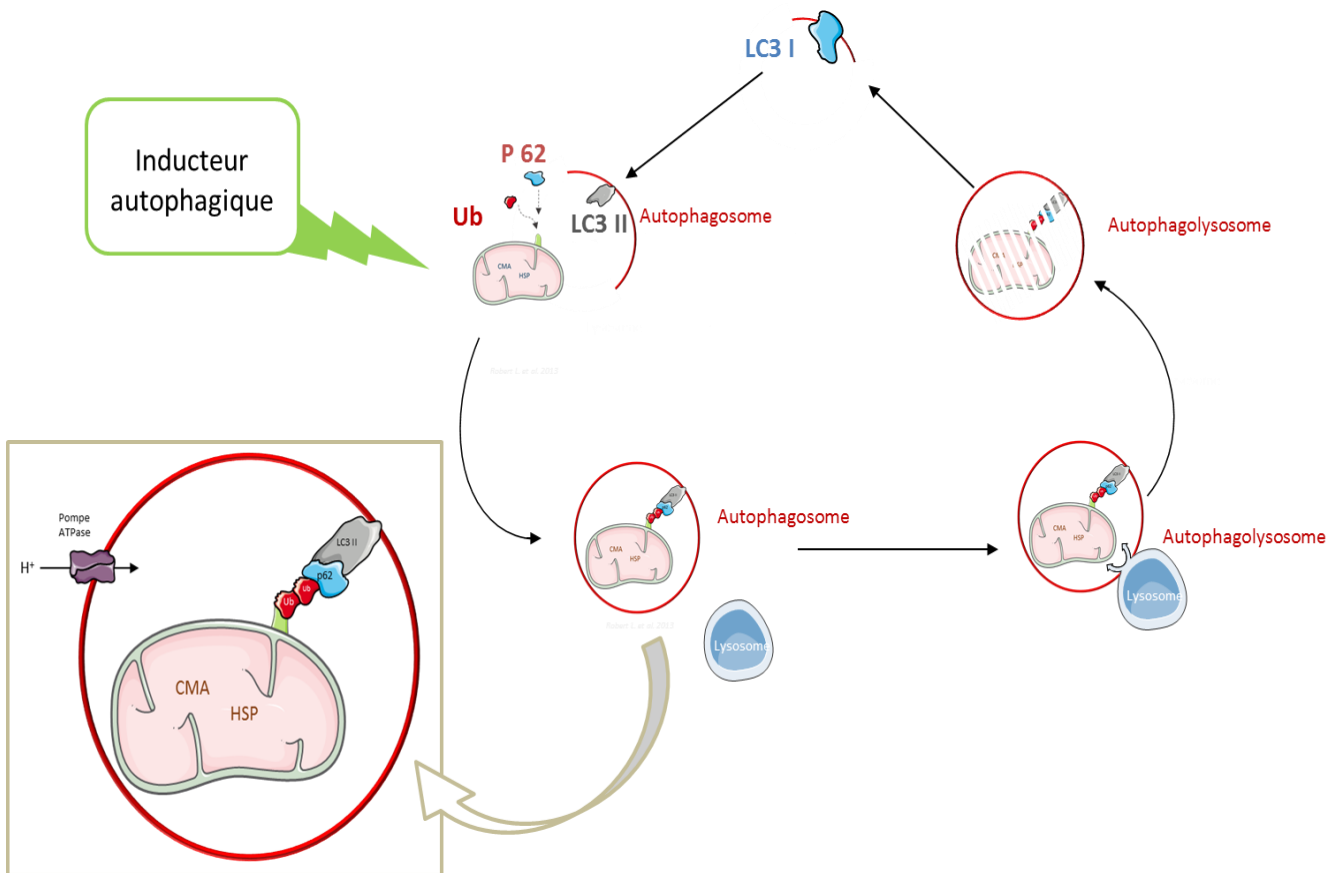


**Figure 13: La machinerie de transport mitochondrial le long des axones (Saxton et Hollenbeck, 2014)**

Un neurone périphérique est constitué du corps cellulaire qui rassemble les signaux provenant des neurones présynaptiques et un axone qui transporte les potentiels d'action à partir du corps cellulaire au terminal synaptique, qui réagit en libérant des signaux chimiques à un neurone post-synaptique. Le développement et la fonction des neurones repose sur le transport des vésicules (jaune), des mitochondries (rouge) et des organites d'endocytose (orange) le long de l'axone. Le but principal de ce type de transport est de livrer des organites et d'autres matériaux nouvellement synthétisés dans le corps cellulaire dans l'axone et vers le terminal (antérograde) pour la réalisation de leurs différentes fonctions, et un transport des composants altérés vers le corps cellulaire (rétrograde) pour la dégradation et le recyclage. Le transport axonal des mitochondries fait intervenir la kinésine-1 et dynéine le long des microtubules. Les partenaires identifiés de la kinésine-1

**Dynamique mitochondriale et transport mitochondrial:** Un autre aspect de la dynamique mitochondriale au-delà de la fusion et de la fission est la mobilité des mitochondries et donc leur distribution cellulaire. Le transport mitochondrial dans les cellules fait intervenir le cytosquelette, mais surtout les microtubules (Hollenbeck et Saxton 2005). Ce transport se fait grâce aux protéines motrices, la kinésine et la dynéine qui hydrolysent l'ATP pour leur déplacement le long des microtubules (Figure 13). Ces protéines sont impliquées dans le transport rétrograde et antérograde des mitochondries dans les neurones. Ces protéines transportent les mitochondries grâce à leur interaction avec des partenaires localisés sur la MEM : Miro/Milton (Schwarz 2013). Ce transport est régulé par le  $Ca^{2+}$  et par la machinerie de contrôle qualité des mitochondries. Ainsi une élévation cytosolique locale du  $Ca^{2+}$  bloque à la fois les mouvements antérogrades et rétrogrades des mitochondries dans les prolongements des neurones (Yi, Weaver, et Hajnóczky 2004). De la même manière, PINK/Parkin, des composants de la machinerie autophagique inhibent la mobilité des mitochondries de par leurs actions inhibitrices sur le complexe Miro/Milton (Xinnan Wang et al. 2011). Il semble que PINK1 phosphoryle Miro permettant ainsi le recrutement de Parkin et la dégradation de Miro par ubiquitinylation (Liu et al. 2012; Xinnan Wang et al. 2011).

La mobilité des mitochondries fait également intervenir les filaments d'actine. Le rôle de la F-actine dans le transport mitochondrial est peut être interdépendante de son rôle dans la fission mitochondriale. En effet, il semble que la F-actine participe à la fission médiée par DRP1 (Li et al. 2015). L'inhibition pharmacologique de la polymérisation de l'actine aboutit à l'élongation des mitochondries, impliquant donc l'actine dans la fission mitochondriale (Korobova, Ramabhadran, et Higgs 2013). La mobilité des mitochondries est essentielle dans les cellules telles que les neurones qui ont de grands prolongements cellulaires non-myélinisés et donc qui requièrent une forte demande d'énergie (Hollenbeck et Saxton, 2005). Dans ce cadre, la fission joue un rôle prépondérant afin de générer des mitochondries plus petites et donc plus facilement transportables au niveau des longs prolongements. Les défauts de fission



**Figure 14: Représentation schématique de l'autophagie et des acteurs de la formation des autophagosomes (Banduseela varuna *et al*, 2013)**

LC3 est clivée par ATG4 (lié autophagy 4), résultant à la formation de LC3-I. ATG7 conjugue ATG5 à ATG12 et est également impliqué dans la conjugaison des lipides membranaires phosphatidyléthanolamine (PE) à LC3-I dans la conversion de LC3-II. Le complexe ATG5-ATG12-ATG16 est nécessaire pour la formation des autophagosomes. LC3-II médie l'allongement de la membrane en associant à membrane autophagosome. Adaptateur protéine p62 se lie directement à des protéines ubiquitinées (Ub) et agit comme un récepteur pour les protéines Ub. En se liant à LC3-II, p62 facilite l'autophagie en localisant dans des compartiments autophagiques, le transport des protéines et organites Ub pour la dégradation.

gènèrent donc une population mitochondriale fortement interconnectée et de ce fait empêchent tout mouvement.

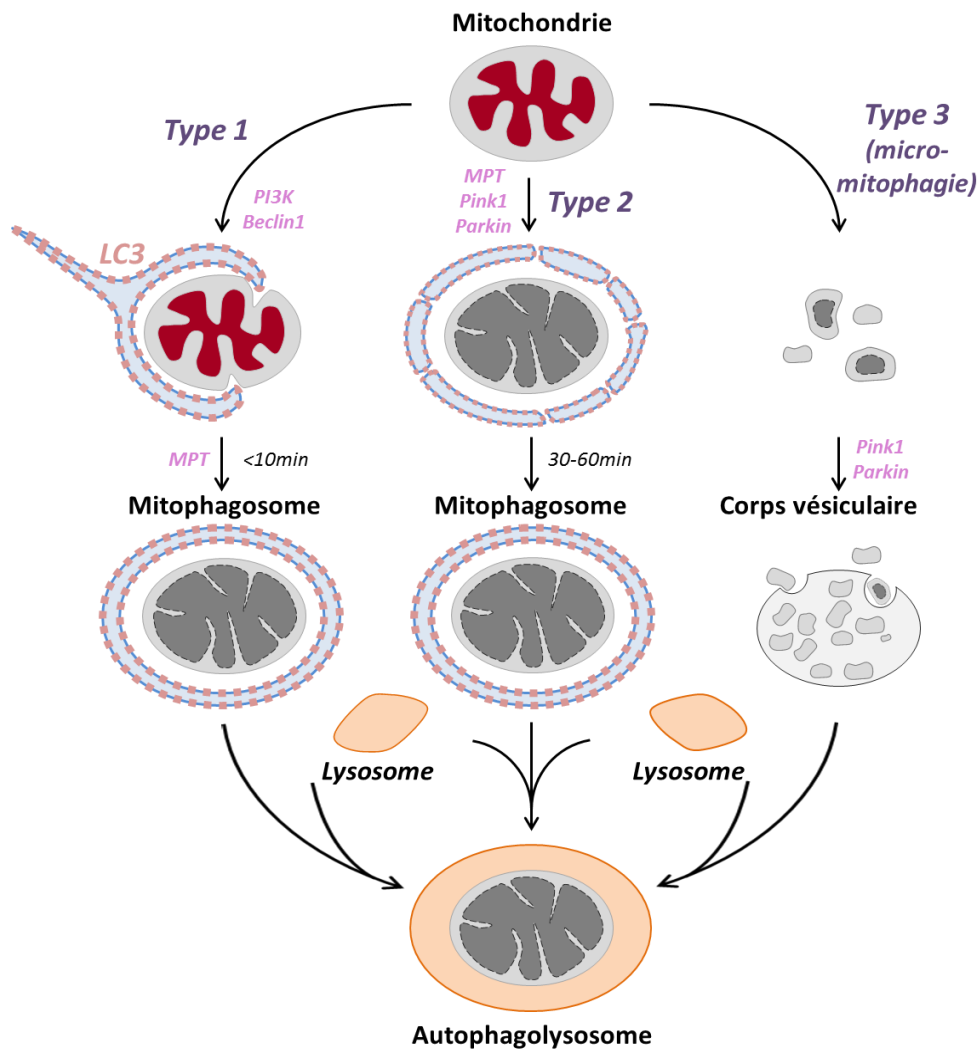
Les défauts de fusion mitochondriale aboutissent également à une baisse du transport des mitochondries. Les mécanismes sont encore mal-connus. Néanmoins des études montrent qu'une dépolarisation de la membrane mitochondriale conduit à une fragmentation associée à une augmentation du volume ce qui limite la mobilité des mitochondries (Safiulina et al. 2006). Dans les neurones de souris *Mfn2*<sup>-/-</sup>, l'augmentation du volume mitochondrial empêche un transfert efficace vers les neurites conduisant à la mort des axones et des dendrites (H. Chen, McCaffery, et Chan 2007). De même d'autres études montrent que le transport des mitochondries par Miro/Milton le long des microtubules dépend de la présence de MFN2. En effet, MFN2 interagit avec le complexe Miro/Milton et serait donc nécessaire au transport axonal des mitochondries. Ces défauts entraînent une neurodégénérescence progressive.

**La Dynamique mitochondriale et le contrôle qualité des mitochondries** : Le contrôle de l'équilibre fusion/fission mitochondriale est particulièrement important dans les pathologies liées au vieillissement et dans les cellules à forte demande énergétique. Dans plusieurs pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou encore dans les processus de vieillissement, une altération des mécanismes de contrôle-qualité, en particulier la mitophagie, a été suggéré comme faisant part intégrante de la physiopathologie. La mitophagie est la dégradation par autophagie des mitochondries altérées. La dégradation des mitochondries par autophagie débute par la formation d'une double membrane appelée autophagosome qui séquestre la mitochondrie altérée. Cette séquestration est suivi d'une fusion avec les endosomes, c'est l'étape de maturation de l'autophagosome qui ensuite va fusionner avec des lysosomes pour la dégradation par les hydrolases contenues dans ces derniers (Lemasters 2005; Rodriguez-Enriquez et al. 2006) (Figure 14). L'autophagie est présente à un niveau basal dans la cellule pour assurer la dégradation et le renouvellement des protéines et des organites altérés ou en

excès. Dans certains cas de stress tels que l'hypoxie, la carence en nutriments, la mitophagie est stimulée et constitue un mécanisme de pro-survie. La dégradation des mitochondries intervient également dans la maturation des érythrocytes ou encore lors de la fécondation des ovocytes (I. Kim, Rodriguez-Enriquez, and Lemasters 2007). Les études montrent que les mitochondries expérimentalement dépolarisées par l'utilisation d'agents protonophores étaient dégradées par la machinerie autophagique. Cette dégradation était précédée d'une fission du réseau mitochondrial. La fission mitochondriale régule le contrôle-qualité des mitochondries. En effet, à l'issue de la fission, deux mitochondries sont générées : une mitochondrie avec un haut potentiel de membrane et une autre présentant une dépolarisation. Cette mitochondrie dépolarisée perd sa capacité de fusion avec le reste du réseau mitochondrial et est alors dégradée par la machinerie autophagique (Twig et al. 2008). Lorsque la mitochondrie est dépolarisée, PINK1, une sérine-thréonine kinase est stabilisée à la MEM, où il recrute une ubiquitine-ligase Parkin (Narendra et al. 2010). Une fois PARKIN recrutée, cette protéine ubiquityle les protéines de la MEM, telles que MFN2 et Miro pour empêcher une fusion mitochondriale, mais aussi pour permettre le recrutement des autophagosomes. L'ubiquitylation permet le recrutement du séquestosome 1 (P62 / SQSTM1). P62 est une des protéines adaptatrices possédant un domaine de liaison de l'ubiquitine (UBA) et un domaine LIR (LC3-interacting-region) qui sert de point d'ancrage pour la membrane autophagosomale. Cette membrane se développe alors pour phagocyter la mitochondrie altérée, puis fusionne avec des lysosomes pour une dégradation des mitochondries (Kirkin et al. 2009). Les fonctions de PINK1 et PARKIN dans l'autophagie ont surtout été étudiées par des expériences de surexpression dans les lignées cellulaires de mammifères. Cependant, leur implication dans l'autophagie est soutenue d'abord par leur implication dans les pathologies neurodégénératives et ensuite par les analyses protéomiques chez les modèles de drosophiles mutées dans ces gènes qui présentent un renouvellement plus lent des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Vincow et al. 2013). Des acteurs de la mitophagie autre que PINK1/PARKIN ont été décrits. Ces

études suggèrent que la dégradation est aussi dépendante de la présence des récepteurs autophagiques sur la MEM. Dans les cellules de mammifères en culture, le récepteur FUNDC1 régule la dégradation





**Figure 15: Les différentes formes de mitophagie (Lemasters, 2014)**

Dans la mitophagie de type 1, l'activation de beclin1 / PI3K conduit à la formation d'un phagophore qui séquestre une mitochondrie dans un mitophagosome souvent en coordination avec la fission mitochondriale. La dépolérisation mitochondriale se produit alors qu'après la séquestration de par l'activation du pore de transition mitochondrial (MPT). Par la suite, l'autophagosome fusionne avec les lysosomes, et la digestion hydrolytique de la mitochondrie piégée se produit.

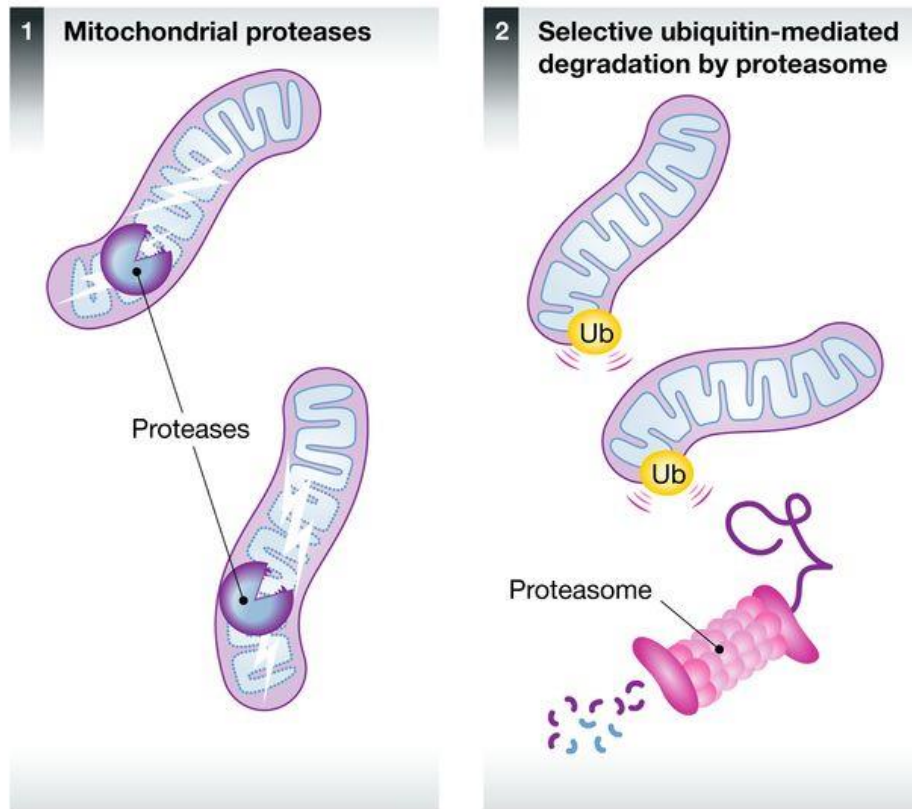
Dans la mitophagie de type 2, l'altération de la mitochondrie provoque la dépolérisation mitochondriale soutenue avec un gonflement du compartiment membrane-matrice interne. Il y a alors recrutement à la membrane externe mitochondriale de membranes LC3-positives qui fusionnent autour de la mitochondrie dépolérisée pour former un autophagosome et une dégradation hydrolytique.

Dans la mitophagie de type 3 ou micromitophagy, MDV contenant oxydé protéines mitochondriales bourgeonnent hors des mitochondries et deviennent alors internalisé dans les corps multivésiculaires. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes pour une dégradation par hydrolyse des fragments mitochondriaux. Cette dégradation est également PINK/PARKIN dépendant.

autophagique des mitochondries en réponse à l'hypoxie. FUNDC1 possède un motif LIR (LC3 interacting-region) qui est important pour le recrutement de LC3 et donc la dégradation des mitochondries. Dans les conditions hypoxiques, la phosphatase mitochondrial PGAM5 (phosphoglycerate mutase family member 5) déphosphoryle le motif LIR, ce qui augmente son association physique avec LC3, stimulant la mitophagie (Liu et al. 2012; G. Chen et al. 2014).

De récentes études distinguent différents types de mitophagie, la mitophagie de type 1 et de type 2 qui font intervenir les autophagosomes et la mitophagie de type 3 (Lemasters 2014) (Figure 15). La séquestration des mitochondries dans les autophagosomes se produit par des mécanismes cellulaires différents dans la mitophagie de type 1 et de type 2. Dans la mitophagie de type 1, la mitochondrie est séquestrée par l'autophagosome et cette dégradation se fait en coordination avec la fission mitochondriale. Des études utilisant un marquage potentiel-dépendant, le TMRM (tetramethylrhodamine methyl-ester) montrent que les mitochondries conservent leur  $\Delta\Psi_m$  pendant la séquestration et que la dépolarisation ne se produit qu'après la séquestration. La mitophagie de type 1 serait Beclin1/PI3K-dépendant.

La mitophagie de type 2 n'est pas associée à la formation de phagophores ou de la fission mitochondriale. Dans ce type de mitophagie, le LC3 se lie directement à la mitochondrie dépolarisée qui est ensuite dégradée par fusion avec les lysosomes. Cette voie de dégradation des mitochondries est indépendante de PI3K (Lemasters 2014). La microautophagie ou la mitophagie de type 3 (mitochondria derived vesicles) facilite l'élimination sélective des composants mitochondriaux endommagés et oxydés. Cette forme de contrôle de la qualité mitochondrial se produit sans dépolarisation mitochondriale ou altération fonctionnelle manifeste. Les vésicules dérivées des mitochondries (VDM) sont libérées par les mitochondries indépendamment de la machinerie de la fission mitochondriale. Le stress oxydatif stimule la formation des MDV qui sont enrichies en protéines mitochondriales oxydés (Soubannier et al. 2012).



**Figure 16: Les autres voies de contrôle-qualité des mitochondries (Sugiura *et al*, 2014)**

- (a) Dégradation par les protéases mitochondriales de la matrice mitochondriale et de l'espace intermembranaire. Ces protéases sont impliquées dans l'élimination des protéines solubles dépliées et oxydées.
- (b) Les protéines de la membrane externe sont éliminées par la voie de l'ubiquitine. La dégradation de ces protéines est effectuée dans le protéasome cytosolique.

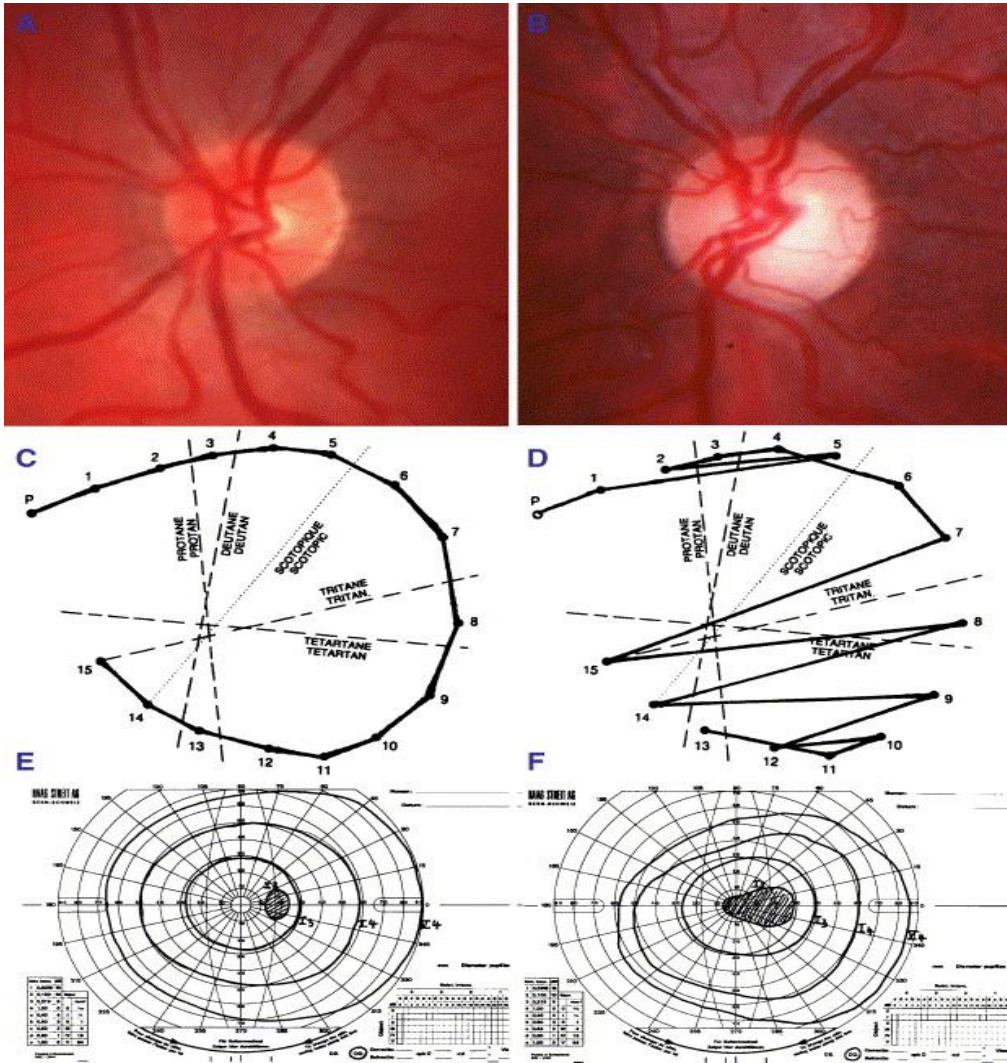
Outre ces mécanismes autophagiques qui concernent l'organite dans son ensemble, d'autres mécanismes de contrôle-qualité existent dont la dégradation médiée par les protéines chaperonnes et celle médiée par le protéasome. Au niveau moléculaire, la dégradation des protéines mitochondriales anormales ou endommagées est prise en charge par le système protéolytique. Des protéines chaperonnes et des protéases ATP-dépendantes présentes dans la matrice et de la membrane interne (IM) des mitochondries dégradent les protéines endommagées, stabilisent les protéines mal repliées (empêchant ainsi leur agrégation), et promouvoit la protéolyse des agrégats de protéines (Sugiura et al. 2014) (Figure 16).

## OPA1 et dégénérescence

### OPA1 dans les pathologies de la dynamique mitochondriale

Les mutations du gène *OPA1* ont été initialement associées à une atrophie optique dominante, un phénotype homogène associant déficience visuelle progressive et bilatérale survenant pendant les deux premières décennies de la vie. Les examens cliniques montrent alors une pâleur du disque optique, une perte du champ visuel central et un défaut de la vision des couleurs (Lenaers et al. 2012). La déficience visuelle est irréversible et généralement modérée, mais très variable au sein des familles, allant de l'expression subclinique à la cécité légale. À partir de 2003, des cas d'atrophie optique associés à des signes extra-oculaires impliquant des mutations d'*OPA1* sont signalés, marquant l'apparition d'un nouveau phénotype clinique, syndrome ADOA *plus* (MIM # 125250). En 2011, des mutations bi-alléliques d'*OPA1* sont associées avec le syndrome de Behr, une entité clinique sévère qui se caractérise par des débuts très précoces. Récemment des études ont montré que des mutations *OPA1* étaient impliquées dans d'autres atteintes systémiques, y compris la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson ou la démence (Carelli, Musumeci, et al. 2015). Ainsi, le spectre des troubles liés à *OPA1* est très variable. Malgré cette grande hétérogénéité clinique, la plupart des dysfonctionnements affectent les systèmes nerveux central, neurosensoriel périphérique et autonome. La caractérisation des différents variants du gène *OPA1* dans l'atrophie optique autosomique dominante a permis de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques différents dans chacune de ces entités cliniques. L'étude de ces pathologies a également permis de souligner les nombreuses fonctions de la protéine OPA1 dans l'homéostasie cellulaire.

**L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA):** L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) ou atrophie optique de Kjer, est la forme la plus fréquente de neuropathie optique héréditaire (Kjer 1959). Elle est caractérisée par la pâleur du nerf optique, une perte du champ visuel central ou centrocecal, des déficits de la vision des couleurs et une perte progressive de l'acuité visuelle dans



**Figure 17: Diagnostic ophtalmologique (Olichon *et al*, 2006)**

Individu sain (A, C, E) et patient ADOA portant une mutation *OPAI* (B, D, F)

Les photographies des fonds d'œil (A-B) montrent que le disque du nerf optique du patient est pâle et cette pâleur prédomine dans le côté temporel. Les tests de vision des couleurs à l'aide du panneau des 15 teintes de Farnsworth (C-D) montrent une altération de cette faculté chez les ADOA avec une classification désorganisée et une confusion dans l'axe bleu-jaune (tritanopie). Les tests de champ visuel à d'un appareil Goldman (E-F) montrent chez l'individu sein une petite tâche aveugle (une petite zone hachurée) tandis que chez le patient, elle s'étend dans le champ visuel central pour former un scotome centrocecal (zone hachurée).

les premières décennies de la vie en raison de la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) (Figure 17). Dans la plupart des cas, les patients ADOA présentent une diminution progressive et insidieuse de la qualité de vision, qui reste irréversible. La prévalence de la maladie se situe entre 1 /10 000 et 1/50 000 (Chao de la Barca et al. 2015). Aucun traitement efficace n'a été mis au point, malgré un diagnostic élaboré et une connaissance des mécanismes de la pathologie. L'ADOA est une maladie insidieuse du fait de l'imprécision de l'âge de début. Elle est généralement découverte pendant l'enfance, dans la première dizaine de vie. Il arrive parfois que le diagnostic se fasse chez le jeune adulte suite à une perte légère de la vision (Kline et Glaser 1979). L'ADOA présente une pénétrance incomplète et une expressivité intra et interfamiliale très variable pouvant aller de porteurs asymptomatiques à la cécité légale (Chao de la Barca et al. 2015). Cette variabilité est attribuée aux facteurs environnementaux et au fond génétique.

À ce jour, deux gènes (*OPA1* et *OPA3*, OMIM #606580) et trois loci (*OPA4*, OMIM %605293; *OPA5*, OMIM %610708 et *OPA8*, OMIM %616648) ont été associés à une atrophie optique autosomique dominante. Les mutations sur les gènes *OPA2* (OMIM %311050), *OPA6* (OMIM %258500) et *OPA7* (OMIM#612989) sont impliquées dans l'atrophie optique liée à l'X ou récessive. Les mutations d'*OPA1* restent plus communes dans le diagnostic des patients présentant une atrophie optique. Les atteintes ne sont néanmoins pas restreintes aux cellules ganglionnaires de la rétine. À partir de 2003, le criblage systématique signale des cas d'atrophie optique associés à des signes extra-oculaires impliquant des mutations d'*OPA1*, marquant l'apparition d'un nouveau phénotype clinique, syndrome DOA *plus* (MIM # 125250). En effet, en 2003, des études d'Amati-Bonneau rapportent des cas d'atrophie optique dominante associés à une surdité neurosensorielle (Amati-Bonneau et al. 2005; Amati-Bonneau et al. 2003). Cette étude rapporte une mutation hétérozygote faux-sens de l'exon 14 (c. 1334G>A) d'*OPA1*, conduisant à un changement d'acide aminé très conservé en position 445 (p.R445H) dans le domaine GTPase de la protéine *OPA1*. A la suite de ce rapport, très rapidement, d'autres études décrivent des atteintes multi-systémiques telles qu'une ataxie, une myopathie, une

ophtalmoplégie externe et une neuropathie périphérique (Amati-Bonneau et al. 2005; Payne et al. 2004; Hudson et al. 2008). Ces formes sévères sont souvent dues à des mutations dans le domaine GTPase de la protéine OPA1 (Yu-Wai-Man et al. 2011). En 2011, Marelli *et al.* lie *OPA1* avec le syndrome de Behr, une entité clinique qui se caractérise par des débuts très précoces (Marelli et al. 2011).

**Le syndrome de Behr:** Le syndrome de Behr est caractérisé par une atrophie optique associée à des manifestations neurologiques. Le syndrome de Behr (BS) a d'abord été décrit en 1909 par l'ophtalmologiste Carl Behr qui a diagnostiqué une forme d'atrophie optique familiale compliquée chez six garçons. Ce syndrome était caractérisé par une apparition très précoce des signes cliniques. Les manifestations neurologiques peuvent inclure : une épilepsie myoclonique, une paraplégie spastique progressive due à une atteinte du tractus pyramidal, une dysarthrie, des lésions du tractus extrapyramidal, une ataxie, une incontinence urinaire, un retard mental, une perte sensorielle de la corne postérieure de la moelle ou contractures musculaires, principalement au niveau des membres inférieurs (Behr 1909). Des études d'imagerie par résonance magnétique montrent des changements de la substance blanche et une atrophie cérébelleuse, une atrophie généralisée du cerveau ou la dilatation de la gaine du nerf optique. Le mode de transmission est considéré comme autosomique récessive, mais l'autosomique dominance a été reportée (Marelli et al. 2011). Cette pathologie touche de façon égale les deux sexes. A nos jours, seule une quarantaine de cas a été décrite (Kleffner *et al.*, 2015). Le syndrome de Behr est génétiquement hétérogène et, dans certains cas, des mutations dans les gènes *OPA3*, *C12ORF65* et *C19ORF12* ont aussi été rapportés (Kleffner et al. 2015; Anikster et al. 2001; Schaaf et al. 2011; Bonifert et al. 2014). Dans les cas du syndrome de Behr, une atteinte mitochondriale est soupçonnée. L'implication d'*OPA1* dans le syndrome de Behr a été établie à l'issue d'un séquençage de deux frères diagnostiqués avec le syndrome de Behr classique. Les deux frères portaient une seule mutation hétérozygote d'*OPA1* pathogène, la c.1652G>A conduisant à un changement d'un acide aminé en position 551 (p.Cys551Ty) dans le domaine GTPase catalytique (Marelli et al. 2011; Yu-Wai-Man et al. 2011). La



description de ces formes est ensuite suivie d'une description clinique de quatre patients confirmés pour le syndrome Behr impliquant des mutations hétérozygotes-composites d'*OPA1* (Bonneau et al. 2014). Ces patients portaient une mutation faux-sens dans le domaine GTPase et une mutation non-sens tronquante. Parmi ces quatre patients, la mutation récurrente était la mutation faux-sens p.Ile382Met (c.1146A>G) qui avait été rapporté précédemment par Schaaf *et al.* (Schaaf et al. 2011). Dans cette étude, Schaaf rapporte un phénotype neuromusculaire sévère à début précoce, également associé à des mutations bi-alléliques d'*OPA1*, impliquant la mutation p.Ile382Met. La caractérisation moléculaire et biochimique de ces patients n'a montré aucune modification du nombre de copies d'ADNmt ni de délétion de l'ADNmt ou encore des déficits de phosphorylation oxydative, malgré un phénotype clinique sévère (Schaaf et al. 2011).

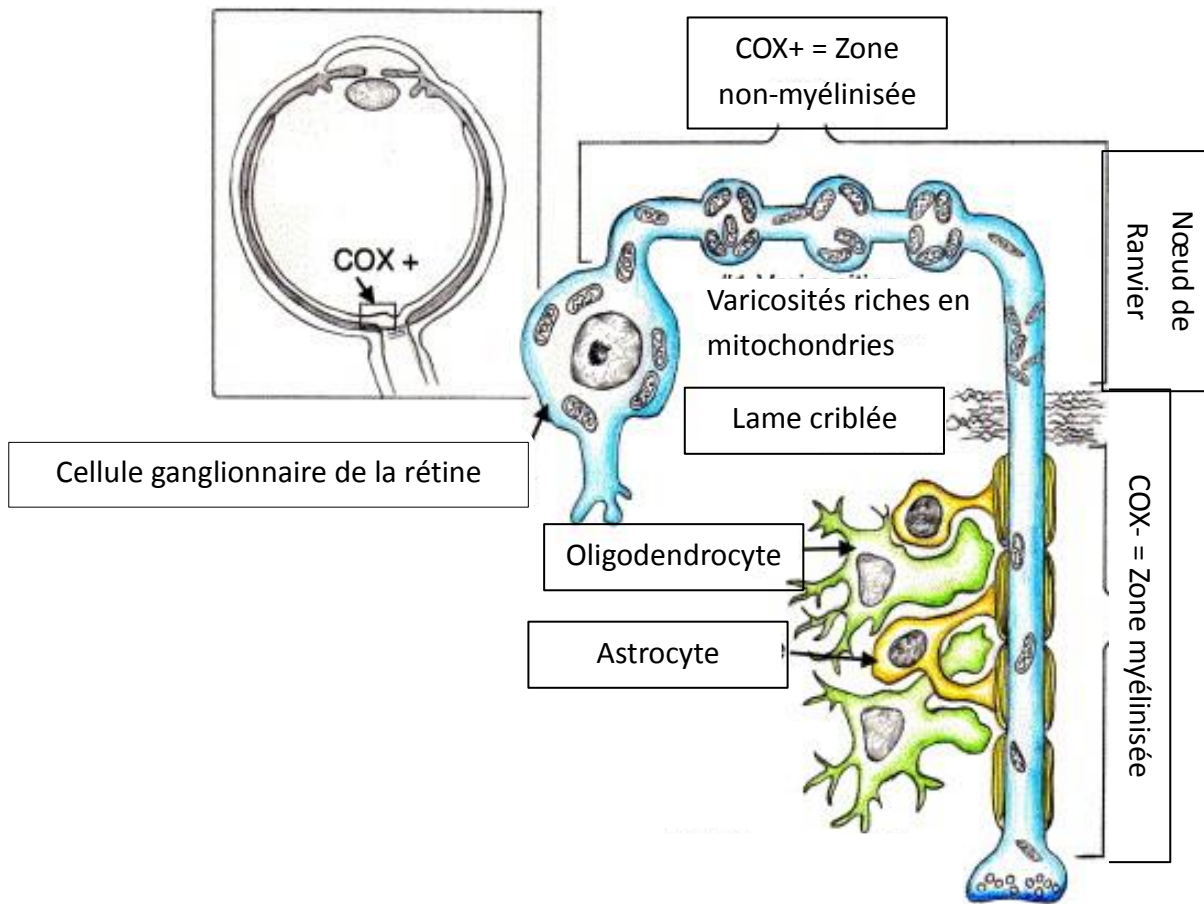
### **Physiopathologie des pathologies liées aux mutations *OPA1***

Les mitochondries répondent aux demandes variables d'énergie des cellules. Cette réponse adaptative implique une régulation très fine de la structure, de la distribution et la fonction des mitochondries. Cette plasticité mitochondriale repose essentiellement sur les événements de fusion et de fission mitochondriale. Plusieurs hypothèses physiopathologiques liées à des mutations d'*OPA1* ont été soulevées. Ces mécanismes reposent sur les différents rôles de la protéine *OPA1*, aussi bien dans la fusion mitochondriale, que le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial et un défaut du contrôle qualité des mitochondries. D'autres études, elles reposent essentiellement sur les propriétés et spécificités des tissus touchés et leur dépendance à l'énergie.

**Haplo-insuffisance ou effet dominant-négatif?** À ce jour, la base de données dédiée à *OPA1* (<http://opa1.mitodyn.org/>) inscrit un total de 377 *OPA1* variants génétiques (Ferré et al. 2015), dont 65% sont considérés comme pathogènes (Chao de la Barca et al. 2015). Plus des deux tiers des mutations sont situées dans le domaine dynamine et le domaine GTPase. Environ 50% des variants pathogènes

conduisent à une séquence tronquée d'*OPA1*, en résulte donc une haplo-insuffisance due à une dégradation de l'ARN messager (Pesch et al. 2001; Ferré et al. 2005). L'équipe de Yu-Wai-Man, sur des études d'ADOA syndromique, montre que dans cette entité clinique, les mutations faux-sens dans le domaine GTPase sont significativement plus communes et il suggère donc un mécanisme dominant négatif dans la maladie (Amati-Bonneau et al. 2005; Yu-Wai-Man et al. 2010). Pendant longtemps, les mutations du gène *OPA1* sont montrées comme étant transmises uniquement sur le mode dominant, la létalité étant une caractéristique de l'homozygotie. Récemment le mode bi-allélique a été montré dans les cas précoces des syndromes sévères de Behr liés à *OPA1* (Yu-Wai-Man et al. 2014 ; Bonneau et al. 2014). D'autres mécanismes génétiques pourraient expliquer l'émergence des nouveaux phénotypes dans les neuropathies optiques: les mutations *OPA1* introniques (deep intronic *OPA1* mutations) et un modificateur intralocus d'*OPA1* (intralocus *OPA1* modifier). Dans le premier cas, la mutation crée un nouveau site d'épissage, conduisant à la production de transcrits d'*OPA1* aberrants avec une conservation de la séquence intronique et donc un décalage du cadre de lecture. Le second cas fait état de l'effet combiné de la mutation faux-sens p.Ile382Met (NM\_015560.2) avec une seconde mutation *OPA1*. La mutation p.Ile382Met seule ne cause pas de phénotype, mais elle pourrait agir comme « modérateur phénotypique » lorsqu'elle est couplée à une seconde mutation du gène *OPA1* (Bonifert et al. 2014).

D'autres facteurs peuvent également contribuer à la diversité phénotypique des troubles liés à *OPA1* et parmi ceux-là, on peut compter l'instabilité de l'ADN mitochondrial et l'altération ultrastructurale des crêtes qui restent dépendantes des différentes fonctions d'*OPA1*. Sachant qu'*OPA1* est une protéine qui subit beaucoup de modifications post-traductionnelles, l'hétérogénéité des phénotypes peut également être expliquée par son expression différentielle (Amati-Bonneau et al. 2008; Elachouri et al. 2011).



**Figure 18: Distribution schématique des mitochondries dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Carelli *et al*, 2004)**

## Pourquoi les CGRs sont les premières cellules impactées dans les mutations

**OPA1?** Les patients atteints d'une pathologie mitochondriale confirmée développent fréquemment une perte plus ou moins sévère de l'acuité visuelle, due à une dégénérescence du nerf optique. Ce qui est intéressant, c'est le fait que toutes les neuropathies mitochondriales partagent cette dégénérescence sélective des cellules ganglionnaires de la rétine, indépendamment des voies moléculaires impliquées (Maresca et al. 2013; Yu-Wai-Man et al. 2011). Les mutations *OPA1* ont été associées à une réduction de la taille de la base du nerf optique et une diminution du diamètre des artères péripapillaires (Barboni et al. 2010; Rönnbäck, Grønskov, et Larsen 2014). De nouvelles méthodes d'imagerie intraoculaire, y compris la tomographie par cohérence optique (OCT), permettant une caractérisation à haute résolution de la couche des fibres nerveuses de la rétine *in vivo*, ont montré un amincissement de la fibre nerveuse de la rétine ; cette atteinte étant plus sévère chez les patients avec une mutation à effet dominant-négatif (Barboni et al. 2014). Cette observation est en cohérence avec des études précédentes qui montraient que la dégénérescence sélective des CGRs n'était pas due à une diminution de l'expression d'*OPA1* (Kamei et al. 2005). Le mécanisme conduisant à la dégénérescence des CGRs dans les pathologies de la dynamique mitochondriale et plus particulièrement l'ADOA et l'ADOA+ reste encore mal connu. Cependant, l'hypothèse commune serait que le déficit énergétique est à l'origine de la perte des CGRs, compte tenu de la dépendance de ces dernières à l'ATP de par la structure particulière des CGRs. Les cellules ganglionnaires de la rétine sont caractérisées par de longs prolongements axonaux non-myélinisés. La première partie de leurs axones, de la tête du nerf optique à la lame criblée est démyélinisée et particulièrement riche en mitochondries pour fournir l'ATP nécessaire à la transmission des signaux visuels (Figure 18). Or, les mutations d'*OPA1* ont été associées à une diminution de l'efficacité bioénergétique (Chevrollier et al. 2008). Ces zones non-myélinisées rendent donc les CGRs très vulnérables aux mutations des composants de la dynamique mitochondriale.

De plus, l'apport d'énergie à l'extrémité des axones nécessite également un transport des mitochondries par le cytosquelette. Ce transport axonal est impacté dans les maladies de la dynamique mitochondriale, soit à cause d'une absence de fission des mitochondries ou un effet direct du déficit énergétique qui empêcherait les complexes Miro/Milton dépendant de l'ATP mitochondrial de tracter les mitochondries le long des axones (Saxton et Hollenbeck, 2012).

**L'hypothèse d'une sensibilité à l'apoptose:** OPA1 est impliquée dans la régulation de la survie cellulaire en séquestrant le cytochrome *c* dans les crêtes, mais également à travers son interaction avec le facteur pro-apoptotique (AIF) (Y. Lee et al. 2004; Zanna et al. 2008). Le rôle anti-apoptotique d'OPA1 proviendrait de son action sur le maintien de l'intégrité de la MIM. En effet, des expériences de siRNA de la protéine OPA1 dans les cellules HeLa, montrent que l'absence d'OPA1 conduit à une désorganisation des crêtes mitochondriales, associée à une libération du cytochrome *c* vers le cytosol (Olichon et al. 2003).

La sensibilité à l'apoptose des cellules portant les mutations OPA1 repose également sur la dérégulation de l'homéostasie calcique (Fülöp et al. 2015; Kushnareva et al. 2013; Dayanithi et al. 2010) et une augmentation de la production de ROS. Chez la drosophile adulte, la mutation *OPA1* provoque une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'une fragmentation mitochondriale associée à une perte des photorécepteurs en particulier, les cônes (Yarosh et al. 2008). L'apoptose accrue dans les modèles d'*OPA1* a également été attribuée à un défaut du contrôle qualité des mitochondries, reflétée par une accumulation des autophagosomes dans les tissus des souris (White et al. 2009; Sarzi et al. 2012).

**L'hypothèse d'un déficit énergétique:** La protéine OPA1 joue un rôle clé dans la phosphorylation oxydative mitochondriale de par son rôle dans le maintien de l'intégrité de la MIM, mais aussi de par son interaction avec les complexes I, II, et III. Cette interaction semble stabiliser les complexes (Zanna et al. 2008). Une surexpression ou une délétion d'*OPA1* conduisent à un défaut de synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire (Lodi et al. 2004) (Amati-Bonneau et al. 2005). Les défauts

énergétiques chez les mutants *OPA1* sont dus à une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, soit lié à une diminution de l'activité du complexe I, ou du complexe IV (Zanna et al. 2008; Chevrollier et al. 2008). La diminution de l'activité du complexe IV est également retrouvé dans le nerf optique du modèle de souris *Opa1<sub>delTTAG</sub>* (Sarzi *et al.*, 2012). L'activité respiratoire du complexe IV et les sous-unités à l'état d'équilibre sont reportées réduites sans altération de la taille, de la quantité ou de la transcription de l'ADNmt dans les fibroblastes hétérozygotes pour les mutations *OPA1* (Agier et al. 2012). Comment *OPA1* affecte l'activité du complexe IV reste une question, vu l'absence d'interaction directe de ce complexe avec *OPA1*. Des études de surexpression d'*OPA1* sur un modèle de souris KO-conditionnel du facteur d'assemblage du complexe IV, *Cox15*, montraient une correction de la structure des crêtes et une amélioration de la respiration mitochondriale. Ces données suggèrent donc qu'*OPA1* de par son effet sur la membrane interne, participe à l'assemblage du complexe (Civiletto et al. 2015).

**L'hypothèse du défaut de maintenance de l'ADNmt:** Les nucléoïdes sont associés à la MIM (Meeusen and Nunnari 2003; Brown et al. 2011; Kopek et al. 2012). Des expériences de siRNA spécifiques de l'exon 4b d'*OPA1* ont conduit à une déplétion de l'ADNmt suite à une inhibition de la réplication de l'ADNmt. Certaines mutations d'*OPA1* ont été aussi associées à une accumulation de délétions multiples de l'ADNmt dans les muscles (Hudson et al. 2008 ; Amati-Bonneau et al. 2008). Ces études en plus des preuves d'une altération du nombre de copies d'ADNmt dans les cellules de patients portant des mutations *OPA1*, suggèrent un rôle d'*OPA1* dans la maintenance de l'ADNmt. Le défaut de maintenance dans les mutations du gène *OPA1* reposerait sur les observations de mitochondries étant dépourvues d'ADNmt, suggérant un défaut dans la ségrégation de l'ADNmt (Elachouri et al. 2011; Chen et al. 2007; Tauber et al. 2012). L'absence de fusion donnerait des nucléoïdes multi-génomiques, favorisant ainsi des délétions ou des duplications de l'ADNmt par le biais de recombinaisons homologues (Vidoni et al. 2013). Le défaut de la maintenance de l'ADNmt seraient dû à une modification du taux des échanges du génome mitochondrial, qui s'effectue par la complémentation ou l'élimination des

molécules d'ADNmt altérées par mitophagie (Suen et al. 2010). La complémentation induite par la fusion mitochondriale permettrait des échanges soit de copies d'ADNmt sauvages ou d'enzymes dédiées à la réparation de l'ADNmt ; or dans les mutations d'*OPA1*, cette fusion mitochondriale est moins efficace (R. W. Gilkerson et al. 2008).

**Les autres hypothèses:** Des études *in vivo* chez le rat montrent que la dégénérescence du nerf optique serait due à une augmentation de la réponse autophagique et que cette dernière est dépendante des influx calciques lors d'un stress aigu (Knöferle et al. 2010). Il est donc concevable que les mêmes mécanismes soient en jeu dans l'ADOA. Outre la modification de l'homéostasie calcique, d'autres facteurs tels qu'une augmentation de la production de ROS, une maturation synaptique et une dendritogénèse compromise ont également été signalés récemment comme prenant part dans la sensibilité à l'apoptose des cellules nerveuses. Des études sur des neurones corticaux primaires de rongeurs montrent que l'inactivation d'*OPA1* conduit à la fragmentation des mitochondries qui deviennent moins abondants le long des dendrites. L'altération de la distribution et de la dynamique mitochondriale se traduit par une expression réduite des complexes respiratoires mitochondriaux ainsi qu'une diminution de la quantité d'ADNmt, une diminution du  $\Delta\Psi_m$  et des niveaux de ROS diminués. Le début de la synaptogenèse est altérée et est caractérisée une diminution de l'expression des protéines structurelles pré- et post-synaptiques. L'extinction d'*OPA1* dans ces cellules aboutit à terme à une altération de la maturation neuronale (Ambre M. Bertholet et al. 2013). Toutes ces données produites depuis 15 ans illustrent la profonde complexité de mécanismes physiopathologiques associées aux mutations d'*OPA1* (Mishra and Chan 2014b; Varanita et al. 2015; Ambre M. Bertholet et al. 2013; Kushnareva et al. 2013).

## Problématiques de la thèse

L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) est une maladie rare (OMIM# 125250) essentiellement associée aux mutations d'*OPA1* (OMIM #605290) qui conduit à la dégénérescence des CGRs qui constituent l'essentiel des cellules du nerf optique. Cette pathologie qui jusqu'alors affectait spécifiquement les cellules ganglionnaires de la rétine et du nerf optique s'est étendu à des tableaux cliniques neurologiques plus complexes avec une atteinte du système nerveux central, périphérique et autonome. Plusieurs mutations *OPA1*, en particulier dans le domaine GTPase ont été associées en plus d'une atrophie optique, à une ophtalmoplégie progressive externe, une ataxie, une surdité neurosensorielle, une neuropathie sensitivomotrice et une myopathie. Cette forme syndromique, appelée *DOA plus* est due à des mutations hétérozygotes au niveau du gène *OPA1*. Récemment, des mutations bi-alléliques d'*OPA1* ont été rapportées ; ces mutations associent un tableau clinique plus sévère et avec une apparition des symptômes très précoce qui s'apparentent au syndrome de Behr (Schaaf et al. 2011; Bonneau et al. 2014). The packaging of mitochondrial DNA (mtDNA) into DNA-protein assemblies called nucleoids provides an efficient segregating unit of mtDNA, coordinating mtDNA's involvement in cellular metabolism. From the early discovery of mtDNA as "extranuclear" genetic material, its organization into nucleoids and integration into both the mitochondrial organellar network and the cell at large via a variety of signal transduction pathways, mtDNA is a crucial component of the cell's homeostatic network. The mitochondrial nucleoid is composed of a set of DNA-binding core proteins involved in mtDNA maintenance and transcription, and a range of peripheral factors, which are components of signaling pathways controlling mitochondrial biogenesis, metabolism, apoptosis, and retrograde mitochondria-to-nucleus signaling. The molecular interactions of nucleoid components with the organellar network and cellular signaling pathways provide exciting clues to the dynamic integration of mtDNA into cellular metabolic homeostasis., The mitochondrial nucleoid appears to consist of two regions: a core domain (with



transcription and replication factors) and a peripheral zone (with proteins that signal to the rest of the cell) (R. Gilkerson et al. 2013; Yu-Wai-Man et al. 2014). Les explorations cellulaires et moléculaires ont permis de mettre en évidence :

- Une instabilité de l'ADNmt
- Une sensibilité à l'apoptose
- Des défauts de la phosphorylation oxydative
- Un défaut de fusion des mitochondries

L'ensemble de ces atteintes constituent les hypothèses physiopathologiques qui mènent à une altération progressive des mitochondries et donc à une perte des CGRs. Ces différentes altérations ne sont néanmoins pas communes à toutes les mutations *OPA1*. La caractérisation du modèle murin d'*OPA1* qui présente les mêmes atteintes multi-systémiques que certains patients DOA *plus* a permis de soulever une nouvelle piste ; celle d'une altération des voies autophagiques (Sarzi et al. 2012).

Ce manuscrit présente les travaux menés pour répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'impact de différentes mutations du gène *OPA1* sur la distribution et l'organisation des nucléoïdes ?
- Quels sont les niveaux de mitophagie/autophagie dans les cas syndromiques d'atrophie optique : le syndrome ADOA *plus* et le syndrome de Behr
- La correction du défaut de fusion améliore-t-elle le défaut de la phosphorylation oxydative dans l'ADOA *plus* : piste thérapeutique possible ?
- Comment les protonophores le CCCP et le FCCP activent-ils les voies autophagiques sélectives (mitophagie)?

*RESULTATS ET*

*DISCUSSION*

Les mutations d'*OPA1* et le génome  
mitochondrial

# Article 1

## Cell and mitochondrial network size and shape control mitochondrial nucleoid number

Mariame Selma KANE<sup>1,4</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1,3,4</sup>, Marc FERRE<sup>1,4</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Julien CASSEREAU<sup>3,4</sup>, Christophe VERNY<sup>3,4</sup>, Patrizia BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2,4</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2,4</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2,4</sup> Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,4</sup>

**Soumis à Mitochondrion**

Espèce	Type cellulaire	ADNmt/cellule	ADNmt/nucléotide	références
humain	A2780	500	1.4	(Satoh et Kuroiwa, 1991)
humain	Fibroblastes (f)	1961	2.4	(Legros <i>et al</i> , 2004)
humain	fibroblastes	2721	1.4	(Kukat <i>et al</i> , 2011)
humain	HeLa	2637	5.7	(Legros <i>et al</i> , 2004)
humain	HeLa	8800	-	(Bogehagen <i>et al</i> , 1974)
humain	143B	4126	7.5	(Legros <i>et al</i> , 2004)
souris	3T3	821	3	(Brown <i>et al</i> , 2011)
souris	L	1100	-	(Bogehagen <i>et al</i> , 1974)

**Tableau : Quantification de la quantité d'ADNmt par cellule et par nucléotide (modifié d'après Bogehagen 2012)**

## Introduction

L'assemblage de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans des complexes nucléo-protéiques appelés nucléoïdes fournit une unité de ségrégation efficace de l'ADNmt et donc une meilleure coordination de la participation de l'ADNmt dans le métabolisme cellulaire (R. Gilkerson et al. 2013). Le rôle crucial de l'ADNmt dans le métabolisme cellulaire et la bioénergétique, ainsi que son importance croissante en physiopathologie humaine, motive les démarches expérimentales pour une meilleure compréhension de la complexité de son organisation et l'intégration de l'ADNmt à la fois dans le réseau mitochondrial et plus largement dans les cellules. Un nucléoïde contient une à dix molécules d'ADNmt dans les lignées primaires ou immortalisées humaines (D. F. Bogenhagen 2012; Prachar 2010), mais ce chiffre de même que le nombre de nucléoïdes restent très controversés (voir tableau cf) (Legros et al. 2004; Brown et al. 2011; Ban-Ishihara et al. 2013).

Les premières approches de quantification du nombre de molécules d'ADNmt par nucléoïde utilisaient une quantification de la fluorescence de nucléoïdes marqués par le bromure d'éthidium et ensuite cette fluorescence est rapportée à des quantités connues d'ADN de phages. Cette étude montrait qu'un nucléoïde comptait 1,4 molécule d'ADNmt, suggérant donc une à deux molécules par nucléoïde (Satoh et Kuroiwa 1991). Cette étude est en accord avec les études *in vitro* qui montrent que le nucléoïde était composé d'une seule et unique molécule d'ADNmt qui est compactée par TFAM (Kukat et al. 2015). D'autres études qui se sont basées sur cette approche montrent que les cellules qui se divisent rapidement, comme les cellules HeLa, contiennent 2 à 10 ADNmt par nucléoïde (Iborra, Kimura, et Cook 2004) (Legros et al. 2004; R. W. Gilkerson et al. 2008). Ces discordances viendraient de plusieurs paramètres. Une première divergence viendrait de la quantification de la quantité d'ADNmt par cellule qui est mesurée par PCR quantitative. Plusieurs étapes dans ce protocole incluant la technique d'extraction de l'ADN, l'efficacité et la spécificité de la qPCR pourraient être source de variabilité. La PCR quantitative en temps réel PCR (qPCR) est couramment utilisé pour déterminer nombre de copies d'ADN mitochondrial des cellules (ADNmt). Cette technique consiste à obtenir le

rapport d'une variable inconnue (nombre de copies d'un gène de l'ADNmt) à un paramètre connu (nombre de copies d'un gène de l'ADN nucléaire) dans un échantillon d'ADN génomique. Des études utilisant différents protocoles d'extraction de l'ADN ont montré que la préparation de l'échantillon d'ADN pouvait influencer de manière significative la détermination du nombre de copies d'ADNmt par qPCR (Guo et al. 2009). Les divergences sur le nombre de nucléoïdes par cellule viendraient d'une sous-estimation en microscopie optique. En effet, la majorité de ces travaux ont été effectués en microscopie optique à épi-fluorescence et confocale qui sont caractérisées par une résolution assez réduite surtout dans l'axe Z. L'acquisition sur une cellule avec une résolution de 200 nm dans l'axe x-y et de 800 nm dans l'axe Z, ne permet pas de distinguer des nucléoïdes trop proches. Or les récentes études montrent que les nucléoïdes auraient tendance à s'agréger (Kukat et al. 2011).

De développement plus récent, la microscopie à super-résolution n'a pas permis d'établir un consensus, car là encore, les chiffres divergent selon le type et les modèles cellulaires utilisés, suggérant donc que d'autres facteurs autres que technique définiraient ces résultats. Les publications ne sont actuellement pas suffisamment nombreuses pour conclure. L'étude physiopathologique des maladies mitochondriales par exemple a montré l'importance d'une régulation du nombre de copies d'ADNmt dans les cellules et d'une régulation par nucléoïde, mais aussi de la distribution de ces nucléoïdes pour une meilleure ségrégation lors des divisions cellulaires par exemple. Les acteurs de la dynamique mitochondriale, OPA1 en particulier semble jouer un rôle prépondérant dans cette régulation de par son implication dans l'ancrage de l'ADNmt à la MIM (Elachouri et al. 2011). Cette même étude implique le domaine codé par variant 4b d'OPA1 dans la réplication et la distribution du génome mitochondrial.

Les cas sévères de pathologies associées aux mutations du gène *OPA1*, en plus d'un défaut énergétique, montrent une accumulation de délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle (Hudson et al. 2008 ; Amati-Bonneau et al. 2008). Les études de la

quantité d'ADNmt de cellules de patients montrent des données contradictoires, certaines études montrent que les mutations *OPA1* induiraient une augmentation de la quantité d'ADNmt alors que d'autres rapportent une baisse (Sitarz et al. 2012) (J. Y. Kim et al. 2005). Une déplétion complète d'*OPA1* dans le modèle zebrafish d'atrophie optique, ne corrèle pas avec une variation de la quantité d'ADNmt (Rahn, Stackley, et Chan 2013) alors que les modèles murins d'atrophie optique due à des mutations *OPA1* présentent une diminution de la quantité d'ADNmt avec une spécificité tissulaire (Alavi et al. 2007; Sarzi et al. 2012; L. Chen et al. 2012; Davies et al. 2007). En effet, les tissus cardiaques présentent une forte déplétion de la quantité d'ADNmt (L. Chen et al. 2012). Les déplétions d'*OPA1* sont caractérisées non seulement par une absence de fusion du réseau mitochondrial, mais aussi par l'absence de nucléoïdes dans certaines des mitochondries isolées (H. Chen, McCaffery, et Chan 2007). Au vue de ces éléments, nous avons voulu comprendre comment les différentes mutations d'*OPA1* affectaient l'organisation et la distribution des nucléoïdes. Nous avons déjà mis au point une méthode normalisée pour analyser en 3D l'organisation du réseau mitochondrial (Chevrollier et al. 2012). Nous avons adapté cette approche à l'analyse d'images des nucléoïdes pour étudier la relation entre la taille, la forme des cellules, l'organisation du réseau mitochondrial et la teneur, la distribution des nucléoïdes dans des cellules contrôles et dans les modèles de défauts de fusion mitochondriales.



# Cell and mitochondrial network size and shape control mitochondrial nucleoid number

Mariame Selma KANE<sup>1,4</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1,3,4</sup>, Marc FERRE<sup>1,4</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Julien CASSEREAU<sup>3,4</sup>, Christophe VERNY<sup>3,4</sup>, Patrizia BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2,4</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2,4</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2,4</sup> Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>CNRS 6214, INSERM U1083, Angers, F-49000, France

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, Angers, F-49000 France.

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Département de Neurologie, Angers, F-49000 France.

<sup>4</sup>Université Angers, F-49000, France.

## Correspondence should be addressed to:

Arnaud Chevrollier, PhD

UMR CNRS 6214 – INSERM 1083, F-49000 Angers, France

[arnaud.chevrollier@univ-angers.fr](mailto:arnaud.chevrollier@univ-angers.fr)

+ 33 (0) 2 44 68 84 05 **Fax:** + 33 (0) 2 41 35 40 17

## ABSTRACT

The mitochondrial nucleoids are complexes associating mitochondrial DNA and proteins involved in mtDNA maintenance and expression. Although considerable progresses have been made in understanding nucleoid composition, the rules governing their content and their distribution in the mitochondrial network remain poorly known. Here, we address these parameters by co-imaging nucleoids and mitochondria in human and mouse embryonic fibroblasts, for which we imposed cell size and shape using micropatterned coverslips. We found that nucleoids number and distribution were significantly influenced by cell shape and by the structure of the mitochondrial network. In addition, mitochondrial network fragmentation, in human *OPA1*<sup>+/-</sup> fibroblasts and *Opa1*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts, associated with a decreased mitochondrial mass, induced a significant decrease of nucleoids number, while increasing mitochondrial DNA content per nucleoid. Our results show that nucleoids DNA content, distribution and composition are governed by the cell size and the mitochondria network structure.

## INTRODUCTION

Mitochondrial biogenesis is under the control of two different genetic systems, the nuclear genome (nDNA) and the mitochondrial genome (mtDNA). The mtDNA is a circular genome of 16.6kb encoding 13 subunits of the respiratory chain, the remaining ones being encoded by the nDNA. Mitochondrial DNA (mtDNA) is arranged in nucleoprotein complexes called nucleoids [1,2]. Organization of mtDNA in a protein-rich structure not only protects the DNA from various insults but is also likely to put constraints on any transactions involving the DNA, such as replication, repair, and transcription. Major mammalian nucleoid-associated protein [3] include mitochondrial single-stranded DNA-binding protein, transcription factor A of mitochondria (TFAM, also known as mtTFA), mitochondrial DNA polymerase gamma, mitochondrial RNA polymerase, and mitochondrial DNA helicase Twinkle. In addition to their role in mtDNA packaging, POL $\gamma$ , mtSSB, POLRMT, and Twinkle are major components of the mitochondrial replisome, which promotes mtDNA replication [4–8].

The organization of nucleoids is a fundamental question in mammalian mitochondrial genetics that is still largely debated. Nucleoids number and mtDNA copy number per nucleoid have been shown to differ in different cultured cell lines [9]. Using either conventional quantitative-PCR or fluorescence *in situ* hybridization [10], most publications report 1 to 10 copies of mtDNA molecules per nucleoid. Moreover, high heterogeneities of nucleoids number can be pointed out; this number varying between 200 to 1800 depending on cell-types [11]. Indeed, the number of nucleoids was shown to vary during development and depends on tissue-specific factors [12,13]. The elevated number of mtDNA copies is essential for cell function, and depletion of mtDNA may cause disease. It is not clear whether the synthesis of mtDNA is coordinated with specific phases of the cell cycle [10] or occurs continuously through cell life [14]. Incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) labels a large fraction of mtDNA; [15] suggesting at least a temporary existence of recently duplicated mtDNA molecules within single nucleoids [16].

Superresolution microscopy [photoactivatable localization microscopy (PALM) and direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM)] showed that nucleoids vary in size and shape; most nucleoids (65%) appear ellipsoidal and have a much broader size range of 31-318 nm with a mean diameter of nucleoids  $\approx$ 110 nm in human cells [17]. The nucleoids size would reflect their mtDNA content yielding a range of 1-6 mtDNAs per nucleoid [17,18]. Recent analysis using superresolution stimulated emission depletion (STED) microscopy confirmed that the nucleoids have an irregular ellipsoidal shape but demonstrated that each nucleoid would contain a single copy of mtDNA [19]. Using mouse embryonic fibroblasts MEFS overexpressing TFAM, they showed that increased mtDNA copy number per cell increases nucleoid numbers without altering nucleoid size. Understanding the regulation of nucleoids number per mitochondrion is an essential element to understand mitochondrial biogenesis. Several studies have been undertaken to understand structure function relationship. Mitochondrial dynamics, which are the processes controlling the formation of a mitochondrial network distributed within the whole cellular volume is widely studied. Because mitochondria constantly fuse and divide, an imbalance of these two processes dramatically alters overall mitochondrial morphology. Disruption of fusion causes the normal, tubular network of mitochondria to fragment into short rods or spheres. In mammals, the mitochondrial GTPase Mitofusins (MFN1 and MFN2) and OPA1 are required for mitochondrial fusion [20]. Mitochondrial fusion and fission proteins have been shown to directly influence the distribution of nucleoids throughout the mitochondrial network and might as such be dynamically nucleoids-associated [21]. Evidence for their roles in nucleoids dynamics is based on observations that absence of *MFN1/2* or *OPA1* generated highly fragmented mitochondrial networks with small mitochondria devoid of mtDNA [22]. Both *OPA1* and *MFN2* have in recent years been associated with various human neurological disorders that in some cases can be classified as multiple mtDNA deletion syndromes [23].

The interplay between mitochondrial network dynamics and nucleoids dynamics and segregation is largely unexplored. Cell growth and proliferation require the continuous growth of cellular compartments, including the mitochondrial network. In postmitotic tissues and cells, in contrast to nuclear DNA replication, mtDNA continues to be

replicated and turned over [24]. It has been suggested that in mammalian cells, only nucleoids distribution over mitochondria should be actively regulated, whereas nucleoids distribution to daughter cells should be achieved indirectly by regulation of mitochondrial distribution. As active sites of mtDNA replication, it is first of all essential that as mitochondrial mass increases, nucleoids divide or release mtDNA molecules to generate daughter nucleoids and as discussed this has indeed been observed using time-lapse imaging [16].

Little is known about the rules that govern nucleoids number and diffusion through the mitochondrial network, in that manner the relationship between the mitochondrial network organization and nucleoids positioning remain poorly unexplored. We previously developed a standardized method to analyze in 3D the mitochondrial networks organization using micropatterned cell cultures [25]. We here combined this approach with nucleoids image analysis to investigate the relationship between cell size and shape, the mitochondrial network organization and the nucleoids content and distribution in control cells and in mitochondrial fusion defect models. Our result show that the nucleoids content and distribution are, at least in part governed, by the cells and mitochondria network organization. Models of mitochondrial network fragmentation induced by *OPA1* mutations, showed a decrease of mitochondrial mass, which in turn was correlated with a decrease of nucleoids number and disorganization of this latter. No correlation could be drawn from mitochondrial mass and mtDNA content; instead, there was an increase of mtDNA molecules per nucleoid, thereby suggesting that mtDNA does not necessarily reflect mitochondrial mass. These results strengthen the hypothesis that nucleoids dynamics are similar to mitochondrial dynamics and could be brought about by membrane growth and plasticity alone.

## MATERIALS AND METHODS

**Primary fibroblasts cultures.** Fibroblast cell cultures were derived from skin biopsies from healthy and Dominant Optic Atrophy subjects at Angers University Hospital, after obtaining written consent. This work was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Angers (*Comité de Protection des Personnes CPP Ouest II – Angers, France*; identification number CPP CB 2014/02; Declaration number DC-2011-1467 and Authorization number AC-2012-1507). Control and *OPAI* mutated fibroblasts were cultured in 2/3 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 25 mM glucose and 1/3 Amniomax, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), uridine (50 µg/ml, Sigma) and pyruvate (100 µg/ml, Sigma). Wild type and *Opal*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblast (MEFS) cell lines were kindly provided by Dr. M. Rojo and Dr. S. Duvezin-Caubet. Both MEF cultures were carried out in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10 mM glucose, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1 mM glutamine. HeLaS3 cells (ATCC CCL2.2) were grown in high glucose medium (4.5g/l) supplemented with 10% FBS and 1mM glutamine. All cell cultures were established and grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and no antibiotic was used in the following protocols.

**PCR Quantification of mtDNA.** Total DNA was extracted with the Roche's Kit according to manufacturer's guidelines. mtDNA copy number was assessed by quantitative PCR. The quantification of mtDNA corresponds to the qPCR ratio obtained with the use of two primers specific to mitochondrial DNA, and two primers specific to nuclear genes, using iQ SYBR Green Supermix and the Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Biorad). The primers' information were as follows: MitoDNA\_RNAL: Forward 5'-CGCATAAACTTAAACTTTACAG-3'; Reverse 5'-CTTTGCGTAGTTGTATATAGC-3'; MitoDNA\_ND4: Forward 5'-CAGCCACATAGCCCTCGTAG-3'; Reverse 5'-GCGAGGTTAGCGAGGCTTGC-3'; Nuclβ-glob Forward TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3'; Reverse ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3'; NuclAIB: Forward 5'-GGAGTTTCCTGGACAAATGA; Reverse 5'-AGGACTGGCGTTTATGTCTT-3'. The thermal cycler conditions consisted of 95°C for 3 min, followed by cycles of 95°C for

15sec and 59°C for 40sec. The analyses were performed in triplicates and the mean values of five measurements were used for the statistical analyses.

**Micropatterned coverslips.** For live cell-imaging, cells were either plated on glass coverslips (Labtek) at least one day before imaging or seeded on micropatterned cytoo® coverslips (cytoo.com) at least 4 hours prior to image acquisition, in DMEM-F12, 1% FBS, in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C.

**Microscopy, deconvolution, mitochondrial network analysis and nucleoids.** mtDNA staining in live cells was achieved by diluting stock PicoGreen® solution (Molecular Probes) at 2 µl/ml directly into the cell culture medium for 15 min. Co-staining was performed with mitochondrion-selective dye, Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate® (TMRM) or mitotracker Red (Molecular Probes) at 50 nM for 15 min. Immunodetection of nucleoids was achieved using antibodies against DNA (clone AC-30-10) Progen GmbH, on fixed micropatterned cells. Fixation was performed using a standard 4% paraformaldehyde fixation protocol and permeabilization of cells was done with Nonidet (Roche). Secondary antibodies were conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Anti-DNA immunostaining [9] and double-DNA ultrasensitive fluorescent nucleic acid PicoGreen® staining were used for nucleoids/mtDNA detection in micropatterned fibroblasts. DAPI staining was used to visualize the nucleus. The specificity of intra-mitochondrial DNA labelling was demonstrated by the absence of such labelling in the mitochondria of osteosarcoma 143B-rho<sup>o</sup> cells devoid of mtDNA (data available upon request). Images were acquired with an inverted wide-field Nikon Ti-E microscope equipped with an Andor NEO sCOMS camera controlled by NIS Element software. Each image was obtained with a 100x oil objective (Nikon Plan Apo100x, N.A. 1.45). The high precision Z-axis nanopositioners Piezo MCL Nano Z100-N Ti allowed faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting objective lens. An average of 15 image planes was acquired along the Z-axis at 0.2 µm increments. Measurements were performed at room temperature (20°C) to reduce mitochondrial movement. For fluorescent imaging, well-spread triangular cells were selected. In this protocol, a mean of 80 cell-acquisitions from two different micropatterned slides were used for each cell types and conditions. We used point-spread

function (PSF)-Speck microspheres (Invitrogen) to test the system's optical stability. Huygens software (Scientific Volume Imaging) was used for deconvolution. Image treatment was performed using Imaris spot detection software (Bitplane) to visualize and quantify mtDNA/nucleoid labelling. Images were processed using Adobe Photoshop. The computational equipment consisted of a workstation (Dual 3GHz Xeon CPU Quad-Core / 16GB RAM / NVIDIA Quadro FX4800 1.5GB/Multiple Fast Hard Disks) associated with a server (Dual 2.3GHz Xeon Nehalem CPU Quad-Core/24GB RAM/Promise VTrak 12TB RAID, dual controller, 2 x 4Gb Fibre Channel).

## **RESULTS**

### **Nucleoids number varies according to the cell type and shape.**

To gain insight into the relationship between nucleoids and mitochondrial network organization, we analyzed the 3D distribution of nucleoids within the mitochondrial network in living cells. Our double labeling approach allowed the detection of individual nucleoids with spot sizes ranging from 200 to 300 nm, nested in the mitochondrial tubules. Compared to HeLa S3 cells, which displayed perinuclear nucleoids in a mitochondrial network of a limited size, (Fig 1B<sub>1</sub>), healthy fibroblasts showed a larger number of nucleoids distributed throughout a large mitochondrial network (Fig 1C<sub>1-4</sub>; D). Thus fibroblasts are particularly suited to mitochondrial network and nucleoid exploration. On glass coverslips, they are either fusiform, compact or widely spread (Fig 1C<sub>1-4</sub>), and they often overlap with nearby cells. To circumvent these concerns of size variations and cell overlap, and to better quantify nucleoids, we used the micropatterned standardized cell technology.

**Cell size and mitochondrial mass control the nucleoid number.** Control fibroblasts were cultured on coverslips carrying fibronectin micropattern in order to control their size and shape as described [25]. Three different micropatterned cell sizes (L, XL and XXL) were used (See movie). This trick allowing control of cell size showed that mitochondrial volume increased with the expansion of cell cytosol and concomitantly, the nucleoids number increased, varying from 398 nucleoids in small fibroblasts (L) to 746 nucleoids in

fibroblasts with larger cytosol (XXL) ( $p < 0.01$ ) (Fig 2C). These results showed that the nucleoid number is imposed by mitochondrial network size that is itself governed by the extent of cell size.

**The length and the organization of the mitochondrial network control the number of mitochondrial nucleoids.**

In control fibroblasts, nucleoids were spread in the entire mitochondrial network without mitochondria devoid of nucleoids. We found a proportional relationship between the number of nucleoids and the length of mitochondrial tubules (Fig 3A). Three major different mitochondrial network organizations coexist in the different fibroblasts of the same population (Fig 3B): mitochondria are either organized in a connected, dense, cross-linked network, with many branch points (Fig 3B<sub>2</sub>), distributed in a tubular network with long tubules (Fig 3B<sub>3</sub>) or isolated throughout the cytoplasm (Fig 3B<sub>4</sub>). The distance between nucleoids was found to increase when mitochondria enlarge their lengths, whereas in a dense tubular connected network, nucleoids have closer localization (Fig 3C). The distance between nucleoids was also lower in short mitochondrial tubules, (Fig 3C). For example, a mitochondrion of 1  $\mu\text{m}$  long displayed a mean of 2.6 nucleoids spaced by 0.61  $\mu\text{m}$  on average, while a 15  $\mu\text{m}$  long mitochondrion contained 13.5 nucleoids spaced by 0.9  $\mu\text{m}$  on average. Altogether, our data reveal that the length and the organization of the mitochondrial network control the number of mitochondrial nucleoids in fibroblasts.

***OPA1* induced mitochondrial network fragmentation is associated with a drop of the mitochondrial volume, and subsequent reduction of nucleoids number.**

The mitochondrial network is structured by fusion and fission processes and *OPA1* is one of the main actors involved in mitochondrial fusion. First, we used 2 *OPA1*<sup>+/-</sup> patient fibroblasts, one without evidence of mitochondria fission (*OPA1*-p.Val903Glyfs\*3) and another with a fragmented mitochondrial network mixing mild (less than 5  $\mu\text{m}$  in length) and short (less than 1  $\mu\text{m}$  in length) mitochondria (*OPA1*-p.S545R) (Fig 4B<sub>1-2</sub>). In *OPA1*-p.Val903Glyfs\*3 fibroblasts, we did not find any defect in nucleoids number and distribution (Fig 4D<sub>1-2</sub>) compared to control fibroblasts, nor did we find a loss of mitochondrial mass. In *OPA1*-p.S545R fibroblasts with a fragmented network, we found



a significant 20% reduction of mitochondrial volume associated with a 40% decrease in nucleoids number per cell (Fig 4D<sub>1-2</sub>). There was at least one nucleoid per mitochondrion and no accumulation or aggregation of nucleoids per mitochondria. In these cells with a disorganized network (Fig 4B<sub>1-2</sub>), the mean nucleoid spacing tended to increase compared to healthy controls, due to the reduced mitochondrial network connectivity, leaving most mitochondria isolated (Fig 4C<sub>4</sub>).

Then, we used an *Opal* knock out model to address the role of mitochondrial dynamics in nucleoids organization. Mouse embryonic fibroblasts *Opal*<sup>-/-</sup> MEFS display no mitochondrial fusion activity [22,26], leading to a dramatically fragmented mitochondrial network with isolated round mitochondria, as compared to control MEFS [27] (Fig 4 E<sub>1-3</sub>). Observation of micropatterned *Opal*<sup>-/-</sup> MEFS, revealed that only one fourth of mitochondria have a nucleoid staining, with a single nucleoid per mitochondria (Fig 4E<sub>3</sub>). Quantification of mitochondrial volume relatively to the cellular volume showed a loss of mitochondrial mass in *Opal*<sup>-/-</sup> MEFS of about 60% compared to wt\_MEFS (Fig 4F-G) that is correlated to the reduction of nucleoids number as already found with the human *OPA1* fibroblasts with reduced mitochondrial network connectivity.

### **Mitochondrial network fragmentation is associated with an increased mtDNA copy number per nucleoid.**

Previous studies have shown that nucleoid size reflects the mtDNA content when assessing this parameter using the DNA specific Picogreen fluorescent dye [28,29]. Using fluorescence imaging and qPCR approaches, we assessed the impact of mitochondrial network fragmentation on mtDNA content and the number of DNA molecules per nucleoid. mtDNA content was constant in *OPA1* mutated fibroblasts (Table 1). Nevertheless, in *OPA1*-p.S545R cells, the mtDNA/nucleoid ratio was higher than the one found in healthy control cells (Table 1), suggesting that there are more mitochondrial DNA copies per nucleoid in *OPA1*-p.S545R cells than in control cells (Fig 4C<sub>1</sub>). Similarly, absence of fusion activity in *Opal*<sup>-/-</sup> MEFs was also associated with an increased mtDNA/nucleoid ratio, despite a decreased mtDNA copy number (p<0.001)

(Table 1 and Fig 4E<sub>4</sub>); thereby linking OPA1 fusion activity to the maintenance of mtDNA copies per nucleoid.

## **DISCUSSION**

Several studies showed heterogeneity of nucleoid number depending on cell types [9] and imaging approaches, especially with the emergence of super-resolution microscopy [17,19]. Indeed, the ability of fluorescence microscopy to discriminate two nucleoids that are too close in distance was questioned. Recent studies of Kukat and team had distinguished 1.2 times more nucleoids with the STED compared to the confocal [19]. These data show no high discrepancies between the two techniques, thus rendering fluorescence microscopy an adequate tool in the study of nucleoids.

In this study, we highlighted the correlation between nucleoids' number and the cell size on one part, and mitochondrial network organization on the other. Following cell types and cell lines, HeLaS3 human adenocarcinoma (not shown) or skin fibroblasts, cell size and the corresponding mitochondrial network varied in surface and length respectively. We observed that the number of nucleoids follows these variations and fibroblasts, the largest cells we have tested, have the greater number of nucleoids. We thus investigated a possible correlation between cell size, mitochondrial length and the number of nucleoids. Using fibronectin micropatterned support, which allows governing of cell size and shape, we demonstrated a statistically significant relationship between nucleoids number and mitochondrial network length, which is itself correlated to cell size. Cell volume expansion, thus promotes mitochondrial network development and certainly nucleoids replication. By measuring the mean number of nucleoids relative to the length of mitochondrial tubules, we confirmed this proportional relationship between the number of nucleoids and the length of mitochondria tubules. These results depend on a strictly controlled nucleoids spacing, allowing nucleoids to be present in all mitochondrial network enabling the functionality of mitochondria.

We showed a variation of this nucleoids spacing depending on mitochondrial network organization within the cell. Our measurements showed that the distance between the

nucleoids increases when mitochondria stretch out as shown in long mitochondrial tubules reaching the peripheral cellular limits, whereas in the connected, dense, cross-linked network, with many branch points as shown around the MTOC (Microtubules Organizing Center) [25], the nucleoids spacing is low. Consequently, we found a higher density of nucleoids in this large central region of the cell around the MTOC composed of a reticulated mitochondrial network intertwined around the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum [25]. Several studies have shown that the MTOC plays essential role in many biological processes, participating in the control of cell shape, cell division and cell motility [30,31]. Our imaging approach has shown a rich density of mitochondrial reticulated network around this MTOC, raising the question of a possible MTOC being a hotspot for mtDNA replication and duplication. Altogether, our data showed that the inner cell organization of the mitochondrial network based on microtubules network plays a major role in the control of the nucleoids number.

In controlled culture conditions, normal fibroblasts, human skin or mouse embryonic, have a tubular mitochondrial network, connected and dynamic characterized by fusion and fission events. These events are mediated in cases of fusion mainly by *OPA1*, which was shown to be the causative gene in a mitochondrial-related pathology, ADOA (Autosomal Dominant Optic Atrophy) [32,33]. Knock out of the *OPA1* gene was shown to disrupt connectivity of the mitochondrial network, thus we used *OPA1* models to further establish the relation between nucleoid number and distribution, and mitochondrial network length and volume.

*OPA1* depletion in MEFs inhibits mitochondrial fusion events leading to a total fragmentation of the network with isolated spheroids mitochondria distributed in all cell surfaces [22].

We showed, both in human *OPA1:pS545R* and *opal<sup>-/-</sup>* MEFS that mitochondria do not accumulate nucleoids per mitochondrion without respecting nucleoids spacing equivalent to healthy mitochondria despite a slight increase in mean spacing due to the absence of a reticulated network. In cases of *OPA1* mutations, the distribution of nucleoids still remained a controlled event.

As previously shown [22,27], we show a 75% decrease in nucleoids number and a large number of mitochondria devoid of detectable nucleoids. This reduction of nucleoids

number was associated with a decrease of mtDNA content in *opa1*<sup>-/-</sup> MEFs. Interestingly, the decrease in mtDNA copy number is not as significant as nucleoids' decrease, which concludes to a higher mtDNA/nucleoid ratio.

Human OPA1: pS545R patient's fibroblast cells, which displayed a fragmented mitochondrial network phenotype showed similarly a decrease of nucleoids number per cell. Incongruously, all isolated mitochondria presented at least one nucleoid compared to the knock out model. Fragmentation of the mitochondrial network was also associated with an increase of the mtDNA/nucleoid ratio as the mtDNA content was not affected. As we did not find evolution of mtDNA copy number following passages, we conclude that mtDNA replication rate is not affected in cases of *OPA1* mutations.

This increase of the number of mtDNA per nucleoid, however suggests a difficulty of cells to distribute genomes through other mitochondria. *OPA1* mutations lead to the assembly of DNA molecules into multigenomic nucleoid structures due to loss of fusion events, which are crucial to exchanges of mitochondrial components. This multicopy mtDNA coexistence per nucleoid found in this study is consistent with the faithful nucleoid model and many other studies [9,34,35] while in recent studies with rotatory shadowing electron microscopy, Kukat et al. suggested a nucleoid model in which TFAM aggregates show cross-strand binding to a single mtDNA molecule[19]. Interestingly, by using MEFs overexpressing TFAM and STED microscopy, they showed that increased mtDNA copy number per cell increases nucleoids number without altering their nucleoid sizes. They mentioned in their supplementary data that MEFs TFAM-OE have a higher cell size. According to their study, TFAM should be the principal organizer of mtDNA nucleoids, and is sufficient to coordinate compaction of DNA with proteins [19,34]; however, one cannot exclude that other proteins affect mtDNA packaging.

The complex nucleoid structure containing several mtDNA molecules may impair the ability of the cell to select against deleterious mtDNA mutations [36]. These findings may be part of the answer as to the accumulation of mtDNA multiple deletions in post-mitotic tissues of syndromic ADOA patients caused by missense mutations in the OPA1 GTPase domain [37]. Several works have shown that *OPA1* mutations may lead to a

disruption of cristae structure [38] and Cameron *et al* have shown that loss of cristae invagination affects the integrity of nucleoids, certainly to the role of *OPA1* in nucleoid attachment to the mitochondrial inner membrane [39] [40]. All of this suggest that mtDNA accessibility for transcription may be affected, which in turn could reduce mtDNA encoded subunits, disturbing hence the equilibrium of OXPHOS complexes and mitochondrial OXPHOS coupling [41]; thus taking part in the pathogenic processes.

## **CONCLUSION**

We have shown that nucleoids number is relative to mitochondria length, the longer and broader the network, the greater the number of nucleoids. 3-D image analysis showed that nucleoids spacing increases under that configuration, while being relatively small in short and highly connected mitochondria. We have shown that *OPA1* mutations characterized by severe fusion defect lead to a decrease of mitochondrial mass associated with a decrease of the number of nucleoids. Our studies, in addition to highlighting a direct relationship between membrane plasticity and nucleoids regulation, also highlights the weaknesses of mtDNA copy number appreciation as a tool to quantify mitochondria mass. We have shown in *OPA1* mutations, an increase in the number of mtDNA molecules per nucleoid, a higher compaction rate, which was shown in previous studies to select deleterious mutations, thereby contributing in ADOA pathogenesis.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the following patients' foundations: "*Ouvrir les Yeux*", "*Association contre les Maladies Mitochondriales*", "*Retina France*", "*Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels*", "*Fondation VISIO*" and "*Kjer France*".

We acknowledge the support from the INSERM, CNRS, Université d'Angers, CHU d'Angers, la Région Pays de Loire and Angers Loire Métropole. We wish to thank our colleagues for fruitful discussions.

## References

1. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 2005;6: 815–825. doi:10.1038/nrg1708
2. Spelbrink JN. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life.* 2010;62: 19–32. doi:10.1002/iub.282
3. Hensen F, Cansiz S, Gerhold JM, Spelbrink JN. To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie.* 2014;100: 219–226. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.017
4. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* 1998;18: 231–236. doi:10.1038/ng0398-231
5. Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1042: 101–108. doi:10.1196/annals.1338.010
6. Maier D, Farr CL, Poeck B, Alahari A, Vogel M, Fischer S, et al. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell.* 2001;12: 821–830.
7. He J, Mao C-C, Reyes A, Sembongi H, Di Re M, Granycome C, et al. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol.* 2007;176: 141–146. doi:10.1083/jcb.200609158
8. Saada A. Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity. *DNA Cell Biol.* 2004;23: 797–806. doi:10.1089/dna.2004.23.797
9. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci.* 2004;117: 2653–2662. doi:10.1242/jcs.01134

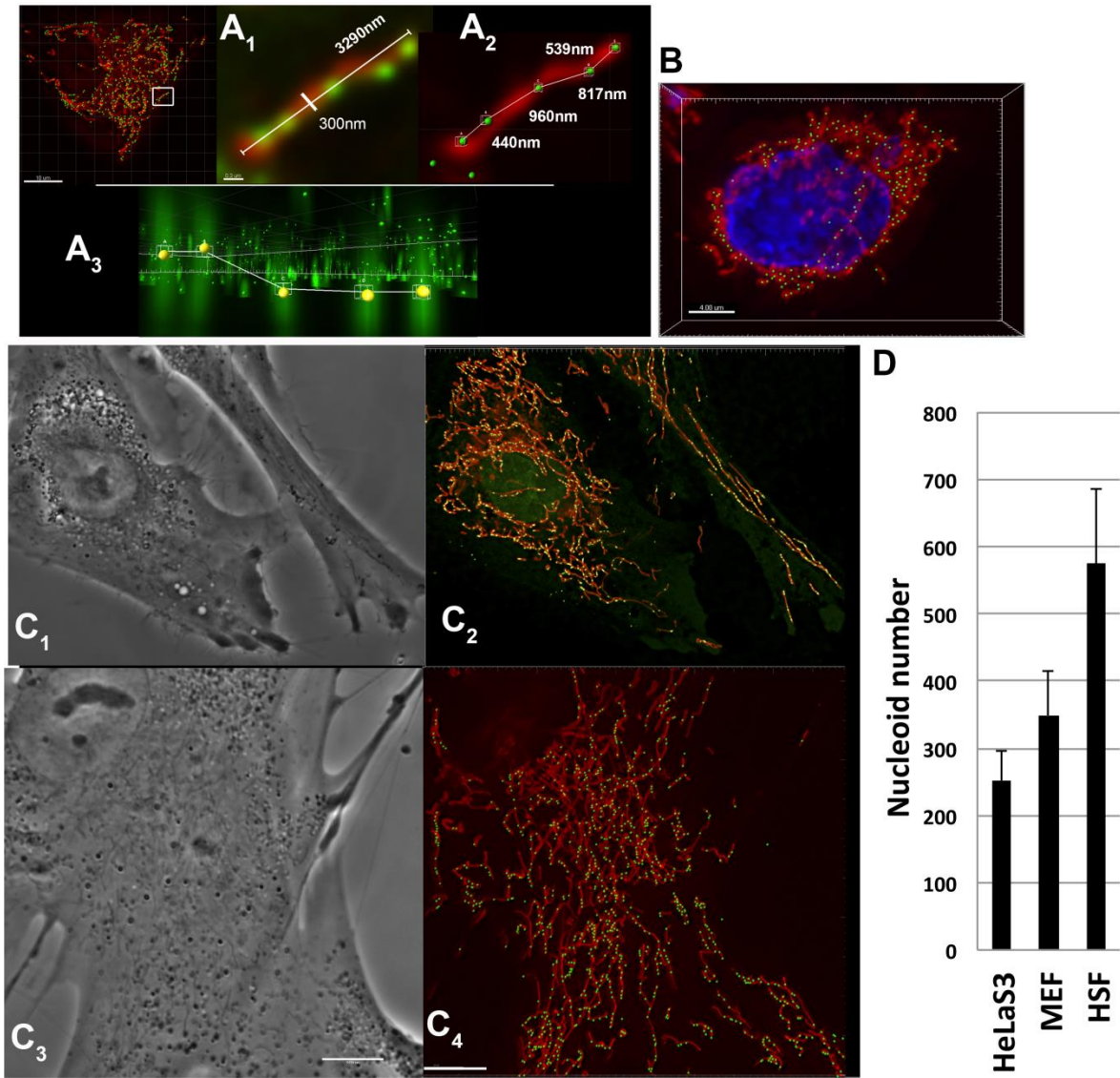
10. Chatre L, Ricchetti M. Prevalent coordination of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication with the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: 3068–3078. doi:10.1093/nar/gkt015
11. Bogenhagen DF. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819: 914–920. doi:10.1016/j.bbagr.2011.11.005
12. Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem.* 2008;283: 3665–3675. doi:10.1074/jbc.M708444200
13. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008;88: 611–638. doi:10.1152/physrev.00025.2007
14. Posakony JW, England JM, Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol.* 1977;74: 468–491.
15. Echave P, Machado-da-Silva G, Arkell RS, Duchen MR, Jacobson J, Mitter R, et al. Extracellular growth factors and mitogens cooperate to drive mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci.* 2009;122: 4516–4525. doi:10.1242/jcs.049734
16. Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Bliek AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell.* 2003;14: 1583–1596. doi:10.1091/mbc.E02-07-0399
17. Brown TA, Tkachuk AN, Shtengel G, Kopek BG, Bogenhagen DF, Hess HF, et al. Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction. *Mol Cell Biol.* 2011;31: 4994–5010. doi:10.1128/MCB.05694-11
18. Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson N-G, Jakobs S. 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.* 2011;108: 13534–13539. doi:10.1073/pnas.1109263108
19. Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spähr H, Bonekamp NA, Köhl I, et al. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 11288–11293. doi:10.1073/pnas.1512131112
20. Chen H, Chan DC. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18: 453–459. doi:10.1016/j.ceb.2006.06.004
21. Tauber J, Dlasková A, Šantorová J, Smolková K, Alán L, Špaček T, et al. Distribution of mitochondrial nucleoids upon mitochondrial network fragmentation and network reintegration in HEPG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45: 593–603. doi:10.1016/j.biocel.2012.11.019
22. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell.* 2007;130: 548–562. doi:10.1016/j.cell.2007.06.026
23. Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferré M, Guillet V, et al. OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41: 1855–1865. doi:10.1016/j.biocel.2009.04.012
24. Magnusson J, Orth M, Lestienne P, Taanman J-W. Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp Cell Res.* 2003;289: 133–142.

25. Chevrollier A, Cassereau J, Ferré M, Alban J, Desquiret-Dumas V, Gueguen N, et al. Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44: 980–988. doi:10.1016/j.biocel.2012.03.006
26. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol.* 2007;178: 749–755. doi:10.1083/jcb.200704110
27. Ban-Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110: 11863–11868. doi:10.1073/pnas.1301951110
28. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech.* 1994;27: 198–219. doi:10.1002/jemt.1070270303
29. Malka F, Lombès A, Rojo M. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763: 463–472. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.001
30. Peraza-Reyes L, Crider DG, Pon LA. Mitochondrial manoeuvres: latest insights and hypotheses on mitochondrial partitioning during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2010;32: 1040–1049. doi:10.1002/bies.201000083
31. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2006;281: 25791–25802. doi:10.1074/jbc.M604501200
32. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 2000;26: 207–210. doi:10.1038/79936
33. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 2000;26: 211–215. doi:10.1038/79944
34. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell.* 2007;18: 3225–3236. doi:10.1091/mbc.E07-05-0404
35. Gilkerson RW, Schon EA, Hernandez E, Davidson MM. Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *J Cell Biol.* 2008;181: 1117–1128. doi:10.1083/jcb.200712101
36. Di Re M, Sembongi H, He J, Reyes A, Yasukawa T, Martinsson P, et al. The accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase gamma determines the DNA content of mitochondrial nucleoids in human cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: 5701–5713. doi:10.1093/nar/gkp614
37. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissière A, et al. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and



- optic atrophy “plus” phenotypes. *Brain J Neurol.* 2008;131: 338–351. doi:10.1093/brain/awm298
38. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278: 7743–7746. doi:10.1074/jbc.C200677200
  39. Cameron JM, Levandovskiy V, Mackay N, Ackerley C, Chitayat D, Raiman J, et al. Complex V TMEM70 deficiency results in mitochondrial nucleoid disorganization. *Mitochondrion.* 2011;11: 191–199. doi:10.1016/j.mito.2010.09.008
  40. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, et al. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.* 2011;21: 12–20. doi:10.1101/gr.108696.110
  41. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo M-AP, Verny C, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol.* 2008;63: 794–798. doi:10.1002/ana.21385

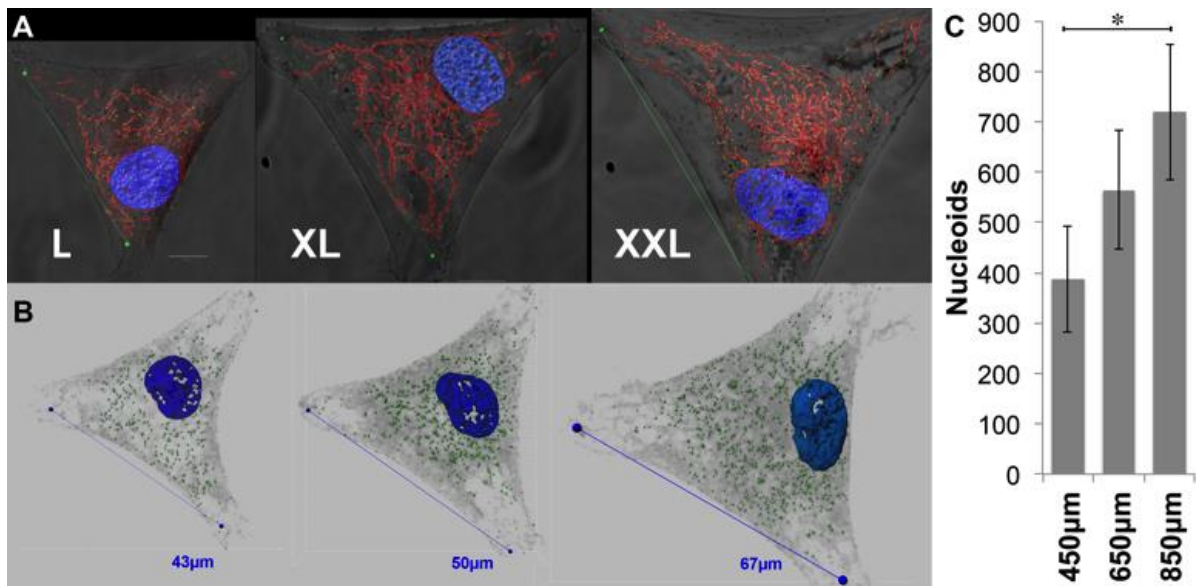
# Figures



**Fig. 1.**

**Heterogeneous distribution of mitochondria and nucleoids according to cell types and shapes.** **A:** Overlay imaging of fluorescent probes staining mitochondrial network (TMRM in Red) and nucleoids (PicoGreen in green) in skin fibroblast. A<sub>1</sub>: Details of mitochondrial tubule with 5 nucleoids. Scale bar 0.3 μm. A<sub>2</sub>: Using Imaris spot detection

and measurement point, spacing between nucleoids are shown. **A<sub>3</sub>**: Orthogonal view of nucleoids distribution within the network volume. **B**: Nucleoids distribution (in green) in the mitochondrial network (in red) in HeLaS3 cell line, nucleus (in Blue). Scale bar 10  $\mu\text{m}$ . **C<sub>1-4</sub>**: Heterogeneity of mitochondrial shape (in red) and nucleoids number and distribution (in green) according to fibroblasts cell shape and surface. Scale bar 10  $\mu\text{m}$ . **D**: Comparison of nucleoids number in different cell types: HeLaS3, MEF and HSF (Mouse Embryonic Fibroblast, Human Skin Fibroblast)

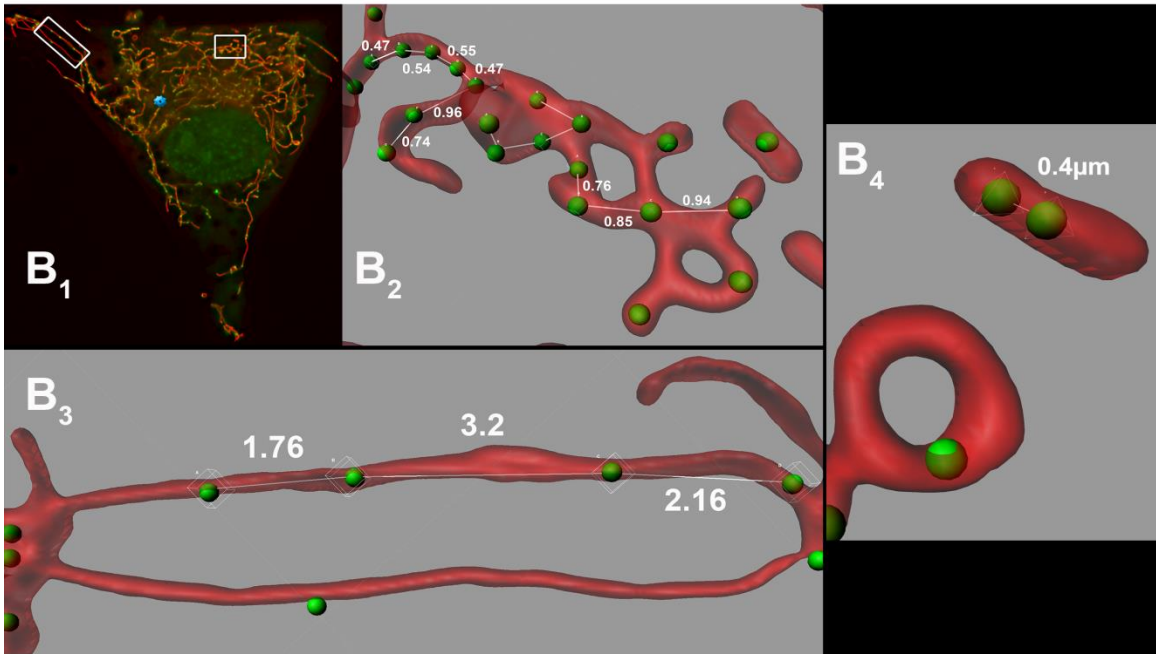
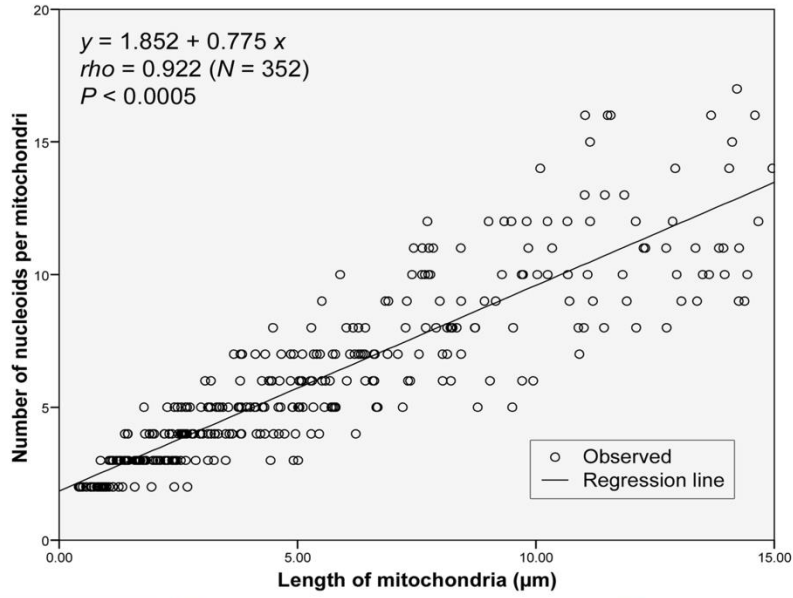
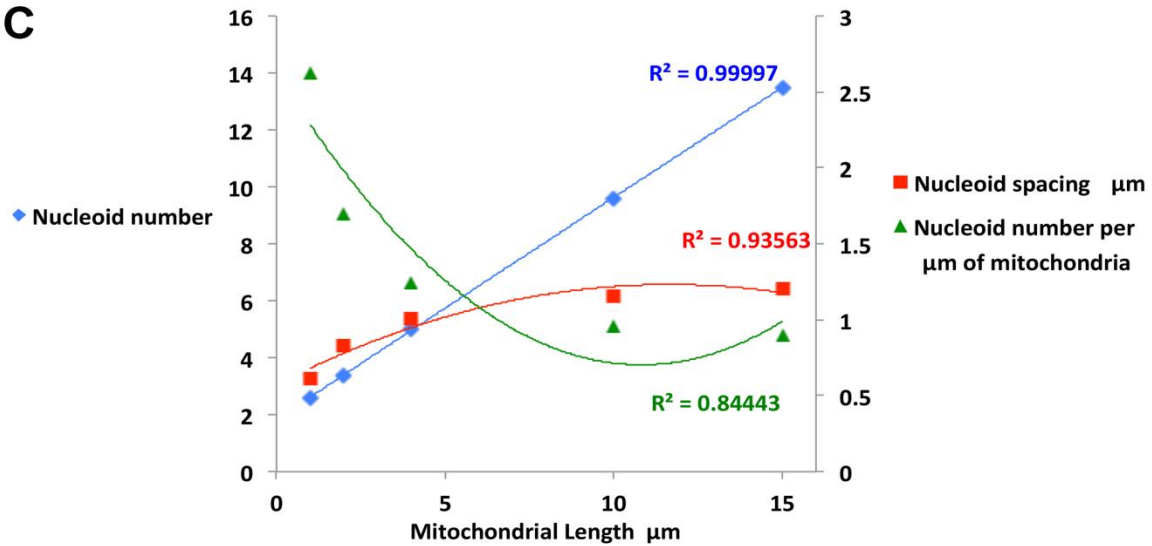


**Fig. 2.**

**Nucleoids number increases with increasing cell size dictated by cell micropatterning.**

A: Overlay imaging of mitochondria (TMRM in red) and nucleoids (PicoGreen in green) from fibroblasts seeded on coverslips carrying Y-shaped concave L, XL and XXL

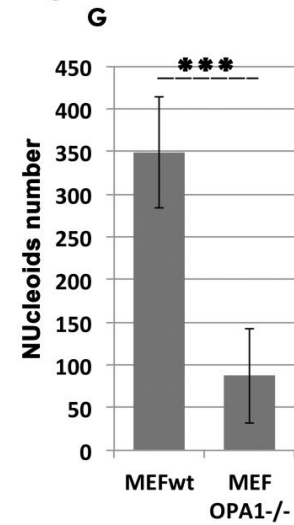
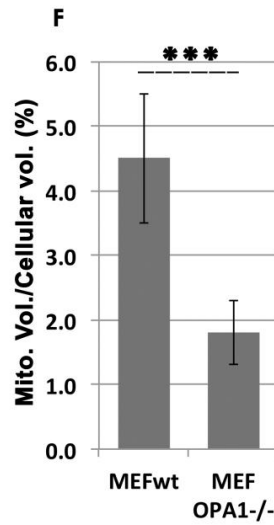
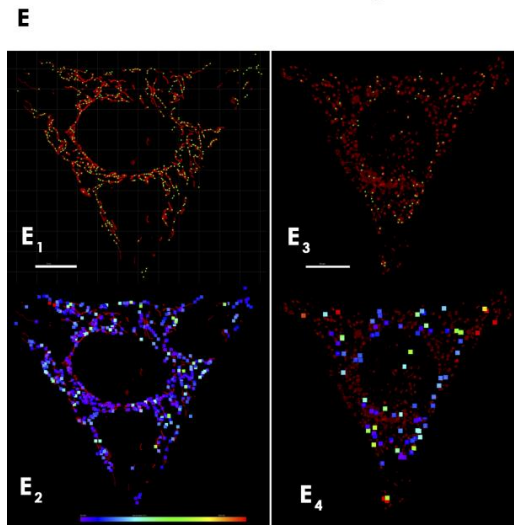
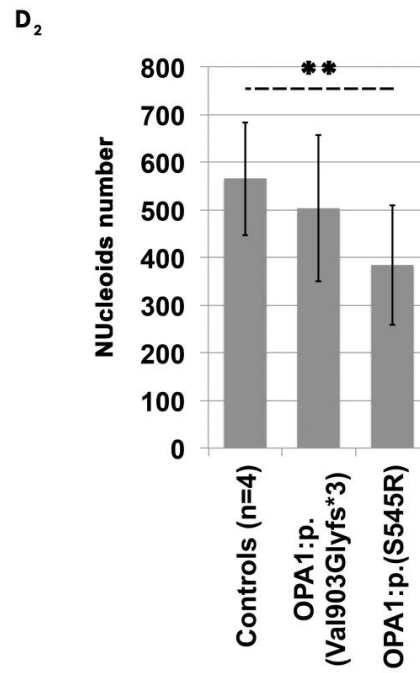
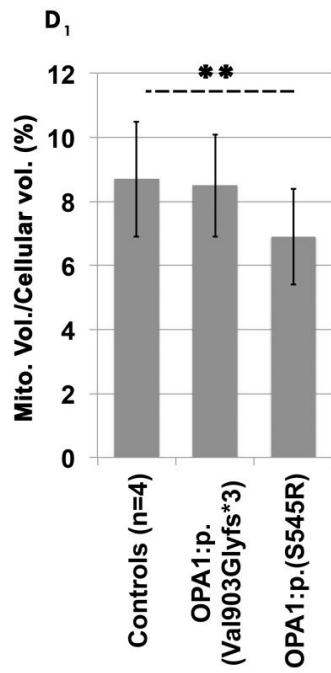
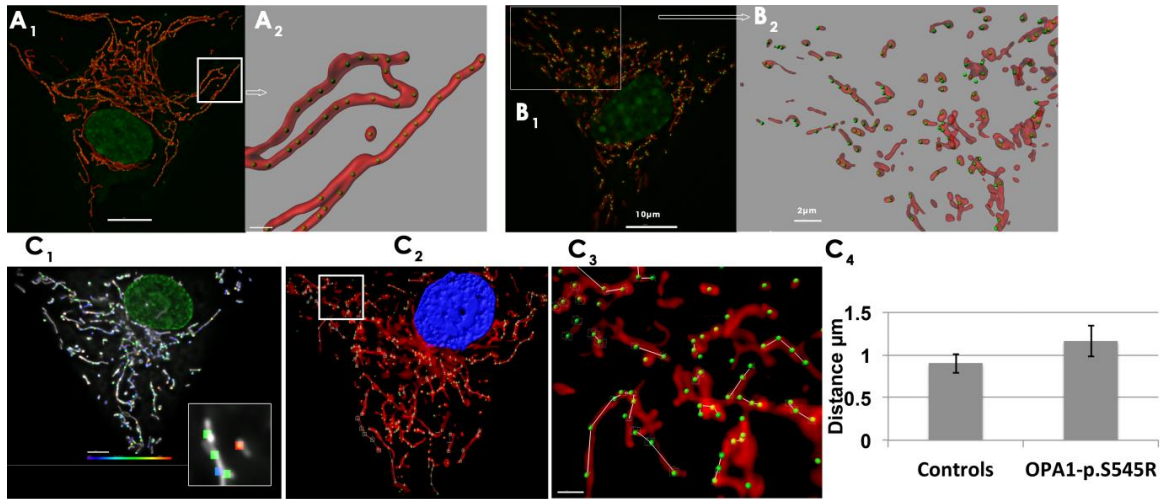
micropatterns (Cytoo®) adopt standardized triangular shapes with different sizes. Imaris spot detection was used to match the localization of nucleoids. C: Nucleoids quantification in total mitochondrial network. Values are the mean  $\pm$  s.d. of at least 40 measurements from two independent experiments. \*P < 0.01, Mann–Whitney U-test.

**A****C**

**Fig. 3.**

**Mitochondrial length and network reticulation control nucleoids number and spacing.**

**A:** Scatter diagrams and best fit curve of linear regression of the number of nucleoids per mitochondrial length. **B:** Overlay imaging of mitochondria (TMRM in red) and nucleoids (PicoGreen in green) in control fibroblasts ( $B_1$ ). Blue spot indicates MTOC position. Three configurations of mitochondria network are shown: a dense connected network ( $B_2$ ); a long tubular network ( $B_3$ ); and isolated mitochondria ( $B_4$ ). **C:** Scatter diagrams representing correlation between mitochondrial length, nucleoids number and spacing, and the nucleoids number per  $\mu\text{m}$  of mitochondrial length (352 measurements from three independent experiments).



**Fig. 4.**

**OPA1 induced mitochondrial network fragmentation is associated with a drop of mitochondrial volume and reduction of nucleoids number.**

**A1:** Overlay imaging of mitochondria (TMRM, red) and nucleoids (PicoGreen in green) in control fibroblasts. Fibroblasts settled on coverslips carrying Y-shaped concave micropatterns (Cytoo®) adopt standardized triangular shapes. **A<sub>2</sub>:** Square detailed imaging. **B1:** Representative images of OPA1-p.S545R fibroblasts showing the distribution of nucleoids in the fragmented mitochondrial network associated with a decreased mitochondrial volume (B<sub>1</sub>, details in B<sub>2</sub>). **C1-4:** Higher fluorescent nucleoid intensity (PicoGreen) in isolated mitochondria compared to nucleoids signal in long tubules in OPA1:p-S545R fibroblasts, (see box, highest intensity in red and lowest intensity in blue); color code shows the heterogeneity of nucleoid intensity (C<sub>1</sub>). Scale bar 10 μm. Nucleoids spacing quantification in the mitochondrial network showing tubular and short isolated mitochondria (C<sub>2</sub> detail in C<sub>3</sub>).

**D.** Mitochondrial volume (D<sub>1</sub>) and nucleoids quantification (D<sub>2</sub>) in skin fibroblasts from control (n=4) and patients with *OPA1* mutations: non-fragmentated OPA1-p.Val903Glyfs\*3 fibroblasts, versus highly fragmented OPA1-p.S545R fibroblasts. Values are the means ± s.d. of at least 40 measurements from three independent experiments.

**E.** Overlay imaging of mitochondria (TMRM, red) and nucleoids (PicoGreen) in wild-type MEFS (E<sub>1</sub>) and MEFS *Opal*<sup>-/-</sup> (E<sub>3</sub>) seeded on coverslips carrying Y-shaped concave micropatterns (Cytoo®) adopt standardized triangular shapes. The color code shows the



heterogeneity of nucleoid intensity (E<sub>2</sub>-E<sub>4</sub>). Higher fluorescent nucleoid intensity (PicoGreen) in MEFs *Opal*<sup>-/-</sup> (E<sub>3-4</sub>) mitochondria compare to WT (E<sub>1-2</sub>);

**F-G.** Mitochondrial volume (F) and nucleoid quantification (G) in mouse embryonic fibroblasts: MEFwt and MEF *Opal*<sup>-/-</sup>. Values are the mean  $\pm$  s.d. of at least 40 measurements from three independent experiments. \*: P < 0.01, \*\*: P < 0.001, Mann-Whitney U-test. Scale bar 10  $\mu$ m.

	mtDNA	nucleoids	mtDNA/nucleoid ratio
MEFwt	392 (+/- 67)	349 (+/- 65)	1.1 (+/- 0.2)
MEF <i>OPA1</i> <sup>-/-</sup>	150 (+/- 58)	87 (+/- 55)	1.7 (+/- 0.2) *
Controls	1079 (+/- 204)	565 (+/-119)	1.9 (+/- 0.2)
OPA1:p.(Val903Glyfs*3)	1150 (+/- 256)	503 (+/-153)	2.2 (+/- 0.2)
OPA1:p.(S545R)	1285 (+/- 260)	384 (+/-126)	3.3 (+/- 0.2) *

**Table 1**

**mtDNA/ Nucleoid ratio increases following mitochondrial network fragmentation induced by *OPA1* mutations**

mtDNA qPCR and nucleoids quantification in skin fibroblasts from patients with dominant mutations: OPA1-p.Val903Glyfs\*3, OPA1:p.S545R human fibroblasts and Mouse embryonic fibroblasts MEFwt and MEF *OPA1*<sup>-/-</sup>. Values of qPCR are the means  $\pm$  s.d. of 40 measurements from three independent acquisitions. Control values are the means  $\pm$  s.d. of four healthy controls.

**Supplementary Movie 1: Mitochondrial nucleoid distribution and spacing.**

Overlay imaging of mitochondria (TMRM, red) and nucleoids (PicoGreen in green) in control fibroblasts. Fluorescent nucleoids signal was detected with Imaris spot detection software to quantify nucleoids spacing.

## Résultats et discussion

La biogenèse mitochondriale nécessite une régulation coordonnée de l'expression des génomes nucléaires et mitochondriaux. La communication entre le noyau et les mitochondries est complexe notamment du fait de la distribution cellulaire mitochondriale, de la dynamique du réseau mitochondrial et du cycle cellulaire. Les mécanismes de fission et de fusion mitochondriales jouent un rôle important dans la biogenèse et la distribution des protéines néo-synthétisées (H. Chen et al. 2010). La transcription de l'ADNmt est activée afin de maintenir l'activité des complexes OXPHOS en parallèle de la plasticité mitochondriale. De même la réplication de l'ADNmt dépend de différents facteurs qui participent à la structuration des molécules d'ADNmt, notamment TFAM qui est impliqué dans la compaction de cet ADNmt. La quantité d'ADNmt, reflète l'activité OXPHOS des cellules et des tissus.

Il est largement décrit que le nombre de nucléoïdes varie en fonction du type cellulaire (D. F. Bogenhagen 2012). Nous avons souligné par nos travaux la corrélation entre le nombre de nucléoïdes et la taille des cellules d'une part, et l'organisation du réseau mitochondrial de l'autre.

En fonction des types et lignées cellulaires, HeLaS3, HepG2, SHSY-5Y, 143B ou des fibroblastes de peau, la taille des cellules et le réseau mitochondrial varient. Nous avons observé que le nombre de nucléoïdes suit ces variations. Les fibroblastes, qui sont les plus grandes cellules que nous ayons testés, ont le plus grand nombre de nucléoïdes.

L'utilisation du support avec micropattern de fibronectine nous a permis de contrôler la taille des cellules et la forme. Nous avons démontré une relation statistiquement significative entre le nombre de nucléoïdes et la longueur du réseau mitochondrial, qui est elle-même corrélée à la taille de la cellule. L'expansion du volume cellulaire favorise ainsi le développement du réseau mitochondrial et la réplication des nucléoïdes. En mesurant le nombre moyen de nucléoïdes par rapport à la longueur de tubule mitochondriale, nous avons confirmé cette relation de proportionnalité entre le nombre de nucléoïdes et la longueur des tubules. Ces

résultats montrent un espacement des nucléoïdes strictement contrôlé, ce qui permet aux nucléoïdes d'être présents dans l'ensemble du réseau, assurant ainsi la fonctionnalité des mitochondries. Nos mesures ont montré que la distance entre les nucléoïdes augmente dans les longs tubules atteignant les limites cellulaires périphériques, alors que dans le dense réseau réticulé, l'espacement des nucléoïdes est faible.

Cette répartition dépend probablement de l'organisation ultrastructurale des mitochondries. La présence des crêtes qui sont réparties de manière régulière pourrait déterminer cet espacement des nucléoïdes. En effet, plusieurs études suggèrent un confinement des nucléoïdes dans la poche des crêtes avec plus ou moins un ancrage à la MIM (Busch et al. 2014). La structure, l'organisation des crêtes et leur densité est très dépendant du remodelage mitochondrial. Nous avons en microscopie électronique à transmission constaté une diminution de la densité des crêtes dans les mitochondries très tubulaires en conséquence de leur espacement très important ; alors que dans les mitochondries très courtes, les crêtes sont très denses et proches. De ce fait, la distribution et l'espacement des nucléoïdes sont également tributaires de la structure du réseau mitochondrial. La structure du réseau mitochondrial change allant d'un réseau hyper-tubulaire lors d'une privation en sérum à un réseau hyper-fragmenté lors d'un stress aigu comme les conditions hypoxiques (Galloway, Lee, et Yoon 2012). De même, en réponse à des concentrations d'ADP faibles, la morphologie de la membrane interne change d'un état «condensé», caractérisé par un compartiment matriciel dense avec de larges crêtes, à un état «orthodoxe», avec une expansion, une matrice moins dense et des crêtes plus compactes (Mannella 2006; Cogliati, Enriquez, et Scorrano 2016). Nous pourrions imaginer que dans un long tubule mitochondrial, le remodelage des membranes se fait par un étirement de la surface préexistante. Ce remodelage va donc donner des crêtes moins denses, plus espacées et donc des nucléoïdes compartimentés plus espacés en accord avec nos résultats. En effet, si on se base sur les règles de l'échelle des organites dans le cytoplasme (organelle scaling), les organites tels que le RE ou les mitochondries organisés en réseaux sont distribués

dans le cytoplasme en augmentant leur longueur linéaire tout en gardant leur volume et leur surface à peu près constante (Chan et Marshall 2010). Ceci conforte donc notre hypothèse qui est que l'unité mitochondrial est à peu près constante, et l'extension du réseau mitochondrial augmente la longueur tout en préservant la surface extérieure et le volume.

Nous avons également observé un nombre très élevé de nucléoïdes autour du noyau. Cette régionalisation intracellulaire est peut être dictée par la communication des deux génomes, nucléaire et mitochondrial. Des études d'hybridation *in situ* ont montré une population très hétérogène des nucléoïdes (Chatre and Ricchetti 2013b). Bien que la réplication du génome mitochondrial soit active à travers le cycle cellulaire, une fraction limitée des structures mitochondriales montrent une synchronisation avec la synthèse de l'ADN nucléaire (Chatre et Ricchetti 2013a). La distribution cellulaire de ces mitochondries actives n'est pas évoquée dans l'étude, mais nous supposons que ces mitochondries doivent être autour du noyau pour faciliter les échanges.

Ces résultats mettent en évidence que la distribution des nucléoïdes est donc dépendante de l'organisation des crêtes qui sont elles-mêmes dépendantes de la structure et de la taille des mitochondries. La taille et la structure de ces mitochondries sont régulées non-seulement par la capacité d'extension cellulaire propre à chaque type cellulaire et au microenvironnement de la cellule, mais également par les événements de fusion et de fission mitochondriales. Nous avons étudié l'impact des mutations *OPA1* sur cette distribution des nucléoïdes. Nous avons utilisé deux lignées d'*OPA1* mutées, une présentant un réseau hyper-fragmenté et l'autre un réseau mitochondrial non-altéré, ainsi que des MEFs déplétés en *OPA1*.

La déplétion de la protéine *OPA1* dans les MEFs inhibe les événements de fusion mitochondriale conduisant à une fragmentation totale du réseau d'où la présence de mitochondries isolées plus ou moins sphéroïdes répartis dans toutes les surfaces cellulaires (H. Chen, McCaffery, et Chan 2007). Comme précédemment montré (H.

Chen, McCaffery, et Chan 2007; Ban-Ishihara et al. 2013), nous montrons une diminution de 75% du nombre de nucléoïdes et un grand nombre de mitochondries dépourvues de nucléoïdes détectables.

Fait intéressant, la diminution du nombre de copies ADNmt n'est par contre pas aussi importante que la diminution des nucléoïdes, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de molécules d'ADNmt plus important chez les MEFs *opa1*<sup>-/-</sup> comparés aux MEFs sauvages.

Dans les fibroblastes portant des mutations *OPA1*, nos résultats montrent que la distribution des nucléoïdes est toujours une activité contrôlée. Les mutations d'*OPA1* associées à une forte fragmentation du réseau mitochondrial, montrent également une augmentation du nombre de copies d'ADNmt par nucléoïde. L'existence de multicopies d'ADNmt par nucléoïde trouvées dans cette étude est compatible avec le 'faithful model'. Ce modèle défend l'existence de plusieurs molécules d'ADNmt par nucléoïde (Legros et al. 2004; Kaufman et al. 2007; R. W. Gilkerson et al. 2008), tandis que des études récentes de Kukat défendent un modèle de nucléoïde mitochondrial composé d'une molécule d'ADNmt unique compactée par TFAM, d'abord par la super-résolution, ensuite par des approches *in vitro* (Kukat et al. 2015). Les divergences peuvent provenir de différentes approches expérimentales appliquées dans les études, mais aussi des types cellulaires, ou d'un changement de métabolisme cellulaire induit par les conditions de la culture cellulaire (D. F. Bogenhagen 2012).

L'existence de nucléoïdes multigénomiques dans les mutations *OPA1* associées à une fragmentation du réseau mitochondrial et les MEFs *opa1*<sup>-/-</sup> suggère une difficulté pour les cellules à distribuer cet ADN à travers d'autres mitochondries dues à une diminution voir une perte d'événements de fusion. Cette structure complexe du nucléoïde contenant plusieurs molécules d'ADNmt altérerait la capacité de la machinerie de contrôle-qualité à sélectionner et éliminer l'ADNmt mutant favorisant ainsi l'expansion de mutations délétères (D.F. Bogenhagen 2012).

Nous avons montré que le nombre de nucléoïdes est relatif à la longueur des mitochondries, plus le réseau est long et large, plus le nombre de nucléoïdes est élevé. L'analyse d'image en 3-D montre toutefois que l'espacement des nucléoïdes augmente en vertu de cette configuration, tout en étant relativement faible dans les mitochondries fortement connectées, comme cela peut être le cas autour du MTOC (microtubule organizing center). La compréhension de la pertinence de la distribution des nucléoïdes est essentielle pour élucider son impact sur la fonction mitochondriale dans les tissus tels que les neurones. En effet dans ces cellules, l'organisation structurale notamment les grands prolongements cytoplasmiques est essentielle à leur fonction.

Nous avons montré que des mutations *OPA1* caractérisées par de graves défauts de fusion conduisent à une diminution du nombre de nucléoïdes. Cette diminution du nombre de nucléoïdes est associée à une augmentation du nombre des molécules ADNmt par nucléoïde, un mécanisme qui est présenté comme favorisant l'accumulation de mutations délétères, contribuant ainsi à la physiopathologie de l'ADOA.

Nous avons accessoirement montré que la baisse de la masse mitochondriale associée aux mutants fragmentés était corrélée à la diminution du nombre de nucléoïdes. Nos études, en plus de mettre en évidence une relation directe entre la plasticité de la membrane et la régulation des nucléoïdes, mettent également en évidence les faiblesses de la quantification du nombre de copies l'ADNmt comme outil reflétant la masse mitochondriale lors du diagnostic. Compte tenu de la corrélation étroite que nous avons trouvée entre la masse des mitochondries et le nombre des nucléoïdes, il pourrait être plus pertinent d'utiliser le nucléoïde comme un outil d'évaluation de la masse mitochondriale et donc du renouvellement mitochondrial.

La mitophagie et l'autophagie dans les  
mutations d'*OPA1*



## Article 2

### ***OPA1* mutations on autophagy: relevance to the pathogenesis of mitochondrial optic neuropathies**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Layal ISHAK<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup>

**Soumis à Journal of Medical Genetics**

## Introduction

L'Atrophie optique autosomique dominante (DOA) est une maladie rare (fréquence 1/30000), qui affecte la fonction et la survie du nerf optique. La DOA est cliniquement caractérisée par une apparition juvénile avec une réduction bilatérale progressive de l'acuité visuelle, une pâleur temporelle de la papille optique et une tritanopie. Il y a une variabilité intra et interfamiliale dans la progression et la gravité de la maladie. Des mutations dans le gène atrophie optique 1 (*OPA1* AIM # 605290) sont responsables d'environ 60 à 80% des cas de DOA (Kjer 1959; Delettre et al. 2000; Alexander et al. 2000; Amati-Bonneau et al. 2005; Yu-Wai-Man et al. 2011).

Des études génotypiques-phénotypiques des atrophies optiques ont conduit à l'identification d'un nouveau groupe "DOA plus" (DOA+), qui présente des signes cliniques sévères apparaissant chez le jeune adulte et représentant 20% des cas d'atrophie optique associés à *OPA1*. Ces formes syndromiques de l'atrophie optique comprennent une surdité, une myopathie, une encéphalopathie et une neuropathie (Amati-Bonneau et al. 2008). La fin des années 2000 a vu l'émergence d'un nouveau phénotype, sévère et précoce, associé à des mutations d'*OPA1*. Les signes cliniques évoquaient le syndrome de Behr (OMIM %210000).

Même si les caractéristiques cliniques semblent se confondre, des différences physiopathologiques existent entre le syndrome de Behr et le DOA+.

En effet, l'âge de début de l'atrophie optique et le tableau neurologique est différent dans les deux syndromes. Le syndrome de Behr est une maladie infantile (début avant 3 ans), tandis que le DOA+ semble concerner principalement des adultes dans leur troisième ou quatrième décennie. Les mécanismes physiopathologiques des maladies liées aux mutations d'*OPA1* sont activement étudiés. Ces études montrent un lien avec une perturbation de la dynamique mitochondriale, une instabilité de l'ADNmt et une altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ces différents événements activeraient une cascade moléculaire irréversible vers la mort cellulaire. Plusieurs études ont démontré une réduction des activités des

différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment le complexe I et le complexe IV, dans des biopsies musculaires et des fibroblastes obtenus à partir de patients atteints de DOA associés à des mutations confirmées d'*OPA1* (Lodi et al. 2011; Hudson et al. 2008; Guillery et al. 2008; Chevrollier et al. 2008). Néanmoins, ces altérations ne sont pas la marque de toutes les mutations *OPA1*; toutes les mutations ne sont pas associées à des déficits énergétiques, ni à des déplétions de l'ADNmt ou des délétions multiples de l'ADNmt.

Il n'y a pas d'hypothèse physiopathologique majeure dans les pathologies liées à *OPA1*. Il existe probablement une cascade d'altérations en fonction des types de mutations. De même que la question à savoir pourquoi les mutations *OPA1* conduisent la plupart du temps à la dégénérescence sélective des cellules ganglionnaires de la rétine, ou par extension à celle des neurones reste à découvrir.

Plusieurs études ont émis l'hypothèse d'une dépréciation possible du contrôle-qualité des mitochondries dans le mécanisme de neurodégénérescence observée dans l'atrophie optique. En effet, les études de Twig *et al.* montrent que la fission et une fusion sélective régissent la ségrégation mitochondriale et leur élimination par autophagie. Leurs expériences de pulse-chase et d'inhibition de l'autophagie à l'étape pré-protéolyse montrent que les mitochondries ciblées par la machinerie de dégradation perdaient leur  $\Delta\Psi_m$  et présentaient par ailleurs des taux d'*OPA1* fortement diminués (Twig et al. 2008). La machinerie de la dynamique mitochondriale, en particulier *OPA1*, intervient donc dans la régulation de la dégradation mitochondriale. De plus, les observations d'une accumulation d'autophagosomes chez les souris knock-in *OPA1* confortent l'hypothèse d'une altération de la voie autophagique (Sarzi et al. 2012). L'autophagie constitue une voie de survie cellulaire en cas de carence nutritive par exemple qui assure la dégradation appropriée des organites et un recyclage des composants cellulaires. La qualité et le nombre des mitochondries sont réglementés par la mitophagie, un processus par lequel les mitochondries excessives ou endommagées sont soumises à la dégradation autophagique. Une dérégulation de la mitophagie contribue à une accumulation de mitochondries endommagées conduisant ainsi à une perte

neuronale progressive dans de nombreuses maladies neurodégénératives y compris la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Plusieurs éléments suggèrent une régulation bidirectionnelle entre la machinerie de dégradation et les mitochondries. Les niveaux d'ATP, l'équilibre redox, la production de ROS et la morphologie des mitochondries constituent des signaux pro-autophagiques (Hardie 2011; Morselli et al. 2009; Rambold et al. 2011). Un lien étroit existe entre les acteurs de la dynamique mitochondriale et la machinerie autophagique. En effet, plusieurs études ont montré que la fission mitochondriale était l'étape initiatrice de la dégradation autophagique des mitochondries altérées.

Nous avons travaillé à partir de lignées primaires de fibroblastes de patients DOA+ et Behr. Nous avons étudié l'impact des altérations du réseau mitochondrial et de la phosphorylation oxydative sur l'activation des voies de la mitophagie et de l'autophagie chez ces patients.

**Effects of *OPA1* mutations on mitochondrial turnover: relevance to the pathogenesis of mitochondrial optic neuropathies**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Loyal ISHAK<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>PREMMi/Mitochondrial Medicine Research Centre, Institut MITOVASC, CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Université d'Angers, CHU d'Angers, Angers, France.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Département de Biochimie et Génétique, Angers, France.

<sup>3</sup>RGM4645 Université Blaise Pascal, Aubière, F-63000 France.

**\*: Correspondence should be addressed to:**

Arnaud Chevrollier, PhD

Université d'Angers, UMR CNRS 6214, INSERM U1083,

CHU Bât IRIS/IBS, Rue des Capucins,

49933 Angers cedex 9

FRANCE.

[arnaud.chevrollier@univ-angers.fr](mailto:arnaud.chevrollier@univ-angers.fr)

+ 33 (0) 2 44 68 84 05    **Fax:** + 33 (0) 2 41 35 40 17

## Abstract

**Background:** *OPA1* mutations cause mitochondrial dynamic-disorders ranging from isolated Dominant Optic Atrophy (DOA) to distinct multisystemic presentations: the neurological and muscular DOA<sub>plus</sub> developing in early adulthood related to heterozygous *OPA1*-missense mutations with a dominant negative effect and the severe infantile-onset neurological disorder Behr syndrome, which is associated to haplo-insufficiency compound-heterozygous *OPA1* mutations. In this study, we report a new genotype-phenotype correlation between *OPA1* mutation types and mitochondrial turnover.

**Methods:** Mitochondrial respiration analysis was done by oxygraphy using patient fibroblasts. Mitochondrial morphology and mitophagy analysis were assessed by 3D fluorescent microscopy. LC3II and P62 macroautophagy proteins were quantified by Western-blot.

**Results:** Crucial parameters of mitochondrial turnover were similarly increased in DOA+ in response to a highly mitochondrial fragmented network and mitochondrial uncoupling. In contrast, Behr fibroblasts showed a substantial reduced mitochondrial turnover even upon mitochondrial induced injuries.

**Conclusions:** Our results disclose for the first time distinct alterations of mitochondrial physiology and turnover in *OPA1* mutated cells underlining the necessity to develop different therapeutics strategies in mitochondrial dynamics-related diseases.

Mitochondrial disorders remain a highly heterogeneous group due to the dual genomic background of proteins involved in the regulation of mitochondria function and integrity (Yu-Wai-Man et al. 2011; Lenaers et al. 2012a; Chao de la Barca et al. 2015). *OPA1*, a nuclear-encoded gene, is linked to a spectrum of inherited disorders all including a visual impairment due to retinal ganglion cell and optic nerve degeneration (Yu-Wai-Man et al. 2011; Lenaers et al. 2012a; Chao de la Barca et al. 2015). The first identified, Dominant Optic Atrophy (DOA, MIM#165500) is characterized by isolated progressive, irreversible bilateral visual impairment, occurring during the first two decades of life, with temporal disc pallor at fundus examination, loss of the central visual field and color vision defect (Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000), the severity of visual loss being highly variable between and within families, and in most cases associated to *OPA1* haplo-insufficiency (Burté et al. 2015). In isolated DOA (Chao de la Barca et al. 2015), only mild to severe visual impairments are reported without secondary symptom. Later, it was evidenced that in 20% of DOA cases, individuals had additional symptoms, including sensorineural deafness, ataxia, myopathy, chronic progressive external ophthalmoplegia and peripheral neuropathy, which appear progressively during the second decade of life and after. In most cases, this syndrome called *DOAplus* (DOA+, MIM#125250) is associated to dominant negative mutations affecting *OPA1* GTPase domain (Amati-Bonneau et al. 2005; Yu-Wai-Man et al. 2011).

Recently, we and others reported that the Behr syndrome (MIM#210000), an infantile and severe neurological disorder, associating DOA to spinocerebellar degeneration, pyramidal signs, peripheral neuropathy, gastrointestinal dysmobility and retarded development, is caused by biallelic *OPA1* mutations (Bonneau et al. 2014; Carelli, Sabatelli, et al. 2015). Other extremely rare associations including DOA and spastic paraplegia, multiple sclerosis-like syndrome, Parkinsonism and dementia have also been reported recently in heterozygous *OPA1* mutated individuals (Carelli, Musumeci, et al. 2015; Verny et al. 2008; Yu-Wai-Man et al. 2011), as well as DOA associated to a severe encephalopathy and hypertrophic cardiomyopathy in a homozygous consanguineous family (Spiegel et al. 2016). Thus, high phenotypic diversity ranging from moderate and isolated optic atrophy to severe neonatal syndromes is related to the types of *OPA1*

mutation and to their mono- or bi-allelic inheritance, and eventually to altered mitochondrial genome integrity.

Anchored to the mitochondrial inner membrane, OPA1 is a large GTPase from the dynamin family, which is involved in mitochondrial network morphology and dynamics, and inner membrane cristae structure (Cipolat et al. 2004; Chevrollier et al. 2008). Dysfunctions associated to *OPA1* mutations have been studied in several cellular and animals models, and all revealed altered fusion activity, increased susceptibility to apoptosis (Bossy-Wetzel et al. 2003), bioenergetic defects (Chevrollier et al. 2008; Nochez et al. 2009), altered calcium homeostasis (Fülöp et al. 2015), accumulation of autophagosomes (Sarzi et al. 2012) and compromised synaptic maturation and dendritogenesis (Ambre M. Bertholet et al. 2013; Leruez et al. 2013).

How *OPA1*-defects lead to these syndromes remains elusive. So far, the scientific body agrees that it is a combination of disturbed mitochondrial dynamics, mtDNA instability and impaired mitochondrial oxidative phosphorylation that may be behind neuronal loss (Spiegel et al. 2016). Nevertheless, in our experience, patient fibroblasts derived from skin biopsies carrying different *OPA1* mutations are far from having homogenous phenotypes. Indeed, for example, the fragmentation of the mitochondrial network as well as the bioenergetics defects are not hallmarks of all DOA fibroblasts, suggesting that different pathological mechanisms are related to different *OPA1* mutations, and that the genetic background could further impact the expressivity of the *OPA1*-related mitochondrial dysfunctions. Consequently the variability of the clinical expression may be related to distinct biological defects associated to *OPA1* mutations. In several other neurodegenerative diseases including Parkinson's and Alzheimer's disease, neuronal loss was attributed to altered mitochondrial turnover (Palikaras and Tavernarakis 2014). Given the regulatory role of mitochondrial dynamics actors including OPA1, in mitophagy and autophagy processes, we support that mitochondrial turnover is differently impacted in Behr and DOA+ patients.

*OPA1* skin fibroblasts of this study were inferred from DOA+ and Behr patients ((Hudson et al. 2008; Bonneau et al. 2014) and this study) and their genotypes are described in supplementary table I. The Behr bi-allelic mutations combined the missense mutation p.Ile382Met in the GTPase domain to a second pathogenic truncative or



missense mutation. The DOA+ p.Ser545Arg mutation is located in the dynamin domain of OPA1. Pathophysiological analysis of syndromic DOA+ forms mainly associated to the recurrent p.Arg445His amino acid change, revealed a dominant negative effect of *OPA1* mutations associated to a highly fragmented network, respiration impairment and increased susceptibility to apoptosis (Amati-Bonneau et al. 2005). The data that we report here with the dominant-negative OPA1-p.Ser545Arg isoform perfectly fits with previous observations. Indeed, morphometric analysis of mitochondrial network of DOA+ fibroblasts with the p.Ser545Arg mutation showed mitochondrial network hyperfragmentation (Figure 1A and see online supplementary methods), while Behr fibroblasts with compound heterozygous mutations displayed a less fragmented network (Figure 1A). Quantification of mitochondrial to cellular volume ratio showed a 20% decrease of mitochondrial content in DOA+ fibroblasts, compared to controls, while no significant loss of mitochondrial volume was evidenced in Behr fibroblasts (Figure 1A). Mitochondrial respiratory function was assessed in DOA+ and Behr fibroblasts. The oligomycin-insensitive respiration, i.e. independent of ATP-synthase, was 1.5 higher in DOA+ compared to control fibroblasts, indicating increased non-phosphorylating respiration. These DOA+ fibroblasts showed a lower respiratory control ratio (RCR) compared to Behr and control fibroblasts, indicating a mild uncoupling. The RCRp showed that the respiration-related to ATP production was also higher in DOA+. And, as regard to the basal respiration in all groups, to reach such ATP production, DOA+ cells use a greater portion of their respiratory reserve capacity than do control and Behr fibroblasts, as reflected by the ratio of basal respiration to the FCCP-uncoupled respiration (R/FCCP) (Fig.1B). Thus, conversely to DOA+ cells that display mild uncoupling, Behr fibroblasts do not show significant deficiency of mitochondrial respiration.

We further assessed by Western-blot analysis, the amount of proteins from the different respiratory complexes, and found a significant increase in the ATP5A complex V subunit in DOA+ compared to control cells, witnessing a compensatory mechanism to sustain ATP production (see supplementary, Figure 1S). We also found a mild increase of ATP5A in Behr fibroblasts. Altogether, these data revealed that DOA+ fibroblasts

present a clear alteration of mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation, whereas these parameters were not significantly affected in Behr cells.

To gain further insights in DOA+ and Behr pathophysiology, we assessed the latent micromitophagy level, by measuring the colocalization of lysosomes and mitochondria, a parameter reflecting mitochondrial degradation events. Using micropatterned coverslips to standardize cell size and shape, colocalization quantifications showed a significantly higher rate of mitophagy events in DOA+ fibroblasts, compared to control and Behr cells (Figures 2A and B). In addition, we found an increased number of lysosomes in DOA+ fibroblasts, whereas in Behr cells the amount of lysosomes remained similar to controls (Figure 2A). Transmission electron microscopy observations and quantifications of autophagosome-like structures, reflecting macroautophagy, further revealed a significant lower number of autophagosomes in Behr compared to DOA+ fibroblasts, hinting a latent lower rate of mitochondrial turnover in Behr fibroblasts (Figure 2B and supplementary 2S). Thus, mitochondrial hyperfragmentation caused by OPA1-p.Ser545Arg mutation facilitates mitophagy in DOA+, while this process is not observed in Behr fibroblasts, suggesting either that it is not latently activated, as in DOA+ fibroblasts, or is functionally impaired.

To clarify the efficiency of macroautophagy activation in Behr and DOA+ fibroblasts, we assessed the amounts of LC3II and P62 proteins, which reflect the autophagy process, whole-mitochondria degradation being dependent of the macroautophagy pathway (Komatsu et al. 2007). In the absence of induction of the autophagy pathway, we found that LC3II level was significantly lower in Behr fibroblasts, compared to DOA+ cells, while P62 expression level was higher in Behr compared to DOA+ fibroblasts, suggesting that macroautophagy is impaired in Behr cells (Figure 2C and Supplementary 3S).

To assess the efficiency of autophagy fluxes, we first modulated this process using chloroquine (CQ), an inhibitor of autophagy that prevents the fusion of autophagosomes and lysosomes, thereby blocking vesicle breakdown and degradation, and LC3II recycling (Moon et al. 2015). Following CQ treatment, more than 80% of LC3 was under its unconjugated LC3II form in DOA+ fibroblasts, whereas the opposite effect was observed in Behr and control fibroblasts (Figure 2C). Hence, CQ induced an

accumulation of P62 levels in control and DOA+ fibroblasts (Figure 2C), but not in Behr cells. Thus, these results suggest that the autophagy flux is affected in Behr fibroblasts, while this process is over-stimulated in DOA+ cells.

We then assessed the consequences of autophagy induction, using the mitochondrial uncoupler CCCP that collapses the mitochondrial membrane potential to boost the elimination of damaged mitochondria by macroautophagy (East et al. 2014). In the three genetic backgrounds, CCCP induced an increase of LC3II expression, witnessing an efficient autophagy response. Nevertheless, while CCCP treatment induced 100% of LC3 conversion in LC3II in controls and DOA+ cells, a restricted 75% conversion was observed in Behr fibroblasts (Figure 2C). Micromitophagy and macroautophagy are highly stimulated in DOA+, most probably because mitochondria are fragmented and also because despite a mild uncoupling, mitochondrial ATP production is supported through increased oxidative phosphorylation activity. These two signals, together trigger mitochondrial elimination and turn-over (Gomes and Scorrano 2013). Recent studies have considered a relationship between mitochondrial degradation and energetic activity, thereby showing that stimulation of mitochondrial OXPHOS enhances mitochondrial degradation rate (Melser et al. 2013). This bulk renewal contributes to maintain ATP production through changes in mitochondrial ultrastructure and dynamics (Cogliati et al. 2013; MacVicar and Lane 2014), all features found in our studied cohort of DOA+ patients. In the canonical presentation (Chao de la Barca et al. 2015) of Behr syndrome, associated to bi-allelic *OPA1* mutations, we found a clear haplo-insufficiency process in the studied cell lines, suggesting that only the OPA1-p.Ile382Met hypomorphic isoform is active in mitochondria. Surprisingly, as for isolated DOA, the consequences on mitochondrial physiology and structure were mild, suggesting that the residual activity of the OPA1- p.Ile382Met protein is fair. Nevertheless, we evidenced that the micromitophagy and macroautophagy were strongly down-regulated and consequently that the mitochondrial turn-over is reduced. This might be related to a consistent decrease of mitochondrial fusion and fission rates, while respecting the equilibrium between these processes, which would consistently decrease the opportunity to fuse efficiently mitochondria to autophagolysosomes. Behr patients' inability to eliminate defective mitochondria would be due to the absence of mitophagic stimuli and slow autophagy

flux. Thus, in *OPA1*- related Behr patients, the low rate of mitochondrial life cycle early in their life time period, when mitochondrial biosynthesis and function are critical for the neurological development and maturation would jeopardize neuron survival, by the accumulation of deficient mitochondria prone to apoptosis. Altogether, these data evidenced divergent pathophysiological mechanisms for the DOA+ and Behr syndromes that will impinge the investigations of future therapeutic routes.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the following patients' foundations: "*Ouvrir les Yeux*", "*Association contre les Maladies Mitochondriales*", "*Retina France*", "*Union Nationale des Aveugles et Déficients Visuels*", "*Fondation VISIO*" and "*Kjer France*". We acknowledge the support from the INSERM, CNRS, Université d'Angers, CHU d'Angers, la Région Pays de Loire and Angers Loire Métropole. We thank the SCIAM "*Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques, Université d'Angers*" for transmission electron microscopy acquisitions. Finally we would like to thank Dr Savennières and Dr Pingouin for their support. We wish to thank our Mitolab colleagues for fruitful discussions.

## References

- 1 Yu-Wai-Man P, Trenell MI, Hollingsworth KG, Griffiths PG, Chinnery PF. OPA1 mutations impair mitochondrial function in both pure and complicated dominant optic atrophy. *Brain J Neurol* 2011;134:e164.
- 2 Lenaers G, Hamel C, Delettre C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P, Milea D. Dominant optic atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:46.
- 3 Chao de la Barca JM, Prunier-Mirebeau D, Amati-Bonneau P, Ferré M, Sarzi E, Bris C, Leruez S, Chevrollier A, Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Verny C, Hamel C, Miléa D, Procaccio V, Bonneau D, Lenaers G, Reynier P. OPA1-related disorders: Diversity of clinical expression, modes of inheritance and pathophysiology. *Neurobiol Dis* Published Online First: 23 August 2015. doi:10.1016/j.nbd.2015.08.015
- 4 Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;26:211–5.
- 5 Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;26:207–10.
- 6 Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2015;11:11–24.
- 7 Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, Ayuso C, Odent S, Arrouet C, Verny C, Calmels M-N, Simard G, Belenguer P, Wang J, Puel J-L, Hamel C, Malthièry Y, Bonneau D, Lenaers G, Reynier P. OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 2005;58:958–63.
- 8 Bonneau D, Colin E, Oca F, Ferré M, Chevrollier A, Guéguen N, Desquiret-Dumas V, N’Guyen S, Barth M, Zanlonghi X, Rio M, Desguerre I, Barnerias C, Momtchilova M, Rodriguez D, Slama A, Lenaers G, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Reynier P. Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1. *Brain J Neurol* 2014;137:e301.

- 9 Carelli V, Sabatelli M, Carrozzo R, Rizza T, Schimpf S, Wissinger B, Zanna C, Rugolo M, La Morgia C, Caporali L, Carbonelli M, Barboni P, Tonon C, Lodi R, Bertini E. 'Behr syndrome' with OPA1 compound heterozygote mutations. *Brain J Neurol* 2015;138:e321.
- 10 Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, La Morgia C, Del Dotto V, Porcelli AM, Rugolo M, Valentino ML, Iommarini L, Maresca A, Barboni P, Carbonelli M, Trombetta C, Valente EM, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P, Rizzo G, Tonon C, Lodi R, Avoni P, Liguori R, Baruzzi A, Toscano A, Zeviani M. Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *Ann Neurol* 2015;78:21–38.
- 11 Verny C, Loiseau D, Scherer C, Lejeune P, Chevrollier A, Gueguen N, Guillet V, Dubas F, Reynier P, Amati-Bonneau P, Bonneau D. Multiple sclerosis-like disorder in OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 2008;70:1152–3.
- 12 Spiegel R, Saada A, Flannery PJ, Burté F, Soiferman D, Khayat M, Eisner V, Vladovski E, Taylor RW, Bindoff LA, Shaag A, Mandel H, Schuler-Furman O, Shalev SA, Elpeleg O, Yu-Wai-Man P. Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation. *J Med Genet* 2016;53:127–31.
- 13 Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15927–32.
- 14 Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo M-AP, Verny C, Ferre M, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 2008;63:794–8.
- 15 Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:706–16.
- 16 Nochez Y, Arsene S, Gueguen N, Chevrollier A, Ferré M, Guillet V, Desquiret V, Toutain A, Bonneau D, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Pisella P-J, Reynier P. Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect. *Mol Vis* 2009;15:598–608.
- 17 Fülöp L, Rajki A, Maka E, Molnár MJ, Spät A. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake correlates with the severity of the symptoms in autosomal dominant optic atrophy. *Cell Calcium* 2015;57:49–55.

- 18 Sarzi E, Angebault C, Seveno M, Gueguen N, Chaix B, Bielicki G, Boddaert N, Mausset-Bonnefont A-L, Cazevieille C, Rigau V, Renou J-P, Wang J, Delettre C, Brabet P, Puel J-L, Hamel CP, Reynier P, Lenaers G. The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain J Neurol* 2012;135:3599–613.
- 19 Bertholet AM, Millet AME, Guillermin O, Daloyau M, Davezac N, Miquel M-C, Belenguer P. OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. *Brain J Neurol* 2013;136:1518–33.
- 20 Leruez S, Milea D, Defoort-Dhellemmes S, Colin E, Crochet M, Procaccio V, Ferré M, Lamblin J, Drouin V, Vincent-Delorme C, Lenaers G, Hamel C, Blanchet C, Juul G, Larsen M, Verny C, Reynier P, Amati-Bonneau P, Bonneau D. Sensorineural hearing loss in OPA1-linked disorders. *Brain J Neurol* 2013;136:e236.
- 21 Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 2014;56:182–8.
- 22 Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain J Neurol* 2008;131:329–37.
- 23 Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-S, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J-I, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S-I, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007;131:1149–63.
- 24 Moon J-H, Eo SK, Lee JH, Park S-Y. Quercetin-induced autophagy flux enhances TRAIL-mediated tumor cell death. *Oncol Rep* 2015;34:375–81.
- 25 East DA, Fagiani F, Crosby J, Georgakopoulos ND, Bertrand H, Schaap M, Fowkes A, Wells G, Campanella M. PMI: a  $\Delta\Psi_m$  independent pharmacological regulator of mitophagy. *Chem Biol* 2014;21:1585–96.
- 26 Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:205–12.
- 27 Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, Goorden S, Priault M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, Bénard G. Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* 2013;17:719–30.

28 Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 2013;155:160–71.

29 MacVicar TDB, Lane JD. Impaired OMA1-dependent cleavage of OPA1 and reduced DRP1 fission activity combine to prevent mitophagy in cells that are dependent on oxidative phosphorylation. *J Cell Sci* 2014;127:2313–25.



**Figure 1 Behr fibroblasts do not show severe mitochondrial fragmentation and coupling defect, compared to DOA+ fibroblasts.**

(A) Mitochondrial network in control (CTL), DOA+ and Behr fibroblasts. Mitochondrial lengths were assessed and color coded (e.g.: red color represents mitochondria > 20µm). Quantifications of mitochondrial length (left) and volume (right) were performed after standardization of cell size and shape, using micropatterned coverslips. Scale Bar = 10 µm

(B) Total cellular ATP concentration and mitochondrial oxidative phosphorylation were analyzed on control (CTL), DOA+ and Behr fibroblasts. ATP concentrations of DOA+ and Behr fibroblasts were normalized to that of control cells. Oxygen consumption was measured under basal conditions (Basal respiration graph), in the presence of oligomycin (4µg/ml) (oligomycin-insensitive respiration graph) and in the presence of FCCP (4mM). The respiratory control ratio (RCR graph) was calculated as the ratio of the FCCP-uncoupled to the oligomycin-insensitive respiration. Respiration coupled to ATP production (RCRp graph) was calculated as the ratio of the difference between the rates of basal and oligomycin-insensitive respiration to the uncoupled FCCP respiration. Respiratory reserve capacity was calculated as the ratio of basal respiration to the FCCP-uncoupled respiration (R/FCCP graph). Data were analyzed from six independent experiments and are presented as mean ± SD, normalized to controls. Differences between cell lines were analyzed by Student-t-test: (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

**Figure 2 Mitophagy and autophagy are reduced in Behr fibroblasts compared to DOA+ patients' fibroblasts.**

(A) Fibroblasts obtained from controls (left), and DOA+ (middle) and Behr (right) patients were analyzed by video-microscopy using Mitotracker-Red for mitochondrial network staining and Lyso-ID green for lysosomes and autophago-lysosomes staining. Scale bar = 10 µm

(B) Quantification analysis of mitophagic events from image acquisitions.

Black image enlargements show mitochondrial fragments (in red), lysosomes (green), large lysosomes ( $\geq 1.8$  µm, yellow) and colocalization between lysosomes and mitochondria (blue boxes). The number of mitochondria-lysosome colocalization (micromitophagy) (left graph) and the number of large lysosomes  $\geq 1.8$  µm (middle graph) were quantified from 30 randomly selected fibroblasts, from five independent experiments.

Autophagic vesicles (right graph) were counted from 10-randomly chosen acquisitions from transmission electron microscopy pictures (see supplementary data, figure 2), and averaged for each genotype.

(C) Autophagy level in control, DOA+ and Behr fibroblasts were assessed by quantitative analysis of the macroautophagy markers LC3II (LC3B) and P62 in total cell lysates from

cells incubated in normal conditions (DMSO), with Chloroquine and with CCCP for 24h using Western Blot analysis (see supplementary data, figure 3).

Data are represented as LC3II conversion (LC3II/Total LC3I+II) and P62 normalized to TUBA. To modulate and test efficiency in these cell-lines, control and patient fibroblasts were incubated in presence of either DMSO, the autophagy inhibitor Chloroquine (4h) or a mitochondrial uncoupler CCCP (24h).

Results are represented as percentage to control cells  $\pm$  SD (n=6). Differences between the cell lines were analyzed by Student-*t*-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

## Supplementary data

### Table S1: Genotypes of *OPA1* syndromic DOA+ and Behr patients.

**Figure 1S:** Western blot of respiratory chain subunits in control, DOA+ and Behr fibroblasts. Expressions of ATP5A from complex V and COXII from complex IV were normalized to P84, a cytosolic protein marker, and VDAC, a mitochondrial marker. Data were collected from five independent experiments and results are represented as percentage to matching controls  $\pm$  SD. Differences between cell lines were analyzed by Student-*t*-test: (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

**Figure 2S:** Transmission electron microscopy pictures of autophagic-vesicles (white arrows).

**Figure 3S:** Autophagy level in control, DOA+ and Behr fibroblasts were assessed by quantitative analysis of the macroautophagy markers LC3II and P62 in total cell lysates from cells incubated in normal conditions (DMSO), with Chloroquine and with CCCP for 24h using Western Blot analysis.

## **Material and Methods**

**Patients Cohort-** Written informed consent was obtained from patients participating to this study, which was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Angers (*Comité de Protection des Personnes CPP Ouest II – Angers, France*; identification number CPP CB 2014/02; Declaration number DC-2011-1467 and Authorization number AC-2012-1507). As control, we used fibroblasts from five healthy age matched individuals with no sign of optic atrophy. The genotype of the 2 dominant negative DOA+ and 4 haplo-insufficiency Behr patients is described in the supplementary table 1.

**Cell culture and reagents-** Primary fibroblast cultures were established using standard procedures (Chevrollier *et al.*, 2008). Cells were used at approximately 80% confluency, and treated with vehicles (Dymethylsulfoxide 1%, Sigma), chloroquine diphosphate salt (60  $\mu$ M Sigma) and CCCP (10  $\mu$ M, Sigma) for the indicated times.

**Imaging and analysis-** For mitochondrial live-cell imaging, cells were either plated on glass coverslips (Labtek) one day before imaging, or seeded on micropatterned coverslips (Cytoo SA), 4 hours prior to image acquisitions (Chevrollier *et al.*, 2012). For lysosomes staining, cells were stained with Lyso-ID (Enzolife Technologies) according to the manufacturers' guidelines. Data were inferred from a mean of 100 cell acquisitions from XXL micropatterned slides. Statistical analysis was performed by Student-*t*-test.

**Immunoblotting analysis-** Total protein extracts (25-60  $\mu$ g) were separated on acrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes (GE healthcare, life sciences). Proteins were detected using mouse anti-LC3 (1/2000, Enzo, #ALX-803-081-C100), mouse anti-VDAC (1/2000, Abcam, #ab34726), rabbit anti-P62 (1/1000, Enzo, #BML-PW9860-0100), mouse anti-P84 (1/1000, Abcam, #ab487), mouse anti-Human Oxphos (1/1000, Abcam, #ab110411) and mouse anti-tubulin (1/2000, Sigma, #T9026). Anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibodies (GE healthcare, life sciences) were used at 1/10 000 and 1/20 000 respectively, and signals detected using a chemiluminescence system (Super signal<sup>®</sup> west femto, Thermo Scientific, #34095).

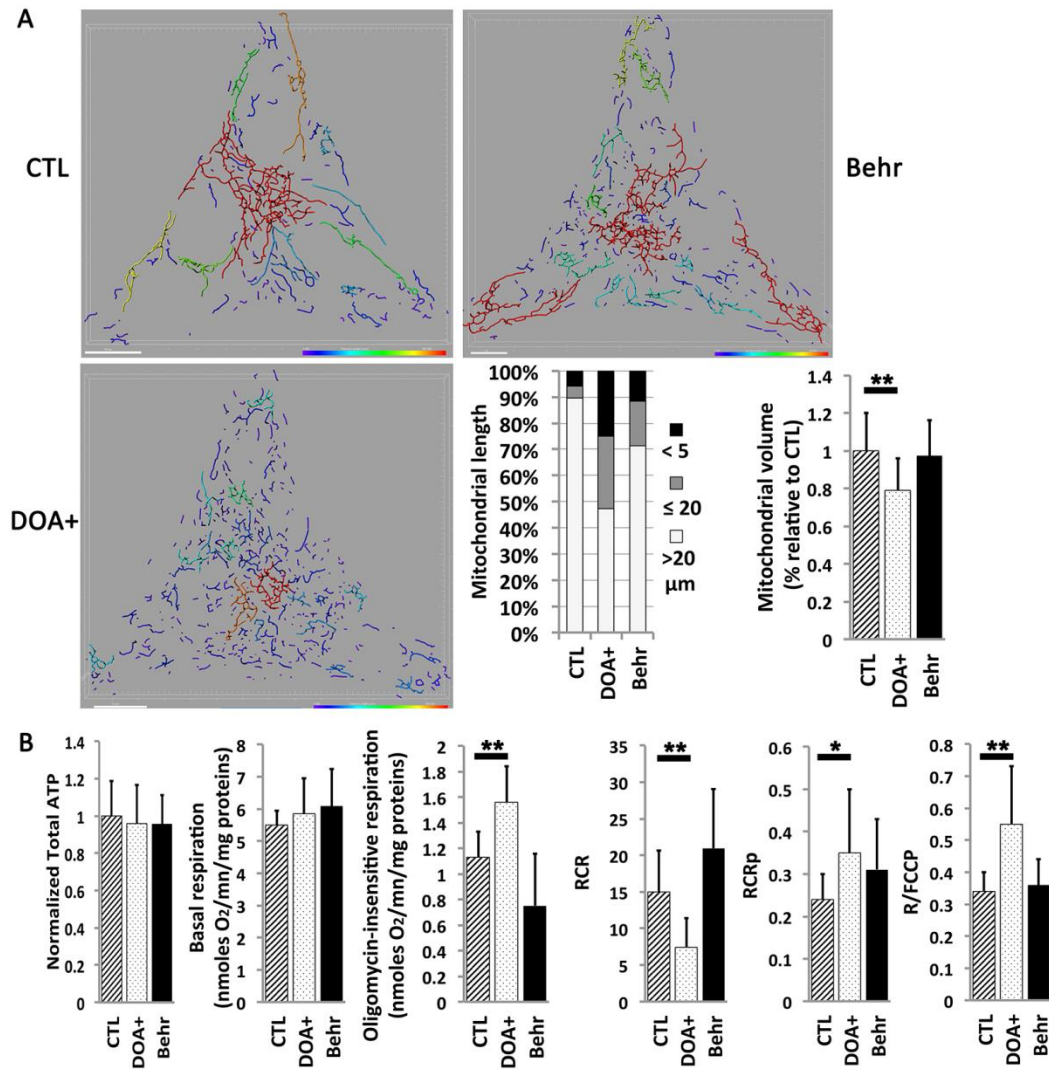
***Mitochondrial respiration measurements-*** Respiration rates were assessed on intact cells ( $1.1 \times 10^6$  cells) suspended in DMEM-F12 according to Loiseau *et al*, 2007.

***Measurement of ATP-*** ATP levels were measured using a Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay according to manufacturer's guidelines (Promega, Madison, WI, USA).

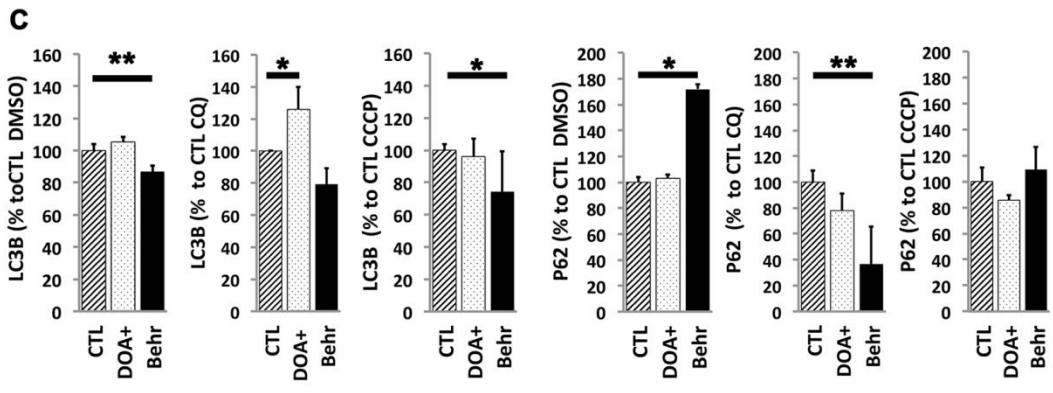
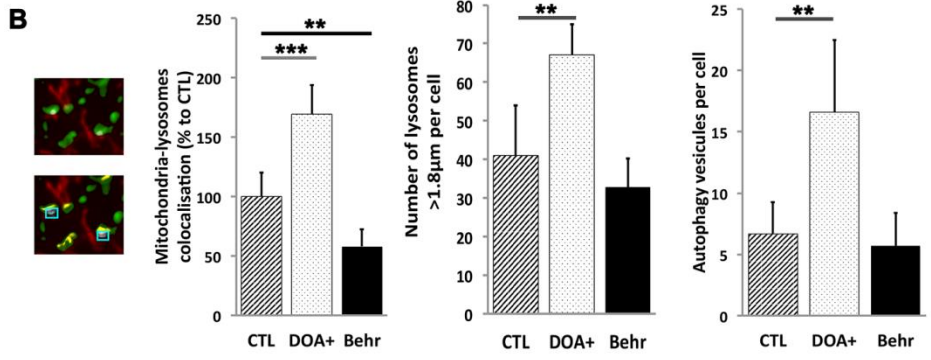
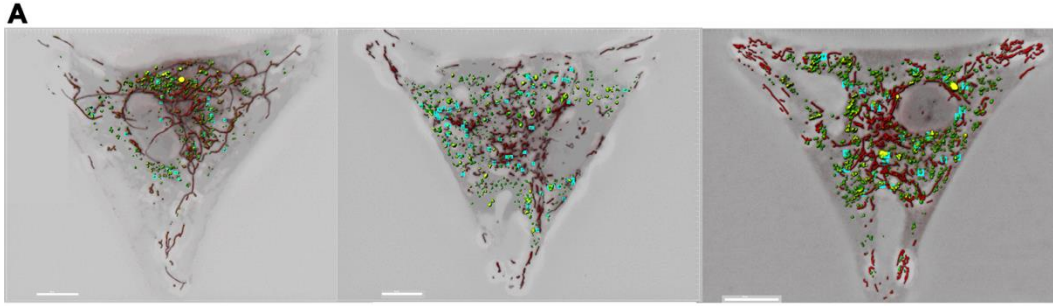
***Electron microscopy-*** The samples used for transmission electron microscopy were processed using standard protocols (Cassereau *et al*, 2008). Analysis and measurements were performed on 10 cells from each patient fibroblast.

***Statistical analysis-*** Statistical analysis was performed using GraphPad statistical software (San Diego, CA). Independent sample *t*-test was used for two group comparisons, as required. For all analysis, a *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

## Figures



**Figure 1**

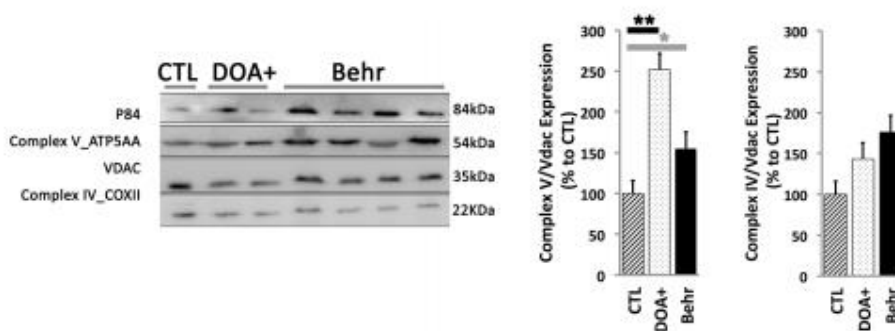


**Figure 2**

## Supplementary data

Patients (gender, age)	Optic Atrophy	Mutations in OPA1	Domain	Syndrom	References
Patient 1 (M, 42 years)	+	p.Ser545Arg	Dynamin	DOA+	Hudson <i>et al</i> , 2008
Patient 2 (M, 49 years)	+	p.Ser545Arg	Dynamin	DOA+	Hudson <i>et al</i> , 2008
Patient 3 (M, 1 year)	+	p.Ile382Met p.Arg824*	GTPase truncative	Behr	Bonneau <i>et al</i> , 2014
Patient 4 (F, 4 years)	+	p.Ile382Met p.Arg557*	GTPase truncative	Behr	Bonneau <i>et al</i> , 2014
Patient 5 (M, 15 years)	+	p.Ile382Met p.Glu487Lys	GTPase truncative	Behr	Bonneau <i>et al</i> , 2014
Patient 6 (M, 16 years)	+	p.Ile382Met ?	GTPase	Behr	This study

**Table S1: Genotypes of *OPA1* syndromic DOA+ and Behr patients.**



**Figure S1**

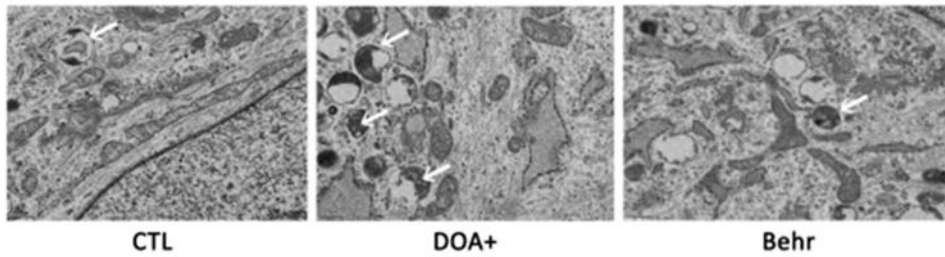


Figure S2

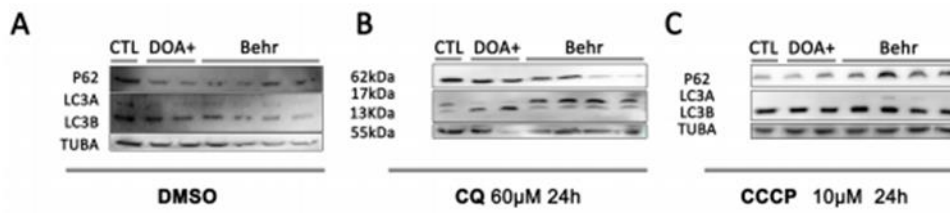


Figure S3

<b>OPA1 mutation</b>	<b>DOA+</b> delayed onset	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severe mitochondrial fragmentation</li> <li>- Stimulated OXPHOS</li> <li>- OXPHOS coupling defect</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Micromitophagy : LC3 independant</li> <li>+ Macroautophagy : LC3 dependant</li> <li>= major mitochondrial turnover</li> </ul>
	<b>Behr</b> early onset	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mild mitochondrial fragmentation</li> <li>- No OXPHOS defect</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Micromitophagy</li> <li>- Macroautophagy</li> <li>= weak mitochondrial turnover</li> </ul>

Synopsis



## Résultats et Discussion

Le déséquilibre entre la fission et la fusion mitochondriale induit différentes réponses autophagiques. La fusion et la formation de mitochondries hyper-tubulaires auraient un rôle de protection tandis que la fission qui engendre des mitochondries courtes faciliterait la mitophagie (Gomes, Di Benedetto, et Scorrano 2011). De ce fait les défauts d'*OPA1* altèreraient le contrôle-qualité des mitochondries, rendant par ce biais les cellules sensibles aux facteurs de stress en particulier les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) et les neurones (Chao de la barca et al. 2015 ; Alavi et Fuhrmann 2013; White et al. 2009; Chen et al. 2009; Twig et al. 2008). Les études sur les modèles murins *OPA1*<sup>+/-</sup> disponibles ont montré une augmentation du nombre d'autophagosomes dans la couche des CGRs par rapport aux souris de type sauvage à 24 mois (White et al. 2009). Ces mêmes structures autophagiques sont présentes plus généralement de façon accrue dans les modèles d'*OPA1*<sup>+/-</sup> dans d'autres tissus comme le muscle cardiaque (Sarzi et al. 2012). Aucune étude n'avait évalué la mitophagie et l'autophagie, ainsi que le flux autophagique dans les fibroblastes porteurs de mutations *OPA1*.

Nous avons étudié deux groupes liés aux mutations du gène *OPA1* : le syndrome DOA+ et le syndrome de Behr.

Dans le syndrome DOA+, nous avons deux patients portant la même mutation dans le domaine dynamine de la protéine *OPA1* : mutation p\_S545R. Nous avons montré comme dans d'autres DOA+, que la mutation avait un effet dominant-négatif. La mutation induit une hyper-fragmentation du réseau mitochondrial et un défaut énergétique.

Les patients Behr présentaient tous les quatre la mutation faux-sens p\_Ile382Met couplée à une deuxième mutation pathogène dans le gène *OPA1*, sauf pour un patient qui était hétérozygote pour la mutation faux-sens. Toutes les mutations montraient un effet haplo-insuffisant. Les fibroblastes de ces patients ne présentaient pas d'altération majeure du réseau mitochondrial, ni de défaut

énergétique, ce qui est paradoxale compte tenu de la sévérité clinique du syndrome de Behr.

Nous avons étudié les événements de dégradation sélective des mitochondries en quantifiant les colocalisations de ces dernières avec les lysosomes que nous considérons comme la micro-autophagie sélective des mitochondries et pour la macro-autophagie nous avons utilisé des marqueurs communs de la machinerie autophagiques comme le LC3 et P62.

Les fibroblastes des patients Behr ne présentent pas de modification majeure du réseau mitochondrial, les mutations *OPA1* n'empêchant pas la fusion des mitochondries. Une faible conversion du LC3 en sa forme active suggère une faible réponse de l'autophagie dans les fibroblastes des patients Behr. L'évaluation du flux autophagique par inhibition avec la chloroquine montre une conversion plus faible de LC3 chez les cellules des patients Behr, la plupart du LC3 étant sous sa forme non active LC3I. Le faible taux d'autophagie est démontré par l'accumulation de P62 dans les fibroblastes Behr. L'accumulation de la protéine P62 a été corrélée à un déficit de la machinerie autophagique dans différentes pathologies neurodégénératives (Korolchuk, Menzies, and Rubinsztein 2009; Moscat et Diaz-Meco 2009). En effet, la protéine P62 est dégradée par la voie autophagique pour empêcher la formation de corps d'inclusion; ainsi, si la voie fonctionne normalement, aucune accumulation de P62 ne devrait être évidente (Komatsu et al. 2007).

Des études ont montré que la fission favorisait la dégradation mitochondriale (Twig et al. 2008). Nous avons observé que le réseau mitochondrial dans les fibroblastes Behr était normal à intermédiaire. En effet, nous n'avons observé aucune hyperfusion du réseau mitochondrial qui pourrait gêner la dégradation; à la place un peu plus de 20-30% de leur population mitochondriale correspond à des mitochondries de petites longueurs et individualisées faisant donc d'elles des cibles potentielles de la machinerie autophagique. Ces résultats suggèrent qu'un stimulus

autre que la fission seule serait à l'origine de l'initiation de la dégradation des mitochondries.

Chez les patients DOA+, nos données montrent que la micro-autophagie et la macro-autophagie sont largement augmentées. L'analyse en microscopie électronique à transmission montre également une augmentation des structures autophagosomales.

Le taux de dégradation mitochondriale accrue chez les DOA+ pourrait être attribué uniquement à la fragmentation du réseau mitochondrial induit par les mutations *OPA1*. Néanmoins de récentes études suggèrent que la fission seule ne serait pas suffisante pour l'induction de la mitophagie, et qu'il faudrait un ensemble de stimuli, tels une dépolarisation des mitochondries, un métabolisme énergétique élevé, une accumulation de protéines mal repliées (East et al. 2014; Jin et al. 2010; Liesa et Shirihai 2013). Nos résultats sur les cellules de patients Behr confortent ces études.

Des études récentes ont considéré une relation entre la dégradation mitochondriale et l'activité énergétique des mitochondries, montrant ainsi que la stimulation de la phosphorylation oxydative mitochondriale améliore le renouvellement mitochondrial en augmentant leur taux de dégradation (Melser et al. 2013). Ce renouvellement contribue à maintenir l'efficacité de la phosphorylation oxydative par la génération d'une population mitochondriale plus efficace avec des changements ultrastructuraux et une modulation de la dynamique des mitochondries (Cogliati et al. 2013; Melser et al. 2013; MacVicar and Lane 2014). Des études antérieures au laboratoire sur la mutation p\_R445H associée à un phénotype DOA+ (Chevrollier et al. 2008) montraient un découplage partiel de la chaîne respiratoire chez ces patients. Nous avons mesuré les fonctions respiratoires mitochondriales sur les fibroblastes intacts. Nous avons montré que les fibroblastes DOA+ utilisaient une plus grande proportion de leur capacité de réserve respiratoire et présentaient un découplage partiel. Ce serait cette fuite de protons qui stimulerait la dégradation mitochondriale en mimant une activité énergétique importante.

Cette hypothèse est confortée par le traitement des cellules de patients Behr par un protonophore le CCCP, qui stimule la respiration mitochondriale. En effet, une sur-activation de la chaîne respiratoire induit une activation des voies autophagiques dans les cellules de patients Behr, même si cette réponse reste faible.

Nos données suggèrent que l'absence de la dégradation mitochondriale n'est pas en soit liée à la morphologie du réseau mitochondrial mais serait plus due à l'absence de signaux d'activation de la voie mito/autophagique. En effet, contrairement aux patients DOA +, dans laquelle le découplage mimerait une activité accrue de la chaîne l'activité qui stimule la voie autophagique, chez les patients Behr, l'absence de stimulus expliquerait une faible réponse autophagique. Le renouvellement des mitochondries est nécessaire pour un bon fonctionnement cellulaire. L'incapacité mitochondriale à présenter des stimuli pro-mitophagiques conduit à accumuler des mitochondries défectueuses.

En conclusion les phénotypes induits par les mutations d'*OPA1* dans les cas de syndrome de Behr ne résultent pas de dommages mesurables de la phosphorylation oxydative ou d'un défaut mesurable de la fusion mitochondriale; mais impliqueraient néanmoins la voie de dégradation mitochondriale dans la progression de la maladie (voir synopsis). L'incapacité des patients Behr à dégrader leurs mitochondries défectueuses en raison de l'absence de stimuli pro-mitophagiques et un flux autophagique inefficace, traduit par l'accumulation de P62, pourrait être le mécanisme responsable de la neurodégénérescence sévère du syndrome Behr. De la même manière, la régulation différentielle du contrôle-qualité mitochondrial dans les deux syndromes pourrait expliquer les disparités.

# Revue CCCP

## Article 3

# The protonophores, CCCP and FCCP: their relevance to the mitophagic and autophagic pathways

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Aurélien PARIS<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Layal ISHAK<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup>

**Article en préparation**

## Introduction

L'autophagie est un processus fondamental dans l'homéostasie cellulaire. Son inhibition ou des défauts de cette voie sont impliqués dans différentes maladies neurodégénératives (Sanchez-Varo et al. 2012; Karbowski et Neutzner 2012; Hirota et al. 2015; J. G. Lee et al. 2015). La voie autophagique la plus largement décrite et étudiée implique la dégradation des mitochondries par les autophago-lysosomes. Cette voie est essentiellement centrée sur deux facteurs PINK1 et Parkin (Narendra et al. 2010). Les études de la voie PINK1/Parkin ont montré que le recrutement de PINK1 se faisait à l'issue d'une dépolarisation de la mitochondrie (Narendra et Youle 2011). À l'heure actuelle, il n'existe pas d'outils pharmacologiques sélectifs de la mitophagie. L'approche commune pour déclencher l'autophagie est basée sur l'application des inhibiteurs des OXPHOS ou des protonophores: le CCCP et le FCCP. Ces acides faibles perméabilisent la MIM aux protons, détruisant le gradient de H<sup>+</sup>, et ce faisant perturbent le système de phosphorylation oxydative. Du fait de cette propriété à induire une dépolarisation de la mitochondrie, ces protonophores sont largement utilisés pour étudier la mitophagie (Narendra et al. 2010; Matsuda et al. 2010). Bien que le FCCP déclenche la dépolarisation rapide et efficace des mitochondries et l'activation de la voie PINK1/Parkin, les effets en aval diffèrent selon les types cellulaires et le métabolisme énergétique (Melser et al. 2013; Van Laar et al. 2011). Le CCCP et le FCCP sont des protonophores introduits il y a plus de 50 ans par Heytler et Prichard (Heytler et Prichard 1962). Ces agents découplants sont largement utilisés pour l'analyse de la fonction mitochondriale dans les cellules en raison de leur efficacité relativement élevée par rapport à d'autres classes d'agents découplants tels que les phénols substitués (voir Wallace et Starkov, 2000). Le CCCP et le FCCP sont donc utilisés pour étudier le couplage mitochondrial, inhiber l'activité de l'adénylate cyclase (Peterkofsky et Gazdar 1979), pour bloquer le transport du calcium dans des vésicules membranaires (Mohr et Fewtrell 1987) et dernièrement pour activer la dégradation sélective de la mitochondrie par autophagie de par leur capacité à mimer une altération physiologique des mitochondries (Chen et al. 2013).

Nous avons effectué un travail de revue afin de :

- Déterminer la distinction entre le CCCP et le FCCP et leurs mécanismes d'action.
- Identifier les voies impliquées dans l'activation de la mitophagie et l'autophagie par le CCCP et le FCCP.
- Expliquer la latence entre la dépolarisation mitochondriale et l'initiation de la mitophagie.
- Déterminer les cibles autres que mitochondriales et leur importance dans la réponse cellulaire aux protonophores.



## **Abstract**

Mitochondrial uncouplers are currently used as an inducer of the mitophagy pathway after being widely used in bioenergetic studies. We here review CCCP and FCCP properties and their impact on mitochondrial respiratory and dynamic functions. We detail the pro-survival and apoptotic pathways induced by mitochondrial and cellular signaling modifications following CCCP or FCCP treatments. These open new perspectives as to the use of uncouplers in research approaches and neurodegeneration therapies.

## **Introduction**

The most widely used protonophore uncouplers for mitochondrial bioenergetics studies, the ring-substituted carbonyl-cyanide-phenylhydrazone CCCP and FCCP, were introduced more than 50 years ago by Heytler and coworkers (Heytler and Prichard, 1962). These uncoupling agents are used for analysis of mitochondrial function in living cells, tissues, and isolated mitochondrial preparations due to their relatively high potency compared to other classes of uncouplers such as the substituted phenols (For reviews, see Wallace and Starkov, 2000). The first experimental use of carbonyl-cyanide-phenylhydrazone and its derivatives was carried out to uncouple mitochondria and chloroplasts (heytler and Prichard, 1962). CCCP and FCCP strongly inhibited transport processes in plant tissues and microorganisms, depressed growth and stimulated respiration. Carbonyl-cyanide-phenylhydrazone and its ring-substitutes analogs have been used to investigate mitochondrial energy coupling and to inhibit adenylate cyclase activity (Peterkofsky and Gazdar 1979), to block calcium transport in membrane vesicles (Mohr and Fewtrell, 1987), and lately to induce mitochondrial degradation and uncover the autophagy pathway through disruption of the mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$  (Chen *et al*, 2013). This uncoupling of oxidative phosphorylation from ATP production induced by uncoupling agents is a major signal, which triggers mitophagy (Kim *et al*, 2007). We here review the background of these chemicals, their mechanism and elucidate whether their cytotoxicity is the mere result of their impact on mitochondria proton gradient modification, mitochondrial ATP production depletion given the compensatory mechanisms that exist in the cells and knowing that their protonophoric activity is not restricted to mitochondria.

### **1. Mitochondrial function**

Mitochondria are intracellular organelles involved in cellular metabolism, growth, intracellular signaling and cell death. Mitochondria are dynamic organelles, which exhibit

changes in size, morphology, and localization and are constantly renewed. These events are controlled by fusion and fission events, which involve different compartments of the mitochondria. Mitochondria are composed by two lipid-rich-membranes, the outer-membrane (MOM) and the inner-membrane (MIM), each with their specific properties and subsequent functions. The MOM is permeable to ions and solutes of less than 14 kDa, while the cardiolipin-rich-MIM, which delimits the matrix, is not permeable to ions and metabolites, unless transported by transporters embedded within the MIM (Wallace and Starkov, 2000). This MIM with its convolutions forms the cristae and the inter-cristae-space (ICS), which were shown to interfere greatly in energy production, respiratory chain substrates cell-fate (Hackenbrock, 1966; Manella *et al*, 2001; Frezza *et al*, 2006). The integrity of MIM is vital, studies having shown that MIM-permeabilization may lead to mitochondria-dependent apoptosis. The MIM contains proteins involved in ATP-production. The lipid bilayer of the MIM harbors the mitochondrial oxidative phosphorylation system (Oxphos). The coordinated transport of electrons and protons leads to the production of ATP. This passage of electrons releases energy, which is largely stored in the form of a proton gradient in the inter-cristal-space (ICS) and is used by the last OXPHOS complex (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase) to generate ATP from ADP and inorganic phosphate. Some of the ATP is used for the mitochondrion's own needs, but most of it is transported outside the organelle by the adenine nucleotide translocator and used for diverse cell functions (Smeitink 2001).

The initial event of energy conservation is charge separation at the MIM. Electrons deriving from oxidation of substrates are funneled to oxygen through the redox carriers of the respiratory chain, and this process is coupled to H<sup>+</sup> ejection on the redox pumps at complexes I, III and IV. As the passive permeability to H<sup>+</sup> and to cations and anions is a generally low, H<sup>+</sup> ejection results in the establishment of an H<sup>+</sup> electrochemical gradient,  $\Delta p$ . According to Mitchell's chemiosmotic theory, the  $\Delta p$  consists of two components, the electrical membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and the pH gradient ( $\Delta pH$ ) across the MIM. Mitochondrial respiratory chain builds a proton gradient, concentrating H<sup>+</sup> in the ICS. In turn, this  $\Delta p$  drives mitochondrial physiology including ATP synthesis, transfer of calcium and other ion exchangers and the import of proteins (Osellame *et al*, 2012). Under physiological conditions most of the gradient is in the form of  $\Delta\Psi_m$ . Nonetheless, the two components are inter-dependent to a certain degree, the decrease of mitochondrial membrane potential results in an increase in the pH gradient ( $\Delta pH$ ) with no subsequent alteration of the electrochemical proton gradient ( $\Delta p$ ) (Wallace and Starkov, 2000). The amplitude of the  $\Delta p$  regulates the overall rate of electron transport in the mitochondrial respiratory chain and is converted by enzymes embedded in the MIM into ATP for example. The coupling state of mitochondria regulates many metabolic

pathways, including mitochondrial degradation, mitochondrial import, mitochondrial biogenesis and cell-apoptosis.

## 2. Uncoupling and uncouplers

Uncouplers comprise different classes that decrease the efficiency of ATP production; however, the majority used with protonophoric activity remains the lipophilic weak acids. These lipophilic weak acids count the 2,4-Dinitrophenol (DNP), which belongs to the substituted phenols class, and the most used carbonyl-cyanide-phenylhydrazone class. There are several other types of uncoupling agents among which, ionophores, cationic uncouplers, and long-chain free fatty acids; this latter mediating uncoupling through the adenine nucleotide translocase or the uncoupling proteins (Wojtczak and Schonfeld, 1993; Pressman and Fahim, 1982). Dissipation of the transmembrane electrochemical potential produced by respiratory generators leads to respiration uncoupling. It is a result of an increase in the  $H^+$  permeability of the coupling membranes (Skulachev, 1997). Mitochondrial bioenergetics can be hampered by chemicals, which either interfere with the generation of  $\Delta p$  or cause its dissipation. Both cause ATP deficits, but while the first induces cytotoxic hypoxia due to the inability to use oxygen, uncouplers induce excessive oxygen consumption. In this review we will focus mainly on the latter group, with a specific interest on uncouplers of the oxidative phosphorylation such as CCCP and FCCP, mostly due to their extensive use in experimental biology.

### 2.1 The carbonyl-cyanide-phenylhydrazone class, CCCP/FCCP dissipates $\Delta\Psi_m$

CCCP and FCCP are **weak acids**. Lipophilic weak acids are known as proton shuttling compounds because they can selectively increase the permeability of lipid membranes to protons. FCCP shows greater efficiency than CCCP due to its ability to bind eight protons while CCCP binds only four protons (Table 1). Mitochondria-wise, the molecule dissolves in the MIM lipid, allowing it to cross the membrane and release a proton in the mitochondrial matrix, which is slightly alkaline. In this process, the  $\Delta pH$  is disrupted. The ionized negatively charged molecule diffuses across the membrane, down the electric field gradient, dissipating the  $\Delta\Psi_m$  (McLaughlin and Benz, 1983; LeBlanc, 1970). Three factors may affect the ability of weak acids such as CCCP and FCCP to act as uncouplers: the surface area, the dielectric constant and the surface charge of the membrane (Kasianowicz *et al*, 1984). Indeed, CCCP adsorbs to membranes mainly through hydrophobic interactions, thus if the total surface of the biological membrane is large, the aqueous concentration of the uncoupler will be depleted. The protonophoric activity of CCCP was tested on several artificial lipid bilayer membranes and was shown to possess high uncoupling activity, yet, when artificial membranes contained 20%

cardiolipins, the protonophoric activity of CCCP decreased. This decreased activity is due to the electrostatic potential created by the negative lipids, which decreases the surface concentration of the anionic form of the uncoupler (McLaughin *et al*, 1983).

Other requirements to act as an uncoupler reside in the structure of the molecule. Indeed, in order to display uncoupling activity, the molecule should possess an acid-dissociable group, bulky lipophilic groups and a strong electron-withdrawing moiety (Terada, 1981; McLaughin and Dilger, 1980). The efficiency of each uncoupler therefore resides in their solubility in lipid membranes, the stability in their ionized form in the membrane and most important their ability to bind and release protons. The theoretical model explains uncoupling by the circulation of both neutral and anionic uncoupler species via the phospholipidic regions of biological membranes. However, several studies question this dogma, putting forth a probable assistance of circulations in some way by membrane proteins, which facilitate transmembrane diffusion of anionic form of uncoupling agents (Van Dam and Slater 1967; Skulachev, 1997). While almost all mitochondria-related literature agree to Mitchell's mechanism, in which the primary act of energy conservation is the setting up of pH differential, for others, the energy is primarily conserved by chemical mechanisms and this energy is needed to drive anion uptake. In this case then, uncoupling would have to result from an interaction between uncouplers and specific protein sites in the mitochondrial membrane. This view is supported by several studies, which involve proteo-lipid binding sites within the mitochondrial membrane or again mitochondrial proteins with thiol groups (Katre and Wilson, 1978; Mlejnek and Dolezel, 2015).

The study of the effect of different thiol-combining agents on oxidative phosphorylation of mitochondria showed that these compounds uncouple mitochondria at low concentrations and inhibit respiration at high concentrations by chemical modification of a small but significant portion of mitochondrial thiol groups. Carbonyl-cyanide-phenylhydrazone and derivatives would cause maximal stimulation of respiration, not only by chemical modifications of thiol-groups, but by suppression of the dissociation of the functional thiol-groups given their proton carrier properties. The protonized form of the uncoupler is suggested to react with thiol-groups. The high reactivity of CCCP and FCCP with thiol-groups is due to their electron-withdrawing substituents on the aromatic group (Drobnica and Sturdik, 1979). This thiol-depletion is relevant to the downstream effects of CCCP, which we will further discuss along the review.

## 2.2 Cellular effects of carbonyl-cyanide-phenylhydrazones

Sequential observations show that  $\Delta\Psi_m$  is an early event occurring within seconds of treatment, followed by a drop in ATP as early as 15 min and down-regulation of protein-synthesis. 2-hour-treatment induced upregulation of genes involved in DNA-damage and cell cycle arrest, whether this last is a direct consequence of ATP depletion or DNA-damage is not known. Later responses included an upregulation of the Fas-mediated apoptosis pathway and Caspase 3, thereby supporting previous findings, which involved Fas in FCCP-induced apoptosis (Linsinger *et al*, 1999; Kuruvilla *et al*, 2003). Studies have however shown distinctions in the way different cell-lines react to Fas signal, in some cases Fas-signaling leads to rapid caspase activation and cell death, while in others, this effect is not seen (see apoptosis section of this review) (Scaffidi *et al*, 1998; Linsinger *et al*, 1999). In any case, these studies only press the point that apoptosis induced by protonophores is a late-stage response, and that prior to apoptosis many mechanisms have taken place, including pro-survival pathways. FCCP-treatment led to a progressive loss of oxidative phosphorylation resulting in widespread effects including decreased activity of plasma membrane sodium pumps, switch to glycolysis with increased lactic acid production, dissociation of ribosomes from the rough endoplasmic reticulum leading to protein synthesis reduction and subsequent alteration of the cytoskeleton (Figure 1).

### 2.2.1 CCCP alters mitochondrial network dynamics and ultrastructure

Carbonyl-cyanide-hydrazone-treatment collapses the  $\Delta\Psi_m$  with subsequent impacts on mitochondrial function and morphology. These impacts on mitochondrial structure were highlighted in the mid-sixties both in *in vitro* preparations and whole cells (Weinbach and Garbus; Morisset 1974).

Live-cell imaging and imaging analysis showed that CCCP induces  $\Delta\Psi_m$  loss followed by mitochondrial fission (Legros *et al*, 2002; Ishihara *et al*, 2003). Our experiments carried out on human fibroblasts showed a fragmentation of mitochondrial network within 4h-treatment, and following 48h-exposure with high concentrations of CCCP (10  $\mu\text{M}$ ) mitochondria were mostly round and isolated (Figure 2), implying activated fission. Higher concentration-use (100  $\mu\text{M}$ ) leads to perinuclear mitochondria-clustering. This clustering is attributed to CCCP-impact on the microtubules (Maro and Bornens, 1982).

Timelapse analysis of mitochondrial morphology transition upon CCCP-treatment showed that an initial swelling of mitochondria precedes mitochondrial fission depending on cell-type (De Vos *et al*, 2005). Mitochondrial dynamics are marked by opposing but coordinate fusion and fission, with functional redundancy of its machinery components. Mitochondrial fusion involves Mitofusins 1 and 2 and OPA1. Fission events were shown to involve many recognized factors such as DRP1, a GTPase (Smirnova *et al*, 2001). Mutations on *DRP1* impede fission, leading to hyper-tubular mitochondrial networks,

thus making DRP1, one of the main actors of fission. Consequently, mitochondrial network fragmentation can occur only with unopposed fission (Wai and Langer, 2016). Under conditions of mitochondrial alterations, negative regulation of fusion proteins is necessary to induce fragmentation for subsequent degradation or apoptosis. The regulation of fusion proteins relies on proteolysis of the dynamin-related GTPase protein OPA1. Studies have shown that MOM-fusion by mitofusins is a potential-independent mechanism; however, MIM-fusion is hampered by loss of  $\Delta\Psi_m$  (Iegros *et al*, 2002; Ishihara *et al*, 2003). CCCP and FCCP promote stress-induced fission in part through the regulation of OPA1 processing by OMA1 (Wai *et al*, 2015). Dissipation of  $\Delta\Psi_m$  inhibits fusion through alterations of the homeostasis of both long and short OPA1 isoforms (Duvezin-Caubet *et al*, 2006; Song *et al*, 2007). CCCP promotes the activation of proteases such as OMA1, resulting in the protein cleavage of L-OPA1 and accumulation of S-OPA1, whilst both isoforms are essential to proper mitochondrial fusion (Ishihara *et al*, 2006; Anand *et al*, 2014). Moreover, OPA1 not only plays a crucial role in MIM-fusion, but is also involved in mitochondrial cristae integrity, thereby regulating cell metabolism and apoptosis through the release of cytochrome *c*. Indeed, OPA1-dependent mitochondrial cristae stabilization increases mitochondrial respiratory efficiency and hampers cytochrome *c* release and ROS production (Varnita *et al*, 2015). Recent studies are therefore tying processing of OPA1 to mitochondrial morphology. Given that S-OPA1 accumulation accelerates fission, there's an emerging role of this one in the fission machinery.

Studies have shown that DRP1 only is insufficient to mediate mitochondrial fission. The cytoskeleton also plays a major role in the fission process. F-actin-inhibition was shown to lead to elongation of mitochondrial network in osteosarcoma cells (Korobova *et al*, 2013). Recent findings indicate that F-actin along with Drp1 participate in both stress-induced and physiological mitochondrial fission. FCCP-treatment resulted in accumulation of F-actin and its regulator proteins cortactin, cofilin and Arp3 on MOM, prior to DRP1-recruitment (Li *et al*, 2015). DRP1 involvement in stress-induced fission is however a matter of debate, DRP1 knockout models expressing OPA1 proteins still possess the ability to fragment upon stress stimuli.

Upon CCCP-treatment, several studies have described new mitochondrial processing, which is different from the common dynamic pathways, resulting in new mitochondrial structures.

CCCP-treatment led to formation of disk-shaped-mitochondria, which appeared swollen, lacking internal structures and contained vacuole-like structures (De Vos *et al*, 2005). Conventional transmission electron microscopic examination of murine embryonic fibroblasts treated with CCCP detected these ring-shaped structures with typical features including double membranes and cristae within 1h-exposure (Ding *et al*, 2012). Both studies exclude a simple fusion between two parts of a mitochondrion resulting in a donut, but rather involved a three-dimensional transformation of the entire mitochondria,



forming a clearly defined internal space surrounded by mitochondrial membranes. Studies were undertaken to seize the role of DRP1 in this new dynamic induced by uncoupling-treatment. Experiments on dominant-negative mutant DRP1/K38A showed that these CCCP-induced disk-shaped mitochondria formation was not impeded upon treatment, thus indicating that the mitochondrial fission machinery is not involved in mitochondrial remodeling (De Vos *et al*, 2005). The formation of spherical mitochondria following CCCP-treatment requires both mitofusins and ROS, knockout of *MFN1/2* and treatment with antioxidants preventing their formation (Yin and Ding, 2013). These mitochondrial spheroids are hypothesized to protect mitochondria from selective degradation by the autophagy machinery. Authors rule out the involvement of OPA1 due to its proteolytic cleavage by proteases, nonetheless, one cannot ignore the ultra-structural mitochondrial changes following longer uncoupling treatment, implying that OPA1 play a bigger role in stress-induced mechanism than it is credited. CCCP induces ultra-structural changes in mitochondria, with total loss of cristae. The first observations of these ultra-structural alterations in mitochondrial morphology were observed by electron microscopy on *Amoeba proteus* mitochondria (Smith and Ord, 1979). Studies carried out by our team showed that CCCP-treatment led to altered mitochondrial ultrastructure with complete loss of cristae structures and subsequent oxphos subunits depletion. These alterations are later responses following CCCP-treatment, taking place 8 to 12h after exposition depending on cell-type (De Graaf *et al*, 2004).

### **2.2.2 CCCP activates pro-survival pathways**

Studies carried out on CCCP, show that cultured cells are able to resist CCCP-treatment and survive, even after loss of  $\Delta\Psi_m$  and mitochondrial-ATP production. These observations suggest that depending on the time and concentration, cells are able to adapt and put forth mechanisms that protect them from CCCP-induced apoptosis. Relative to this adaptative response, one main pathway following CCCP-treatment is an activation of mitochondrial degradation through the autophagic pathway. In this regard, several studies have tied mitochondrial health to an efficient PINK1/PARKIN pathway. CCCP-treatment has been implicated in mitophagy-activation through PINK1 stabilization on the MOM, overlooking the various roles of PINK1 in cell-survival through its capacity to act as an intrinsic signal in response to mitochondrial status. PINK1 has been qualified as the key-player in the stress-response induced by CCCP-treatment through PARKIN recruitment; however it cannot be excluded that autophagy may be activated through other actors and pathways besides PINK and PARKIN (OMIM \*602544).

PINK1 (PTEN-induced putative kinase1; OMIM \*608309) is primarily localized in mitochondria, but a few reports have shown that it can also be found in the cytoplasm (Beilina *et al*, 2005; Haque *et al*, 2008; Meissner *et al*, 2011). Besides its role in

mitochondrial turnover, the MOM-kinase PINK1 was also shown to phosphorylate Akt (also known as PKB) at Ser-473 through mTORC2 activation (Murata *et al*, 2010; Kwon *et al*, 2011). mTORC2 (Mechanistic target of rapamycin, OMIM \*601231) is a protein kinase involved in cell-survival responses. mTORC2 inhibits apoptosis and regulates cellular metabolism switch to glycolysis in the CCCP-stress response (Masui *et al*, 2014). Recent findings involve mTORC2 in PINK1/Parkin mediated mitochondrial quality control (MQC) (Wu *et al*, 2013). Consistent with previous findings, the study shows that PINK1 is required for mTORC2 kinase activity; however Akt seems unlikely to mediate mTORC2-dependent MQC. Instead, they identified a serine/threonine kinase, NDR1 (Nuclear DBF-2 related protein, OMIM \*606964) also known as STK38 (serine/threonine protein kinase 38) as the downstream effector of mTORC2. CCCP-treatment resulted in NDR1-Parkin-colocalization at the MOM, thus confirming the implication of this kinase in PINK-mediated-MQC. Knockdown of NDR1, led to decreased Parkin phosphorylation upon CCCP-treatment, implying that Ndr1 is upstream of Parkin in PINK1-dependent mitophagy (Wu *et al*, 2013).

The mTOR-signaling network counts not only mTORC2, but also mTORC1 (OMIM \*601231), whose implication in autophagy pathway is recognized (Takei and Nawa, 2014). mTORC1 was shown to respond to various insults including energy status and stress (Laplante and Sabatini, 2012). CCCP induces mitophagy through ULK1 activation, which is inhibited by mTORC1, suggesting that CCCP alleviates this inhibition (Joo *et al*, 2011). Studies have shown that mTORC1 is regulated by several factors including TSC1/2 (tuberous sclerocis complex, OMIM #191100 and OMIM #613254) and AMPK (AMP-activated protein kinase, OMIM \*602739) (Laplante and Sabatini, 2012; Inoki *et al*, 2003).

PINK1 thus participates in cell-protection by activating catabolic pathways including mito/autophagy and metabolic switch to glycolysis, following CCCP-treatment. Nonetheless, how does CCCP mediate these responses remains elusive?

### **2.2.2.1 Autophagy induction through $\Delta\Psi_m$ dissipation**

$\Delta\Psi_m$  dissipation is a signal for mitochondrial degradation and apoptosis induction. In order to study the mitophagic pathway, researchers reverted to protonophores to induce  $\Delta\Psi_m$  depletion and thus mimic mitochondria damage. The lipophilic weak acids, CCCP and FCCP are therefore widely used to trigger mitophagy and bulk autophagy due to their permeabilization effect on MIM to  $H^+$ , dissipating the  $\Delta p$ .

PINK1 and Parkin have been found to work in sequestering and eliminating defective mitochondria through a process known as mitophagy.  $\Delta\Psi_m$  dissipation was shown to inhibit the processing of FL-PINK1, leading to its accumulation on the MOM (Matsuda *et al*, 2010, Narendra *et al*, 2010; Twig *et al*, 2010). PINK1 accumulates on the outer membrane as its 63KDa full-length isoform to recruit PARKIN, which in turn



ubiquitylates MOM proteins such as VDAC and mitofusins leading to autophagosome engulfment of depolarized mitochondria and subsequent lysosomal degradation. Activation of the PINK1/Parkin pathway is tied to cell survival and overexpression of PINK1 rescues neuron-loss induced by various stresses (Valente *et al*, 2004; Gautier *et al*, 2008).

CCCP induces cell death in only a minor population of cell lines, apoptosis occurring with overexposure. This is explained by the fact that despite a collapsed  $\Delta\Psi_m$  and lower ATP production, CCCP and its analogs will initially activate anti-apoptotic pathways among which the autophagic pathway, as part of a cellular stress-response (Jendrach *et al*, 2009). Studies have shown that protonophores induce rapid loss of mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  with subsequent increase of autophagosomes' number reflecting increased degradation rate in a time and concentration-dependent manner (Gomez-Sanchez *et al*, 2013).

$\Delta\Psi_m$  loss induced by CCCP activates the PINK1/Parkin pathway involved in the removal of damaged mitochondria. Moreover, CCCP induces fission of the reticular mitochondrial network, thus facilitating mitochondria degradation.

Our studies combined with previous studies showed that mitochondrial uncoupling led to loss of mitochondria mass, which would return to normal once CCCP was removed from the media. Studies have shown a decrease of about 20-40% of mitochondrial population following CCCP-treatment, implying an upregulation of the mitophagy pathway (Leonard *et al*, 2015; Berezhnov *et al*, 2016).

Under basal conditions, PINK1 is rapidly degraded in a process involving a  $\Delta\Psi_m$ -driven mitochondrial import through the TOM complex (outer-membrane translocase). PINK1 cleavage by several proteases among which MPP (mitochondrial processing peptidase, OMIM \*603131) is crucial not only for processing, but also for its mitochondrial import. Knockdown of this protease activates mitophagy through abrogation of both mechanisms (Greene *et al*, 2012). CCCP through  $\Delta\Psi_m$  dissipation inhibits PINK1 import and degradation thus facilitating PARKIN recruitment on the MOM (Jin *et al*, 2010). The increase of full-length PINK1 following CCCP-treatment occurs as early as 2-3hour treatment. Once recruited PARKIN ubiquitylates MOM proteins and involves P62 (Sequestosome 1, OMIM \*601530) in mitochondrial sequestration and degradation. Ubiquination of MOM-proteins such as MFN2 inhibits mitochondrial fusion, thereby facilitating its elimination by mitophagy (Poole *et al*, 2010).

Increased levels of PINK1 following uncoupling were not only due its stabilization on the MOM, but certainly to *de novo* synthesis of this stress-sensor protein (Ruber-Sanchez *et al*, 2013). Indeed, transcriptional level of PINK1 is increased during CCCP-induced-stress. This stress-related-transcriptional regulation is under the control of NRF2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like2, OMIM \*600492), an antioxidant transcription factor

(Murata *et al*, 2015). Translocation of NRF2 from the cytoplasm to the nucleus is ROS-mediated.

#### **2.2.2.2 Autophagy induction through ROS**

Several studies have shown that CCCP induces ROS production (Lyamzaev *et al*, 2004; Kensler *et al*, 2007; Han *et al*, 2009). FCCP treatment induces the depletion of the antioxidant glutathione in mitochondria with subsequent cell-death (Han *et al*, 2009-2011). The glutathione depletion was suggested to occur due to its excessive oxidation or because of a possible conjugation with FCCP. Recent studies showed that glutathione-depletion was rather due to its complexation with the uncoupling agent, and that this reaction was time and concentration dependent, consistent with earlier findings of Drobnica and Sturdik (Mlejnek and Dolezel, 2015). Depletion of glutathione leads to an increase in ROS production. This ROS production is however transient, certainly due to activation of antioxidant pathways through activation of NRF2.

Transient ROS production activates stress-induced pathways to protect cells from apoptosis. Indeed, CCCP-treatment resulted in a substantial induction of PRC (PGC1-related coactivator) through ROS production, concomitant anti-oxidant treatment abolishing PRC-activation. Instead of enhancing expression and function of the mitochondrial respiratory chain, PRC under CCCP, seems to serve as a metabolic sensor, which orchestrates expression of genes involved in stress-response. The identified PRC-dependent genes were either genes involved in the resistance to apoptosis such as *NAMPT* encoding the rate-limiting enzyme in NAD biosynthesis, or genes implicated in glucose homeostasis, *HK2*. This glucose-modulator gene encodes the Hexokinase-2, which is localized on the MOM and promotes glycolysis (Gleyzer and Scarpulla, 2011).

Moreover, even if transient, the initial ROS production is crucial to mitochondrial and downstream signaling events including activation of NRF2-dependent-pro-survival pathways (Finkel *et al*, 2008; Mitsuishi *et al*, 2012). NRF2 favors survival pathways by enhancing mitochondrial degradation through the PINK/Parkin pathway. NRF2 also activates the anti-oxidant response element (ARE) pathway, including antioxidant and anti-inflammatory genes, as well as transcription factors involved in mitochondrial biogenesis (Tufekci *et al*, 2011). NRF2 activation can be mediated by changes in intracellular levels of ROS. Indeed, ROS have been known to activate PKC (protein kinase C), which in turn was involved in NRF2 translocation. *In vitro* and *in vivo* studies showed that NRF2 was phosphorylated by the catalytic subunit of PKC, abrogating its associating with KEAP1 (Kelch-like ECH associated protein 1, OMIM \*606016) in the cytosol leading to its activation (Huang *et al*, 2000). Under stress conditions, oxidants and electrophiles were shown to oxidize critical residues of KEAP1 (Kelch-like ECH-associated proteins), which normally would have degraded NRF2 through ubiquitin-

pathway (Itoh *et al*, 1999). Studies have however emitted different regulatory mechanism in which P62, a stress-inducible scaffold protein, binds competitively to NRF2-binding sites of KEAP1, resulting in stabilization and translocation of NRF2 (Komatsu *et al*, 2010). Recent studies have shown that NRF2-ROS-mediated activation results from degradation of KEAP1 through the autophagic pathway. CCCP and FCCP were shown to increase P62-KEAP1 complexes. Formation of these complexes facilitates degradation through p62-dependent recruitment of autophagosomes, thereby enhancing KEAP1 degradation and NRF2 activation (Park *et al*, 2015). Besides activating NRF2, P62 contains anti-oxidant responsive elements (ARE) in its promoter region, thus creating a positive feedback between NRF2 and P62 itself.

These different hypotheses are not conflicting. Indeed, prior studies had shown that CCCP and its derivatives play the role of electrophilic components and thiols endorsing the nucleophilic role (Drobnica and Sturdik 1979). One way to abrogate KEAP1 inhibition of NRF2 is through direct inactivation of KEAP1. CCCP, through its electrophilic properties can therefore directly modify the multiple cysteine residues on KEAP1 protein leading to its inactivation (Levonen *et al*, 2004).

NRF2 favors survival pathways by enhancing mitochondrial degradation through the PINK/PARKIN pathway. Consistent with prior studies that showed CCCP upregulated PINK1 transcription and translation, Murata and colleagues showed that CCCP activates PINK1 mRNA transcription through NRF2 upregulation (Murata *et al*, 2015).

### **2.2.2.3 CCCP mitochondrial-ATP-synthesis inhibition: relevance to autophagy**

CCCP induces metabolic stresses by inhibiting mitochondrial-ATP production, consequently triggering catabolic pathways to generate ATP and restore its levels (Gowans *et al*, 2013). CCCP induces a drop in mitochondrial ATP-level in neurons, immediately followed by ATP-level increase, suggesting activation of pathways that compensate the mitochondrial-ATP-production loss. CCCP initiates several pathways all involved in the catabolic metabolism to maintain cell viability. All pathways have one resultant, favor glycolysis regardless of the signal. Following CCCP treatment, as oxidative phosphorylation becomes less efficient, cells divert to glycolytic metabolism to sustain ATP levels, reflected by upregulation of glycolysis-genes such as *HK2* (hexokinase 2 OMIM \*601125).

Several lines of evidence tend to point the ATP-reliance of the PINK1/PARKIN pathway. The compensatory mechanisms make it difficult to truly size the importance of mitochondrial-contribution to the PINK1/PARKIN pathway; nonetheless glycolysis switch seems to be essential to the ongoing of autophagy processes. Inhibition of the glucose-metabolism validated that active glycolytic pathway is necessary to trigger PARKIN translocation to the mitochondria. Glucose-starvation combined with longer

exposures led to decreased translation of PINK1, suggesting that PINK1 or other actors are able to sense glucose and therefore ATP level (Lee *et al*, 2015). Authors suggest the hypothetical role of AKT/PKB a serine threonine kinase (protein kinase B, OMIM \*164730) in PINK1 translation, which is directly activated by FCCP. Nonetheless, while PINK1 was shown to activate AKT/pathway, no studies have shown a feedback loop between these two.

Recent studies implicating a new regulator HK2 in the PINK1/PARKIN pathway may shed light in the mechanism of CCCP-induced mitochondrial degradation. HK2 is part of the anti-oxidant pathway mediated by PRC. Is it possible that HK2 regulates PINK1? Studies show that HK2 activity is critical for PARKIN recruitment and acts downstream of AKT/PKB but upstream of PINK1, suggesting that cellular signaling plays an important role in the activity of PINK1/PARKIN (McCoy *et al*, 2014).

CCCP is implicated in activation of AMPK (AMP-activated protein kinase) an energy sensor, which monitors the cellular ratios of AMP/ADP to ATP. AMPK promotes mitophagy and autophagy through phosphorylation of ULK1, which in turn activates Beclin1 for mitochondrial engulfment (Egan *et al*, 2011). Moreover, it is suggested that AMPK promotes autophagy by diverting membrane trafficking toward the autophagy pathway and away from any mechanism not involved in the stress-response (Hardie and Ashford 2014). It is tempting to think that AMPK activates ULK1 through direct inhibition of mTORC1 activity, this latter being one of its main targets (Gwinn *et al*, 2008). However, several lines of evidence argue against this mechanism in CCCP-induced autophagy. Indeed, Kwon and colleagues showed using double Knockout MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) for AMPK1/2, that CCCP induces inhibition of mTORC1 independently of AMPK (Kwon *et al*, 2011). Nonetheless, activation of AMPK in CCCP-treatment and its downstream effects cannot be overlooked (Figure 3).

#### **2.2.2.4 CCCP induces DNA-damage and activates pro-survival pathways**

AMPK activation can be induced by several stresses including ATP depletion, increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> and DNA damage, all features found following CCCP treatment (Howley *et al*, 1995; Gowans *et al*, 2013; Laplante and Sabatini, 2012; Kuruvilla *et al*, 2003). Indeed, relative to gene expression studies following CCCP-treatment, DNA damage is one of the earliest responses, occurring within a couple of hours of exposure. This DNA damage leads to activation of pathways associated with cell-cycle regulation, DNA repair and energy balance. DNA damage induces p53 (tumor protein 53, OMIM \*191170), which besides promoting apoptosis through activation of Fas/ TNFRSF6 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6, OMIM \*134637), is linked to AMPK activation (Agarwal *et al*, 2015; Gu *et al*, 2016; Kuruvilla *et al*, 2013).

p53 induction is interesting in two ways relative to mTORC1 inhibition and activation of autophagy. As pointed out previously, p53 activates AMPK thus abolishing mTORC1 inhibition of the autophagy pathway. Yet through a second pathway involving TSC1-TSC2, it also leads to mTORC1 inhibition independently of AMPK. p53 activates TSC1-TSC2, through REDD1/DDIT4 (DNA damage inducible transcript 4, OMIM \*607729), a factor involved in the hypoxia response and ER-stress response. Activation of this pathway results in inhibition of mTORC1 through negative regulation of its activator a GTPase protein Rheb (RAS homolog enriched in brain, OMIM \*601293) (see review Hardie and Ashford 2014).

Moreover, DNA-damage may also play a part in the recruitment and activation of NRF2. Indeed, DNA-damage activates P53, which in turn activates NRF2 through p21 expression. p21 (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, OMIM \*166899) directly interacts with NRF2 and thus competes with KEAP1 for NRF2-binding, compromising ubiquitination of NRF2. Inhibition of ubiquitination of NRF2, results in its stabilization and translocation to the nucleus, where it activates genes involved in the pro-survival response (Chen *et al*, 2009).

#### **2.2.2.5 CCCP mediates the pro-survival-response through cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation**

CCCP orchestrates mitochondrial degradation and promotes cell-survival through different stimuli besides ROS production and ATP depletion. Indeed, CCCP disturbs Ca<sup>2+</sup> homeostasis, releasing calcium stores and inhibiting its uptake, by mitochondria, the endoplasmic reticulum and even the Golgi apparatus.

Intracellular calcium concentration is a key regulator of a number of cell functions, its homeostasis achieved through a number of overlapping mechanisms. Ca<sup>2+</sup> is a signaling molecule, which leads to either cell proliferation or cell death depending on the input it generates. Studies have shown that mitochondria are one of the major actors of this homeostasis through an elaborate calcium transport system across the MIM (Gunter and Pfeiffer 1990). CCCP induces the release of calcium consecutive to dissipation of  $\Delta\Psi_m$ . The  $\Delta\Psi_m$  dissipation across the MIM inhibits calcium uptake through the mitochondrial uniporter (Vauer *et al*, 2000). Short exposures of CCCP are enough to produce cytosolic calcium elevations in different cell models (Bountra *et al*, 1988, Vaughan Jones *et al*, 1998). In addition, CCCP releases calcium from non-mitochondrial stores. Other studies showed that CCCP treatment did not modify the release of calcium from an intracellular store but produced the entry of extracellular calcium and consequently an elevation in cytosolic calcium levels. Blockade of intracellular calcium release from stores such as ER, mitochondria and lysosomes using thapsigargin, rotenone and bafilomycin A1 respectively, still led to an increase in intracellular calcium observed after treatment with CCCP, suggesting the presence of a different source of intracellular calcium increase. A

beginning of response may be found through the studies carried out on non-excitable cells, where the authors involve a possible activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the plasma membrane following depletion of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ .

Calcium is known to serve various cellular processes and in this manner, increased cytosolic calcium level has numerous repercussions, including selective autophagy. Recent findings showed that PINK1 mRNA levels were significantly increased by 4-fold after 24h-treatment with CCCP. Concomitant treatment with calcium-chelating agent BAPTA-AM impaired the CCCP-induced PINK1 mRNA and protein expression, thus CCCP-induces mitophagy in a calcium-dependent manner (Gomez-Sanchez *et al*, 2014). The detailed molecular mechanism on CCCP-induced-calcium-dependent-mitophagy remains unclear. Indeed, there was no evidence of FOXO3 increasing PINK1 transcription, despite its described implication in PINK1 regulation in nutrient privation (Mei *et al*, 2009).

In the case of CCCP-treatment, one link may be TG2/TGM2 (type 2 transglutaminase, OMIM \*190196). As a matter of fact, several studies have tied TG2 in the autophagy-dependent clearance of ubiquitinated proteins and mitophagy (Rossin *et al*, 2012 and 2015). TG2 is a multifunctional protein involved in a large number of biochemical functions including autophagy and apoptosis.  $\text{Ca}^{2+}$  finely tunes TG2-activity. Under physiological conditions, ATP and GTP inhibit the transamidating activity of TG2, while CCCP treatment increases drastically the enzyme's transamidating activity. This reaction coincided with cytosolic elevation of  $\text{Ca}^{2+}$ , which is essential to the enzyme activation (Rossin *et al*, 2015). Intracellular calcium elevation is essentially due to the release from the endoplasmic reticulum (Rimessi *et al*, 2013). In basal conditions, cytosolic calcium is buffered by  $\Delta\Psi_m$ -driven uptake via the mitochondrial uniporter (mCU).  $\Delta\Psi_m$ -dissipation thereby blocks calcium regulation in CCCP-treatments (Biswas *et al*, 1999).

TG2 regulates mitochondrial clearance at several stages and is therefore involved in the stress-response induced by CCCP. Under stress conditions, TG2 catalyzes posttranslational modifications of proteins, thereby facilitating their degradation through autophagolysosomes in collaboration with p62 (D'Eletto *et al*, 2012). In addition, TG2 facilitates mitophagy regulation, by its direct interaction with key actors of mitochondrial dynamics. Under CCCP treatment, TG2 level on MOM was significantly reduced. This reduction is followed by concomitant reduction of TG2-DRP1 and TG2-Fis1 interaction, suggesting that TG2-activation by calcium favors mitochondrial fission via recruitment of DRP1 by Fis1 (Rossin *et al*, 2015).

Moreover, TG2 protects cells from apoptosis through two mechanisms: by crosslinking with caspase 3 with consequent inhibition of its pro-apoptotic activity on one hand and on the other hand by limiting the reversion of the F1-Fo-ATP synthase through maintenance of IF1 (ATPase inhibitory factor 1 OMIM \*614981) (Faccenda *et al*, 2013). Cells lacking

TG2 showed drastic reduction of IF1 expression resulting in mitochondrial ultrastructural alterations and ATP-breakdown by ATP-synthase. Given all these functions, TG2 may be implicated in the regulation of the CCCP-induced-switch of cellular metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis.

#### **2.2.2.6 CCCP induces autophagy through $\Delta$ pH disruption**

Another component of the  $\Delta$ p is the  $\Delta$ pH, which is also altered by CCCP-treatment and implicated in mitochondrial turnover. New studies tie mitophagy initiation with changes in cytosolic pH (Berezhnov *et al*, 2016). During starvation and hypoxia conditions, changes in intracellular pH initiate the autophagy pathway (Marino *et al*, 2012; Dechant *et al*, 2010). It is tempting to suggest that mitochondria had a major role in changes of intracellular pH, due the upregulation of glycolysis, but studies showed that mitochondrial impact is negligible (Berezhnov *et al*, 2016). Treatment with Nigericin, an ionophore with impact on pH also induced mitophagy. Nigericin acts as a potassium ionophore promoting  $K^+/H^+$  exchange across membranes and stimulates ATPase activity in mitochondria but also lysosomes. In the study short FCCP-exposure led to PINK1/PARKIN dependent mitophagy, while nigericin induced translocation of mitochondria to lysosomes in both a PINK1/PARKIN dependent and independent manner. Authors explain discrepancies in the initiation and mechanism of mitophagy from the differing sources of cytosolic acidification. Indeed, FCCP induces acidification via the redistribution of  $H^+$  from mitochondria and lysosomes while in the case of nigericin treatment lysosomes contribution is minor.

It appears, that it is mostly the effect of the uncoupler on lysosomes that initiates this autophagic-pathway, joining new hypothesis, which suggest that it is mostly organelles-stress such as lysosomes that initiate autophagy. Indeed, in response to lysosome-stress, mTORC1 is released from the lysosomes and becomes inactive, leading to activation of autophagy and higher transcription of lysosome-related genes (Pena Llopis *et al*, 2011; Rocznik-Ferguson *et al*, 2012).

#### **2.2.2.7 CCCP initiates the mito/autophagy pathway through the unfolded-protein response**

Besides mitochondria and lysosomes, CCCP was shown to impact various organelles including the golgi apparatus and the endoplasmic reticulum, both involved in the synthesis, the folding and the transport of secretory proteins. CCCP-treatment is associated with alteration of protein synthesis. This effect of uncouplers was described in the early 70s, where subsequent inhibition of protein secretion by CCCP was attributed to downregulation of intracellular transport between the ER and the Golgi. Indeed, CCCP

was shown to cause an accumulation of proteins in the ER without inhibition of their synthesis (Tarkatoff and Vassalli, 1979). Accumulation of secretory proteins overwhelms the ER chaperones, which are unable to fold the proteins. Unfolded proteins will then aggregate and cause ER-stress (Wang and Kaufman, 2014). ER-stress according to certain studies is triggered by Golgi-stress (Miyata *et al*, 2013). This agrees with observations of CCCP impairing protein modifications such as glycosylation, in the Golgi (Antoine and Jouanne, 1986). Inhibition of protein modification in CCCP-treatment was associated to an alteration of pH gradient. Indeed, CCCP neutralizes Golgi compartment, while maintenance of luminal acidic pH is required for proteolytic processing of secretory proteins (Schmidt and Moore, 1995; Antoine and Jouanne, 1986). Dissipation of transmembrane  $\Delta\text{pH}$  was shown to lower intravesicular  $\text{Ca}^{2+}$  binding affinity. The Golgi-calcium content is important in the regulation of several enzymatic activities within the Golgi including protein processing and membrane trafficking between the Golgi and the ER (Oda *et al*, 1992; Virk *et al*, 1985; Xing *et al*, 2010). CCCP-treatment therefore activates an ER and Golgi stress-response by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, through disruption of  $\Delta\text{pH}$ .

ER-stress was also linked to  $\Delta\Psi\text{m}$  dissipation, although the detailed mechanism was not addressed (Bouman *et al*, 2011). ER-stress is relevant to the PINK1/PARKIN-mediated pro-survival pathway. Indeed, ER-stress leads to upregulation of PARKIN. This increased expression of Parkin is mediated through the Perk/ATF4 pathway and is shown to protect cells from apoptosis. PERK/ATF4 pathway in ER stress controls the interplay between autophagy and apoptosis in many cell lines, via the effect of ATF4. This cell death switch is mediated through an upregulation of the P62-pathway. PERK is mediated to attenuate new protein translation as a pro-survival mechanism. This mechanism is however transient, therefore prolonged-CCCP-exposures activate pro-apoptotic ER-stress response pathway through the same pathway (Shen *et al*, 2015).

### **2.2.3 CCCP induces apoptosis**

During CCCP-treatment, pro-survival-pathways are first summoned, replaced by apoptosis when all anti-stress responses fail to rescue cell-integrity. Studies on glycolytic cells showed that uncouplers did not cause any loss of cell-viability during 48h, but induced mitochondrial-shaped-transition and severe fragmentation. Uncouplers-removal following fission resulted in a complete restoration of mitochondrial integrity, while prolonged exposures led to cell-death (Lyamzaev *et al*, 2004). This apoptosis is mitochondria-mediated, because fraction of cells depleted from their mitochondrial content remained viable with comparable exposures (Lyamzaev *et al*, 2004). Mitochondria trigger apoptosis by releasing cytochrome *c*, a caspase-activator. Cytochrome *c* release is dependent on mitochondrial membrane permeabilisation. CCCP



most probably induces cell-death by disrupting the diffusion barrier between the inner-mitochondrial membrane space and the inter-cristae-space. Indeed, as long as MIM integrity is conserved, mitochondrial-dependent apoptosis through cytochrome *c* release is hindered (Ott *et al*, 2002). Loss of mitochondria integrity is a common feature in CCCP-treatment, irrespective of the dose, the time-course and cell-type. In all studies, CCCP-treatment resulted in a fast-shape-transition of mitochondria including swelling and fission. PTP, the permeability transition pore, was shown to mediate both processes. Mitochondrial membrane depolarization induced by CCCP-treatment favors PTP-opening. PTP has been implicated in a wide-range of cell-death through deregulation of  $Ca^{2+}$  and ATP-depletion (Bernadi *et al*, 1992). Investigation of the relationship between PTP-opening, mitochondrial depolarization, cytochrome *c* release and the occurrence of cell-death, showed that modulation of the open-time is key as to the outcome (Petronilli *et al*, 2001). Mitochondrial volume changes make cytochrome *c* more available for selective release following pore-mediated swelling.

Nonetheless, beside mitochondrial membrane permeability, previous findings suggest that changes in pH may be behind CCCP-induced apoptosis. Indeed, it is most likely alteration of intracellular-pH, which regulates caspase activation in the mitochondrial pathway for apoptosis (Matsuyama *et al*, 2000). Apoptosis induction is often associated with concomitant modulation of autophagy. Their shared key molecular regulators evidence the interplay between both pathways (Rossin and D'Eletto, 2012). Programmed-cell-death not only includes apoptosis, it has also recently expanded to autophagy and necroptosis (Su *et al*, 2015). Accordingly, the possible mechanism for autophagy proteins to regulate apoptosis is through inactivation of their autophagy function in favor of their apoptotic properties. Under severe damage, specific autophagy proteins are believed to act as sensors of the metabolic state of cells and induce apoptosis. This was elegantly demonstrated in recent studies. Indeed, PARKIN was shown to mediate apoptosis following long exposures to uncoupling agents. The outcome of PARKIN expression is dose-dependent, limited or transient depolarization leading to mitophagy and cell-survival, while sustained PARKIN activation leads to apoptosis (Carroll *et al*, 2014).

## **Conclusion**

The observed time-dependence-responses during CCCP-treatment raise questions as to the link between mitochondrial damage and the mitochondrial-autophagic clearance. New reports suggest that mitophagy is not induced by mitochondrial damage (Bhatia-Kissova and Camougrand, 2013; Eiyama *et al*, 2013).

CCCP and its analogs are widely used to induce the autophagy-pathway through mitochondrial damage. We have, through the existing literature shown that the CCCP induced autophagic response was not only mediated by the rapid depolarization of

mitochondria but induces activation of autophagy-pathways through its action on several other pathways and organelles such as the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and lysosomes. The CCCP mitochondrial specificity is questioned as these weak-acids possess the ability to impair membrane-conductance and disrupt  $\Delta\text{pH}$ . To regain organellar-homeostasis, several pro-survival pathways are triggered in response to ATP-depletion, Ros-production and calcium-release. CCCP-treatment outcome, whether it is cell-survival or cell-death depends largely on exposure-time and concentration. CCCP-response is a perfect example of the fine cellular autoregulation, and could be capitalized on for future therapies in neurodegenerative diseases.

## References

- Anand, Ruchika, Timothy Wai, Michael J. Baker, Nikolay Kladt, Astrid C. Schauss, Elena Rugarli, and Thomas Langer. 2014. "The I-AAA Protease YME1L and OMA1 Cleave OPA1 to Balance Mitochondrial Fusion and Fission." *The Journal of Cell Biology* 204 (6): 919–29. doi:10.1083/jcb.201308006.
- Antoine, J. C., and C. Jouanne. 1986. "Multiple Effects of the Phenylhydrazone Derivative FCCP on the Secretory Pathway in Rat Plasma Cells." *European Journal of Cell Biology* 42 (1): 68–73.
- Beilina, Alexandra, Marcel Van Der Brug, Rili Ahmad, Sashi Kesavapany, David W. Miller, Gregory A. Petsko, and Mark R. Cookson. 2005. "Mutations in PTEN-Induced Putative Kinase 1 Associated with Recessive Parkinsonism Have Differential Effects on Protein Stability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (16): 5703–8. doi:10.1073/pnas.0500617102.
- Benz, R., and S. McLaughlin. 1983. "The Molecular Mechanism of Action of the Proton Ionophore FCCP (carbonylcyanide P-Trifluoromethoxyphenylhydrazone)." *Biophysical Journal* 41 (3): 381–98. doi:10.1016/S0006-3495(83)84449-X.
- Berezhnov, Alexey V., Marc P. M. Soutar, Evgeniya I. Fedotova, Maria S. Frolova, Helene Plun-Favreau, Valeriy P. Zinchenko, and Andrey Y. Abramov. 2016. "Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy." *The Journal of Biological Chemistry*, February. doi:10.1074/jbc.M115.691774.
- Bernardi, P., S. Vassanelli, P. Veronese, R. Colonna, I. Szabó, and M. Zoratti. 1992. "Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Effect of Protons and Divalent Cations." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (5): 2934–39.
- Biswas, G, O A Adebajo, B D Freedman, H K Anandatheerthavarada, C Vijayarathy, M Zaidi, M Kotlikoff, and N G Avadhani. 1999. "Retrograde Ca<sup>2+</sup> Signaling in C2C12 Skeletal Myocytes in Response to Mitochondrial Genetic and Metabolic Stress: A Novel Mode of Inter-Organellar Crosstalk." *The EMBO Journal* 18 (3): 522–33. doi:10.1093/emboj/18.3.522.
- Bouman, L, A Schlierf, A K Lutz, J Shan, A Deinlein, J Kast, Z Galehdar, et al. 2011. "Parkin Is Transcriptionally Regulated by ATF4: Evidence for an Interconnection between Mitochondrial Stress and ER Stress." *Cell Death and Differentiation* 18 (5): 769–82. doi:10.1038/cdd.2010.142.
- Boutra, C., K. Kaila, and R. D. Vaughan-Jones. 1988. "Mechanism of Rate-Dependent pH Changes in the Sheep Cardiac Purkinje Fibre." *The Journal of Physiology* 406 (December): 483–501.
- Buckler, K. J., and R. D. Vaughan-Jones. 1998. "Effects of Mitochondrial Uncouplers on Intracellular Calcium, pH and Membrane Potential in Rat Carotid Body Type I Cells." *The Journal of Physiology* 513 ( Pt 3) (December): 819–33.
- Carroll, Richard G., Emilie Hollville, and Seamus J. Martin. 2014. "Parkin Sensitizes toward Apoptosis Induced by Mitochondrial Depolarization through Promoting Degradation of Mcl-1." *Cell Reports* 9 (4): 1538–53. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.046.
- Chen, Le, Tingting Liu, Alice Tran, Xiyuan Lu, Alexey A. Tomilov, Vanessa Davies, Gino Cortopassi, et al. 2012. "OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy:

- Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability.” *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 1 (5). doi:10.1161/JAHA.112.003012.
- Chen, Weimin, Zheng Sun, Xiao-Jun Wang, Tao Jiang, Zheping Huang, Deyu Fang, and Donna D. Zhang. 2009. “Direct Interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response.” *Molecular Cell* 34 (6): 663–73. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.029.
- Dechant, Reinhard, Matteo Binda, Sung Sik Lee, Serge Pelet, Joris Winderickx, and Matthias Peter. 2010. “Cytosolic pH Is a Second Messenger for Glucose and Regulates the PKA Pathway through V-ATPase.” *The EMBO Journal* 29 (15): 2515–26. doi:10.1038/emboj.2010.138.
- D’Eletto, M., M. G. Farrace, F. Rossin, F. Strappazzon, G. Di Giacomo, F. Cecconi, G. Melino, et al. 2012. “Type 2 Transglutaminase Is Involved in the Autophagy-Dependent Clearance of Ubiquitinated Proteins.” *Cell Death and Differentiation* 19 (7): 1228–38. doi:10.1038/cdd.2012.2.
- De Vos, Kurt J., Victoria J. Allan, Andrew J. Grierson, and Michael P. Sheetz. 2005. “Mitochondrial Function and Actin Regulate Dynamin-Related Protein 1-Dependent Mitochondrial Fission.” *Current Biology: CB* 15 (7): 678–83. doi:10.1016/j.cub.2005.02.064.
- Ding, Wen-Xing, Fengli Guo, Hong-Min Ni, Abigail Bockus, Sharon Manley, Donna B. Stolz, Eeva-Liisa Eskelinen, Hartmut Jaeschke, and Xiao-Ming Yin. 2012. “Parkin and Mitofusins Reciprocally Regulate Mitophagy and Mitochondrial Spheroid Formation.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (50): 42379–88. doi:10.1074/jbc.M112.413682.
- Drobnica, L., and E. Sturdik. 1979. “The Reaction of Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones with Thiols.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 585 (3): 462–76.
- Egan, Daniel F., David B. Shackelford, Maria M. Mihaylova, Sara Gelino, Rebecca A. Kohnz, William Mair, Debbie S. Vasquez, et al. 2011. “Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy.” *Science* 331 (6016): 456–61. doi:10.1126/science.1196371.
- Finkel, Toren. 2001. “Reactive Oxygen Species and Signal Transduction.” *IUBMB Life* 52 (1): 3–6. doi:10.1080/15216540252774694.
- Gautier, Clement A., Tohru Kitada, and Jie Shen. 2008. “Loss of PINK1 Causes Mitochondrial Functional Defects and Increased Sensitivity to Oxidative Stress.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32): 11364–69. doi:10.1073/pnas.0802076105.
- Gleyzer, Natalie, and Richard C. Scarpulla. 2011. “PGC-1-Related Coactivator (PRC), a Sensor of Metabolic Stress, Orchestrates a Redox-Sensitive Program of Inflammatory Gene Expression.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 39715–25. doi:10.1074/jbc.M111.291575.
- Gomes, Ligia C., and Luca Scorrano. 2013. “Mitochondrial Morphology in Mitophagy and Macroautophagy.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (1): 205–12. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.012.
- Gowans, Graeme J., Simon A. Hawley, Fiona A. Ross, and D. Grahame Hardie. 2013. “AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by

- Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation.” *Cell Metabolism* 18 (4): 556–66. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.019.
- Gunter, T. E., and D. R. Pfeiffer. 1990. “Mechanisms by Which Mitochondria Transport Calcium.” *The American Journal of Physiology* 258 (5 Pt 1): C755–86.
- Gwinn, Dana M., David B. Shackelford, Daniel F. Egan, Maria M. Mihaylova, Annabelle Mery, Debbie S. Vasquez, Benjamin E. Turk, and Reuben J. Shaw. 2008. “AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint.” *Molecular Cell* 30 (2): 214–26. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.
- Han, Yong Hwan, Suhn Hee Kim, Sung Zoo Kim, and Woo Hyun Park. 2009. “Carbonyl Cyanide P-(trifluoromethoxy) Phenylhydrazone (FCCP) as an O<sub>2</sub>(\*) Generator Induces Apoptosis via the Depletion of Intracellular GSH Contents in Calu-6 Cells.” *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 63 (2): 201–9. doi:10.1016/j.lungcan.2008.05.005.
- Haque, M. Emdadul, Kelly J. Thomas, Cheryl D’Souza, Steve Callaghan, Tohru Kitada, Ruth S. Slack, Paul Fraser, Mark R. Cookson, Anurag Tandon, and David S. Park. 2008. “Cytoplasmic Pink1 Activity Protects Neurons from Dopaminergic Neurotoxin MPTP.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1716–21. doi:10.1073/pnas.0705363105.
- Hardie, D. Grahame, and Michael L. J. Ashford. 2014. “AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels.” *Physiology* 29 (2): 99–107. doi:10.1152/physiol.00050.2013.
- Heytler, P. G., and W. W. Prichard. 1962. “A New Class of Uncoupling Agents-- Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7 (May): 272–75.
- Huang, H.-C., Truyen Nguyen, and Cecil B. Pickett. 2000. “Regulation of the Antioxidant Response Element by Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of NF-E2-Related Factor 2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23): 12475–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18788/>.
- Inoki, Ken, Tianqing Zhu, and Kun-Liang Guan. 2003. “TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival.” *Cell* 115 (5): 577–90. doi:10.1016/S0092-8674(03)00929-2.
- Ishihara, Naotada, Akihiro Jofuku, Yuka Eura, and Katsuyoshi Mihara. 2003. “Regulation of Mitochondrial Morphology by Membrane Potential, and DRP1-Dependent Division and FZO1-Dependent Fusion Reaction in Mammalian Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (4): 891–98.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 1999. “Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Responsive Elements by Nrf2 through Binding to the Amino-Terminal Neh2 Domain.” *Genes & Development* 13 (1): 76–86.
- Jendrach, Marina, Suzana Gispert, Filomena Ricciardi, Michael Klinkenberg, Rudolf Schemm, and Georg Auburger. 2009. “The Mitochondrial Kinase PINK1, Stress Response and Parkinson’s Disease.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (6): 481–86. doi:10.1007/s10863-009-9256-0.
- Jin, Seok Min, Michael Lazarou, Chunxin Wang, Lesley A. Kane, Derek P. Narendra, and Richard J. Youle. 2010. “Mitochondrial Membrane Potential Regulates

- PINK1 Import and Proteolytic Destabilization by PARL.” *The Journal of Cell Biology* 191 (5): 933–42. doi:10.1083/jcb.201008084.
- Joo, Joung Hyuck, Frank C. Dorsey, Aashish Joshi, Kristin M. Hennessy-Walters, Kristie L. Rose, Kelly McCastlain, Ji Zhang, et al. 2011. “Hsp90-Cdc37 Chaperone Complex Regulates Ulk1- and Atg13-Mediated Mitophagy.” *Molecular Cell* 43 (4): 572–85. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.018.
- Kasiviswanathan, Rajesh, Tammy R. L. Collins, and William C. Copeland. 2012. “The Interface of Transcription and DNA Replication in the Mitochondria.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1819 (9-10): 970–78. doi:10.1016/j.bbagr.2011.12.005.
- Komatsu, Masaaki, Satoshi Waguri, Masato Koike, Yu-Shin Sou, Takashi Ueno, Taichi Hara, Noboru Mizushima, et al. 2007. “Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice.” *Cell* 131 (6): 1149–63. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035.
- Korobova, Farida, Vinay Ramabhadran, and Henry N. Higgs. 2013. “An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118): 464–67. doi:10.1126/science.1228360.
- Kuruvilla, Sabu, Charles W. Qualls, Ronald D. Tyler, Sam M. Witherspoon, Gina R. Benavides, Lawrence W. Yoon, Karen Dold, Roger H. Brown, Subbiah Sangiah, and Kevin T. Morgan. 2003. “Effects of Minimally Toxic Levels of Carbonyl Cyanide P-(trifluoromethoxy) Phenylhydrazone (FCCP), Elucidated through Differential Gene Expression with Biochemical and Morphological Correlations.” *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 73 (2): 348–61. doi:10.1093/toxsci/kfg084.
- Kwon, Seung-Hwan, Sa-Ik Hong, Ji-Ah Kim, Yang-Hee Jung, Sun-Yeou Kim, Hyoung-Chun Kim, Seok-Yong Lee, and Choon-Gon Jang. 2011. “The Neuroprotective Effects of *Lonicera Japonica* THUNB. against Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis via Phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt in SH-SY5Y Cells.” *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (4): 1011–19. doi:10.1016/j.fct.2011.01.008.
- Laplante, Mathieu, and David M. Sabatini. 2012. “mTOR Signaling in Growth Control and Disease.” *Cell* 149 (2): 274–93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Lee, W., J. Johnson, D. J. Gough, J. Donoghue, G. L. M. Cagnone, V. Vaghjiani, K. A. Brown, T. G. Johns, and J. C. St John. 2015. “Mitochondrial DNA Copy Number Is Regulated by DNA Methylation and Demethylation of POLGA in Stem and Cancer Cells and Their Differentiated Progeny.” *Cell Death & Disease* 6 (2): e1664. doi:10.1038/cddis.2015.34.
- Legros, Frédéric, Anne Lombès, Paule Frachon, and Manuel Rojo. 2002. “Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4343–54. doi:10.1091/mbc.E02-06-0330.
- Leonard, Anthony P., Robert B. Cameron, Jaime L. Speiser, Bethany J. Wolf, Yuri K. Peterson, Rick G. Schnellmann, Craig C. Beeson, and Bärbel Rohrer. 2015. “Quantitative Analysis of Mitochondrial Morphology and Membrane Potential in Living Cells Using High-Content Imaging, Machine Learning, and Morphological

- Binning.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (2): 348–60. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.002.
- Levonen, Anna-Liisa, Aimee Landar, Anup Ramachandran, Erin K. Ceaser, Dale A. Dickinson, Giuseppe Zanoni, Jason D. Morrow, and Victor M. Darley-Usmar. 2004. “Cellular Mechanisms of Redox Cell Signalling: Role of Cysteine Modification in Controlling Antioxidant Defences in Response to Electrophilic Lipid Oxidation Products.” *The Biochemical Journal* 378 (Pt 2): 373–82. doi:10.1042/BJ20031049.
- Li, Sunan, Shan Xu, Brian A. Roelofs, Liron Boyman, W. Jonathan Lederer, Hiromi Sesaki, and Mariusz Karbowski. 2015. “Transient Assembly of F-Actin on the Outer Mitochondrial Membrane Contributes to Mitochondrial Fission.” *The Journal of Cell Biology* 208 (1): 109–23. doi:10.1083/jcb.201404050.
- Lyamzaev, K. G., O. Y. Pletjushkina, V. B. Saprunova, L. E. Bakeeva, B. V. Chernyak, and V. P. Skulachev. 2004. “Selective Elimination of Mitochondria from Living Cells Induced by Inhibitors of Bioenergetic Functions.” *Biochemical Society Transactions* 32 (6): 1070–71. doi:10.1042/BST0321070.
- Marino, Maria Lucia, Paola Pellegrini, Giuseppe Di Lernia, Mojgan Djavaheri-Mergny, Slavica Brnjic, Xiaonan Zhang, Maria Hägg, et al. 2012. “Autophagy Is a Protective Mechanism for Human Melanoma Cells under Acidic Stress.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (36): 30664–76. doi:10.1074/jbc.M112.339127.
- Maro, B., and M. Bornens. 1982. “Reorganization of HeLa Cell Cytoskeleton Induced by an Uncoupler of Oxidative Phosphorylation.” *Nature* 295 (5847): 334–36.
- Masui, Kenta, Webster K. Cavenee, and Paul S. Mischel. 2014. “mTORC2 in the Center of Cancer Metabolic Reprogramming.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25 (7): 364–73. doi:10.1016/j.tem.2014.04.002.
- Matsuda, Noriyuki, Shigeto Sato, Kahori Shiba, Kei Okatsu, Keiko Saisho, Clement A. Gautier, Yu-Shin Sou, et al. 2010. “PINK1 Stabilized by Mitochondrial Depolarization Recruits Parkin to Damaged Mitochondria and Activates Latent Parkin for Mitophagy.” *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 211–21. doi:10.1083/jcb.200910140.
- Matsuyama, S, J Llopis, Q L Deveraux, R Y Tsien, and J C Reed. 2000. “Changes in Intramitochondrial and Cytosolic pH: Early Events That Modulate Caspase Activation during Apoptosis.” *Nature Cell Biology* 2 (6): 318–25. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=10854321&lang=fr&site=ehost-live>.
- McCoy, Melissa K., Alice Kaganovich, Iakov N. Rudenko, Jinhui Ding, and Mark R. Cookson. 2014. “Hexokinase Activity Is Required for Recruitment of Parkin to Depolarized Mitochondria.” *Human Molecular Genetics* 23 (1): 145–56. doi:10.1093/hmg/ddt407.
- Meissner, Wassilios G., Mark Frasier, Thomas Gasser, Christopher G. Goetz, Andres Lozano, Paola Piccini, José A. Obeso, et al. 2011. “Priorities in Parkinson’s Disease Research.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 10 (5): 377–93. doi:10.1038/nrd3430.
- Mei, Yang, Yiru Zhang, Kazuo Yamamoto, Wei Xie, Tak W. Mak, and Han You. 2009. “FOXO3a-Dependent Regulation of Pink1 (Park6) Mediates Survival Signaling in

- Response to Cytokine Deprivation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13): 5153–58. doi:10.1073/pnas.0901104106.
- Mitsuishi, Yoichiro, Hozumi Motohashi, and Masayuki Yamamoto. 2012. “The Keap1–Nrf2 System in Cancers: Stress Response and Anabolic Metabolism.” *Molecular and Cellular Oncology* 2: 200. doi:10.3389/fonc.2012.00200.
- Miyata, Shingo, Tatsunori Mizuno, Yoshihisa Koyama, Taiichi Katayama, and Masaya Tohyama. 2013. “The Endoplasmic Reticulum-Resident Chaperone Heat Shock Protein 47 Protects the Golgi Apparatus from the Effects of O-Glycosylation Inhibition.” *PLoS One* 8 (7): e69732. doi:10.1371/journal.pone.0069732.
- Mlejnek, Petr, and Petr Dolezel. 2015. “Loss of Mitochondrial Transmembrane Potential and Glutathione Depletion Are Not Sufficient to Account for Induction of Apoptosis by Carbonyl Cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone in Human Leukemia K562 Cells.” *Chemico-Biological Interactions* 239 (September): 100–110. doi:10.1016/j.cbi.2015.06.033.
- Mohr, F. C., and C. Fewtrell. 1987. “Depolarization of Rat Basophilic Leukemia Cells Inhibits Calcium Uptake and Exocytosis.” *The Journal of Cell Biology* 104 (3): 783–92.
- Murata, Hitoshi, Masakiyo Sakaguchi, Yu Jin, Yoshihiko Sakaguchi, Jun-ichiro Futami, Hidenori Yamada, Ken Kataoka, and Nam-ho Huh. 2011. “A New Cytosolic Pathway from a Parkinson Disease-Associated Kinase, BRPK/PINK1: Activation of AKT via mTORC2.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (9): 7182–89. doi:10.1074/jbc.M110.179390.
- Murata, Hitoshi, Hitoshi Takamatsu, Sulai Liu, Ken Kataoka, Nam-Ho Huh, and Masakiyo Sakaguchi. 2015. “NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions.” *PLoS One* 10 (11): e0142438. doi:10.1371/journal.pone.0142438.
- Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, and Richard J. Youle. 2010. “PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin.” *PLoS Biology* 8 (1): e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
- Oda, K. 1992. “Calcium Depletion Blocks Proteolytic Cleavages of Plasma Protein Precursors Which Occur at the Golgi And/or Trans-Golgi Network. Possible Involvement of Ca(2+)-Dependent Golgi Endoproteases.” *The Journal of Biological Chemistry* 267 (24): 17465–71.
- Ott, Martin, John D. Robertson, Vladimir Gogvadze, Boris Zhivotovsky, and Sten Orrenius. 2002. “Cytochrome c Release from Mitochondria Proceeds by a Two-Step Process.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3): 1259–63. doi:10.1073/pnas.241655498.
- Park, Sujin, Insook Jang, Christian Zuber, Yangsin Lee, Jin Won Cho, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, and Jürgen Roth. 2014. “ERADication of EDEM1 Occurs by Selective Autophagy and Requires Deglycosylation by Cytoplasmic Peptide N-Glycanase.” *Histochemistry and Cell Biology* 142 (2): 153–69. doi:10.1007/s00418-014-1204-3.
- Peña-Llopis, Samuel, Silvia Vega-Rubin-de-Celis, Jacob C. Schwartz, Nicholas C. Wolff, Tram Anh T. Tran, Lihua Zou, Xian-Jin Xie, David R. Corey, and James

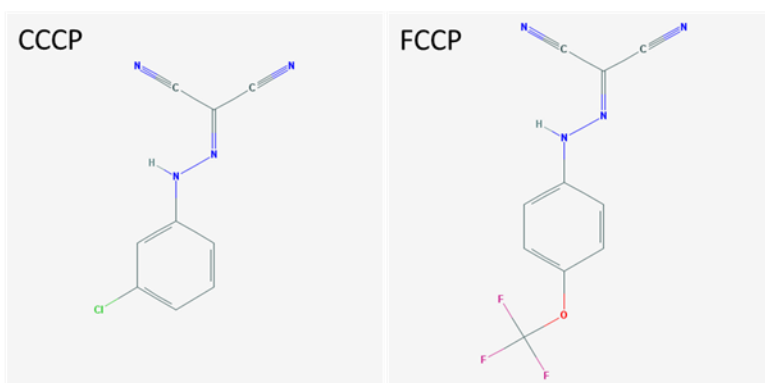


- Brugarolas. 2011. "Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1." *The EMBO Journal* 30 (16): 3242–58. doi:10.1038/emboj.2011.257.
- Peterkofsky, A., and C. Gazdar. 1979. "Escherichia Coli Adenylate Cyclase Complex: Regulation by the Proton Electrochemical Gradient." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (3): 1099–1103.
- Petronilli, V., D. Penzo, L. Scorrano, P. Bernardi, and F. Di Lisa. 2001. "The Mitochondrial Permeability Transition, Release of Cytochrome c and Cell Death. Correlation with the Duration of Pore Openings in Situ." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (15): 12030–34. doi:10.1074/jbc.M010604200.
- Poole, Angela C., Ruth E. Thomas, Selina Yu, Evelyn S. Vincow, and Leo Pallanck. 2010. "The Mitochondrial Fusion-Promoting Factor Mitofusin Is a Substrate of the PINK1/Parkin Pathway." *PLoS ONE* 5 (4). doi:10.1371/journal.pone.0010054.
- Pressman, B. C., and M. Fahim. 1982. "Pharmacology and Toxicology of the Monovalent Carboxylic Ionophores." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22: 465–90. doi:10.1146/annurev.pa.22.040182.002341.
- Rimessi, Alessandro, Massimo Bonora, Saverio Marchi, Simone Patergnani, Carlo M. T. Marobbio, Francesco M. Lasorsa, and Paolo Pinton. 2013. "Perturbed Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Signals as Causes or Consequences of Mitophagy Induction." *Autophagy* 9 (11): 1677–86. doi:10.4161/auto.24795.
- Roczniak-Ferguson, Agnes, Constance S. Petit, Florian Froehlich, Sharon Qian, Jennifer Ky, Brittany Angarola, Tobias C. Walther, and Shawn M. Ferguson. 2012. "The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis." *Science Signaling* 5 (228): ra42. doi:10.1126/scisignal.2002790.
- Rossin, F., M. D'Eletto, L. Falasca, S. Sepe, S. Cocco, G. M. Fimia, M. Campanella, P. G. Mastroberardino, M. G. Farrace, and M. Piacentini. 2015. "Transglutaminase 2 Ablation Leads to Mitophagy Impairment Associated with a Metabolic Shift towards Aerobic Glycolysis." *Cell Death and Differentiation* 22 (3): 408–18. doi:10.1038/cdd.2014.106.
- Rossin, Federica, Manuela D'Eletto, Douglas Macdonald, Maria Grazia Farrace, and Mauro Piacentini. 2012. "TG2 Transamidating Activity Acts as a Reostat Controlling the Interplay between Apoptosis and Autophagy." *Amino Acids* 42 (5): 1793–1802. doi:10.1007/s00726-011-0899-x.
- Schmidt, W. K., and H. P. Moore. 1995. "Ionic Milieu Controls the Compartment-Specific Activation of pro-Opiomelanocortin Processing in AtT-20 Cells." *Molecular Biology of the Cell* 6 (10): 1271–85.
- Shen, Yun, Junjun Yang, Jing Zhao, Changji Xiao, Caimin Xu, and Yang Xiang. 2015. "The Switch from ER Stress-Induced Apoptosis to Autophagy via ROS-Mediated JNK/p62 Signals: A Survival Mechanism in Methotrexate-Resistant Choriocarcinoma Cells." *Experimental Cell Research* 334 (2): 207–18. doi:10.1016/j.yexcr.2015.04.010.
- Smeitink, J., L. van den Heuvel, and S. DiMauro. 2001. "The Genetics and Pathology of Oxidative Phosphorylation." *Nature Reviews. Genetics* 2 (5): 342–52. doi:10.1038/35072063.

- Starkov, A. A., R. A. Simonyan, V. I. Dedukhova, S. E. Mansurova, L. A. Palamarchuk, and V. P. Skulachev. 1997. "Regulation of the Energy Coupling in Mitochondria by Some Steroid and Thyroid Hormones." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1318 (1-2): 173–83.
- Su, Zhenyi, Zuozhang Yang, Yongqing Xu, Yongbin Chen, and Qiang Yu. 2015. "MicroRNAs in Apoptosis, Autophagy and Necroptosis." *Oncotarget* 6 (11): 8474–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496162/>.
- Takei, Nobuyuki, and Hiroyuki Nawa. 2014. "mTOR Signaling and Its Roles in Normal and Abnormal Brain Development." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 28. doi:10.3389/fnmol.2014.00028.
- Tartakoff, A., and P. Vassalli. 1979. "Plasma Cell Immunoglobulin M Molecules. Their Biosynthesis, Assembly, and Intracellular Transport." *The Journal of Cell Biology* 83 (2 Pt 1): 284–99.
- Tufekci, Kemal Ugur, Ezgi Civi Bayin, Sermin Genc, and Kursad Genc. 2011. "The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Parkinson's Disease* 2011 (February). doi:10.4061/2011/314082.
- Virk, S. S., C. J. Kirk, and S. B. Shears. 1985. "Ca<sup>2+</sup> Transport and Ca<sup>2+</sup>-Dependent ATP Hydrolysis by Golgi Vesicles from Lactating Rat Mammary Glands." *The Biochemical Journal* 226 (3): 741–48.
- Wai, Timothy, Jaime García-Prieto, Michael J. Baker, Carsten Merkwirth, Paule Benit, Pierre Rustin, Francisco Javier Rupérez, Coral Barbas, Borja Ibañez, and Thomas Langer. 2015. "Imbalanced OPA1 Processing and Mitochondrial Fragmentation Cause Heart Failure in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 350 (6265): aad0116. doi:10.1126/science.aad0116.
- Wai, Timothy, and Thomas Langer. 2016. "Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 27 (2): 105–17. doi:10.1016/j.tem.2015.12.001.
- Wallace, K. B., and A. A. Starkov. 2000. "Mitochondrial Targets of Drug Toxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 353–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.353.
- Wang, Miao, and Randal J. Kaufman. 2014. "The Impact of the Endoplasmic Reticulum Protein-Folding Environment on Cancer Development." *Nature Reviews. Cancer* 14 (9): 581–97. doi:10.1038/nrc3800.
- Wojtczak, L., and P. Schönfeld. 1993. "Effect of Fatty Acids on Energy Coupling Processes in Mitochondria." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1183 (1): 41–57.
- Wu, Zhihao, Tomoyo Sawada, Kahori Shiba, Song Liu, Tomoko Kanao, Ryosuke Takahashi, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai, and Bingwei Lu. 2013. "Tricornered/NDR Kinase Signaling Mediates PINK1-Directed Mitochondrial Quality Control and Tissue Maintenance." *Genes & Development* 27 (2): 157–62. doi:10.1101/gad.203406.112.
- Xing, Wenjing, Guangwei Li, Yuhui Xi, Jin Guo, Hongzhu Li, Hongxia Li, Weihua Zhang, et al. 2010. "The Functional Expression of Calcium-Sensing Receptors in BRL Cells and Related Signal Transduction Pathway Responsible for Intracellular Calcium Elevation." *Molecular and Cellular Biochemistry* 343 (1-2): 13–19. doi:10.1007/s11010-010-0493-7.

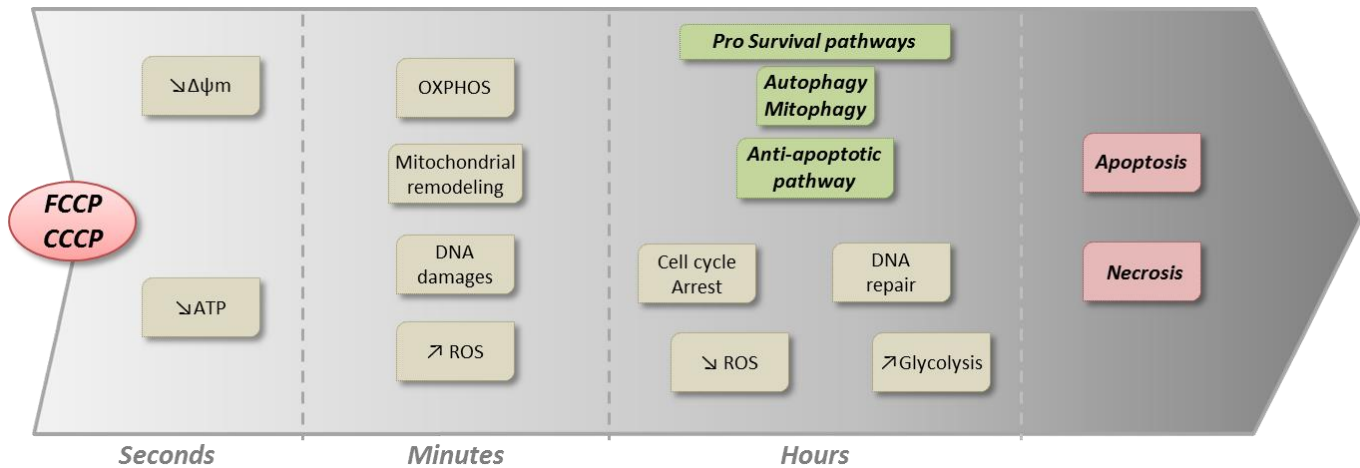
Yin, Xiao-Ming, and Wen-Xing Ding. 2013. "The Reciprocal Roles of PARK2 and Mitofusins in Mitophagy and Mitochondrial Spheroid Formation." *Autophagy* 9 (11): 1687–92. doi:10.4161/auto.24871.

## Figures



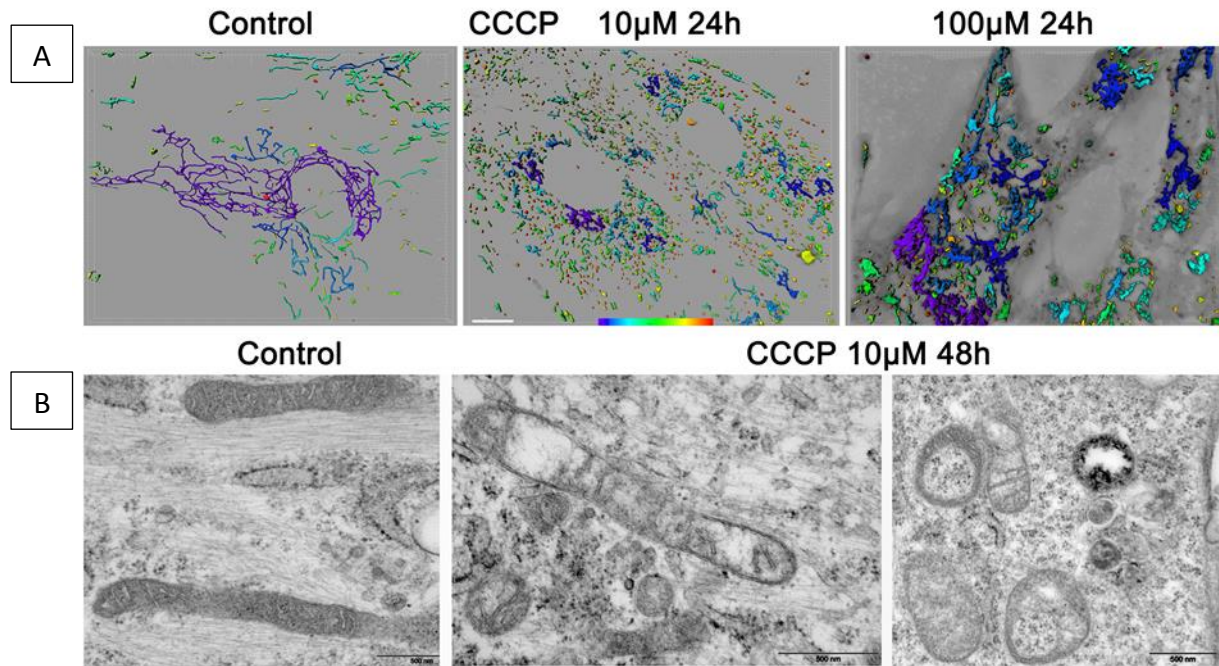
Molecular Weight	204.6158 g/mol	254.16811 g/mol
Molecular Formula	<a href="#">C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>4</sub></a>	<a href="#">C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O</a>
XLogP3	3.4	3.7
Hydrogen Bond Donor Count	1	1
Hydrogen Bond Acceptor Count	4	8
Rotatable Bond Count	2	3
Exact Mass	204.020274 g/mol	254.041545 g/mol

**Table1: Structures of CCCP and FCCP**



**Figure 1: General mechanism of FCCP and CCCP on cells**

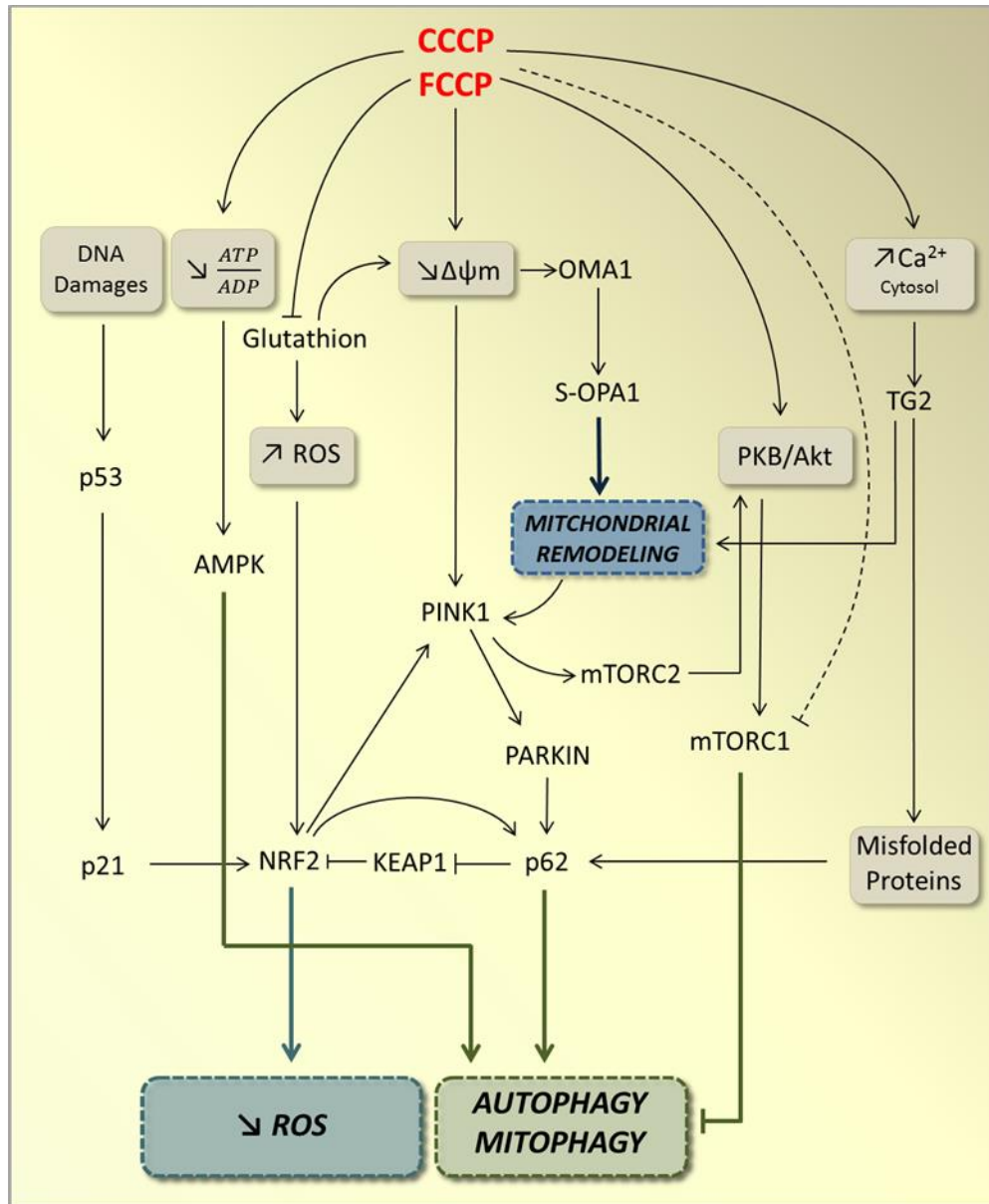
Common features are mitochondrial membrane potential dissipation, followed by a decrease of ATP level. Concomitantly, cell cycle arrest is observed due to DNA damage and protein synthesis alterations. Upregulation of glycolysis increases ATP level in the following stages. Early cellular responses to CCCP/FCCP treatment are anti-apoptotic, which include an upregulation of autophagy, an increase of the anti-oxidant response.



**Figure 2: CCCP impacts mitochondrial network and cristae integrity**

A: Control fibroblasts were treated either with DMSO, or 10-100µM CCCP. Mitochondrial networks were labeled with Mito-Tracker Green.

B: Control fibroblasts were treated with DMSO or 10µM CCCP for 48h and cristae integrity was assessed by electron microscopy



**Figure 3: FCCP and CCCP activates pro-survival pathways**

Proposed mechanism of CCCP/FCCP action in promoting cell survival

*Approche thérapeutique dans les  
mutations d'OPA<sub>1</sub>*



## Introduction

La dynamique mitochondriale comprend non seulement la régulation du remodelage mitochondrial et de la connectivité du réseau mitochondrial médiées par les cycles de fusion et de fission, mais aussi le mouvement des mitochondries le long du cytosquelette. Les modifications de la dynamique mitochondriale peuvent être impliquées dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives communes comme la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson (Friedman et al. 2011). Des mutations dans deux gènes de fusion mitochondriales (*MFN2* et *OPA1*) conduisent à des maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Charcot-Marie Tooth de type 2A et l'atrophie optique autosomique dominante (ADOA), soulignant ainsi l'importance de ces événements dans la physiologie cellulaire (Olichon et al. 2006; Loiseau et al. 2007).

L'ADOA causée par des mutations dans le gène d'*OPA1* est caractérisée sur le plan histologique à une diminution du nombre de cellules ganglionnaires de la rétine conduisant à la perte des tissus de la myéline et des nerfs à l'intérieur du nerf optique, entre autre. Cette dégénérescence primaire des RGCs qui caractérise ce trouble conduit souvent à la perte d'acuité visuelle partielle et parfois à une cécité. Au niveau cellulaire et selon les fonctions prêtées à *OPA1*, des mutations sur ce dernier conduisent à une de sensibilité accrue à l'apoptose des cellules, des dysfonctionnements bioénergétiques et des altérations de la distribution et de la morphologie des mitochondries (Ambre M. Bertholet et al. 2013; Chevrollier et al. 2008). De nombreuses études ont mis en évidence un phénotype fragmenté du réseau mitochondrial dans les maladies neurodégénératives (Xinglong Wang et al. 2009). Sachant que l'équilibre entre la fusion et la fission est essentiel aux fonctions cellulaires, le défi est le criblage de molécules thérapeutiques capables de renverser la fragmentation excessive des mitochondries. En se concentrant sur cet aspect de la recherche, notre objectif est le développement de stratégies thérapeutiques visant à inverser le phénotype associé aux mutations d'*OPA1* en pathologie en modulant la distribution et la biogenèse mitochondriale. L'acétylation des résidus lysines est une modification post-traductionnelle clé connue pour réguler la transcription des

gènes, la transduction du signal, le transport et le métabolisme cellulaire. Les lysines désacétylases (HDAC), y compris KDACs classiques (histone désacétylases, HDAC) et les sirtuines (SIRTs), émergent comme des cibles thérapeutiques dans la neurodégénérescence (Guedes-Dias et Oliveira 2013a). La régulation de la biogenèse mitochondriale est sous le contrôle de SIRT1 et SIRT3, principalement via une modulation de PGC-1 $\alpha$  et la fission mitochondriale est diminuée par des inhibiteurs de KDACs (HDAC)(Ahn et al. 2008; Kong et al. 2010b; J. S. Lee et al. 2012). Il existe deux déacétylases cytosoliques ayant un rôle dans la régulation de l'acétylation de l'alpha-tubuline : HDAC 6 et SIRT2. Des études sur HDAC6 ou SIRT2 ont rapporté un effet neuroprotecteur de l'inhibition de ces déacétylases (Dompierre *et al*, 2007; Luthi-Carter *et al*, 2010). Seule l'inhibition de HDAC6 a été rapportée comme ayant un impact sur le transport mitochondrial (Guedes-Dias et al. 2015). Nous avons donc sélectivement inhibé l'activité  $\alpha$ -tubuline déacétylase de HDAC6 par une molécule la tubacine. L'objectif de cette étude était de moduler la dynamique mitochondriale dans les cellules de patients DOA+ en ciblant le cytosquelette compte tenu de la relation entre les mitochondries et ce dernier.

## Article 4

### **Selective HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion in *OPA1*-mutated fibroblasts and reverses impaired mitochondrial function**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Kamel Madani<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup>

**Article en préparation**

## INTRODUCTION

Mitochondria are dynamic organelles that mediate many essential cell functions such as energy production and apoptosis. Depending on the cellular context, mitochondria shift between fragmented and tubular network-like morphologies by means of coordinated fission and fusion. Mitochondrial fusion enables the exchange of mitochondrial DNA (mtDNA) and other matrix components between mitochondria, rendering protection against mtDNA mutations by allowing functional complementation thereby maintaining a healthy oxidative phosphorylation system (Youle and van der Bliek, 2012; Burchell *et al.*, 2010). Mitochondrial fission allows mitochondrial segregation to daughter cells during mitosis, dysfunctional mitochondrial targeting to the mitophagy machinery for elimination, and enables mitochondrial size and shape adaptations required for distribution (Twig *et al.* 2008b) (Ishihara *et al.*, 2009). Fission and fusion are mediated by a large family of GTPases (Pareyson *et al.* 2015). Mitochondrial fusion involves merging of the outer as well the inner mitochondrial membranes, a coordinated process assisted by different proteins. Mitofusin-1 (MFN1), Mitofusin-2 (MFN2) mediate mitochondrial outer membrane (MOM) fusion, while Optic Atrophy-1 (OPA1) located in the mitochondrial inner membrane (MIM) is implicated in MIM-fusion (Song *et al.* 2007)(Chen *et al.*, 2003). Fission is solely controlled by MOM proteins, DRP1(dynamamin-related protein-1), FIS1 (mitochondrial fission protein 1), MFF (mitochondrial fission factor) and MID49/51 or MIEF1/2 (mitochondrial elongation factor 1/2) (Zhao *et al.*, 2011) (Ishihara *et al.* 2009; Otera *et al.* 2010) (Palmer *et al.* 2013). Mutations in these genes are associated with neurodegenerative disorders (Knott *et al.* 2008). Mutations in OPA1 are related to the most common form of optic atrophy, Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA) (Knott *et al.* 2008). This optic neuropathy is characterised by optic nerve degeneration leading to partial visual loss (Lenaers *et al.* 2012b). On the cellular level, *OPA1* gene mutations leads to an increased cell-sensitivity to apoptosis, bioenergetics dysfunction (Landes *et al.*, 2010) (Chevrollier *et al.*, 2008). Mutations on *OPA1* lead to mitochondrial network fragmentation. Other studies have tied mitochondrial network structure and bioenergetics efficiency. Hence finding a manner to reverse this fragmented network could be a possible target for therapy.

Previous studies have shown that treatment with lysine deacetylases (KDACs) inhibitors induced mitochondrial elongation in several cell lines (J. S. Lee *et al.* 2012). Mitochondria fission and fusion dynamics are regulated by acetylation. The mitochondrial deacetylase SIRT3 is capable of deacetylating OPA1 and elevating its GTPase activity (Samant *et al.* 2014). Moreover mitochondrial dynamics also involve mitochondrial transport and distribution, which are mediated by dyneins and kinesins (Saxton and Hollenbeck 2012). This distribution is modulated by calcium levels, phosphorylation and acetylation (Saxton and Hollenbeck, 2012; (Friedman *et al.* 2010). Hyperacetylation of microtubules improves the attachment of kinesin-1 to mitochondria

thus elevating mitochondrial transport, partly because mitochondria display higher affinity for acetylated microtubules (S. Chen et al. 2010) ((Friedman et al. 2010). Acetylation is also implicated in mitochondrial biogenesis (Guedes-Dias and Oliveira 2013b). Deacetylation of microtubules by SIRT1 is reported to activate mitochondrial biogenesis (Guedes-Dias and Oliveira 2013b). Knowing that ADOA is characterised by mitochondrial fragmentation and by a loss of mitochondrial mass (Chevrollier et al. 2012), regulating acetylation may be a potential approach to improve mitochondrial connectivity and reverse the various mitochondrial function-alterations induced by *OPA1* mutations. Acetylation is mainly regulated by lysine deacetylases (KDAC); among these KDACS are found histones deacetylases (HDAC) and sirtuins deacetylase (SIRTs). HDAC6 and SIRT2 are the two most significant KDAC for the regulation of mitochondrial transport and distribution in cells (Guedes-Dias and Oliveira 2013b). We focused on directly impacting the deacetylase domain of HDAC6 using tubacin on several cell-lines affected by *OPA1* mutations, to promote mitochondrial fusion and mitochondrial biogenesis.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Patients and fibroblast primary culture-* 2 patients exhibiting the OPA1\_S545R mutation in the optic atrophy 1 gene (*OPA1*), 1 patient harbouring the OPA1\_R445H mutation and finally 1 patient characterized for the OPA1\_C551Y were considered in this study. All 4 patients were diagnosed with DOA *plus* (DOA+) syndrome. Primary fibroblast originated from skin biopsies were obtained from healthy and DOA+ patients after written consent. The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere (95% air and 5% CO<sub>2</sub>) with 2/3 Dulbecco's Modified Eagle Medium and 1/3 amniomMAX (Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA laboratories), uridine (5mg/ml; Sigma) and pyruvate (10mg/ml, Sigma). Cells were then treated for 24h or 7days with DMSO or 10µM tubacin. All experiments were conducted on cells with similar passage numbers, ranging from 6 to 25, to avoid senescence artefacts.

*Cell Growth assay-* approximately 10 000 fibroblasts per well were seeded on a 24-well chamber slide (Cellstar, Greiner) and placed in the IncuCyte ZOOM® system (Essen Biosciences). IncuCyte ZOOM® consists of a microscope gantry that resides in a cell incubator, and a networked external controller hard drive that gathers and processes image data. A 10X objective was used. Four phase-contrast automated images per well were acquired every 2 hours for 7days. Three replicates were analyzed for each cell line and each condition. Cell growth was automatically calculated at each time point using the relative cell density (ratio of the occupied area to the total area of the acquired regions).

*PCR Quantification of mtDNA*- mtDNA quantifications were performed by qPCR with the use of two primer couples specific to mitochondrial DNA, and two primer couples specific to nuclear genes, using iQ SYBR Green Supermix and the Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Biorad). Data are presented as the ratio of mtDNA copy number/nuDNA copy number. The following primers were used in the protocol:

MitoDNA\_RNAL: Forward: 5'-CGCATAAACTTAAACTTTACAG-3';  
Reverse: 5'-CTTTGCGTAGTTGTATATAGC-3';

MitoDNA\_ND4: Forward 5'-CAGCCACATAGCCCTCGTAG-3';  
Reverse: 5'-GCGAGGTTAGCGAGGCTTGC-3';

Nucl $\beta$ -glob: Forward: 5'TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3';  
Reverse: 5'ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3';

NuclAIB: Forward: 5'-GGAGTTTCCTGGACAAATGA;  
Reverse: 5'-AGGACTGGCGTTTATGTCTT-3'.

*Microscopy*- Mitochondria were labelled with Mitotracker green (Life Technologies, 5:20000) and incubated for 15 minutes under the same incubation conditions. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin and  $\alpha$ -tubulin were marked with primary antibodies (respectively: T7451, Sigma; T3526) and secondary antibodies: Goat Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 (ab150077 and Goat Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor® 568, ab175701.during immunofixation.

For imaging, coverslips were mounted in 24-well glass plate or in double chambers and placed on the stage of an inverted microscope. Images were then acquired with the inverted widefield NIKON Ti-E microscope equipped with an Andor NEO sCOMS camera controlled by NIS Element software. Each image was obtained with a 100x oil objective (Nikon Plan Apo100x, N.A. 1.45). On average, 21 image-planes were taken along the Z-axis at 0.2 $\mu$ m increments. To limit mitochondrial movements, the images were taken at a controlled-temperature (25°C). Huygens software (Scientific Volume Imaging) was used for deconvolution and Imaris 8 software (Bitplane) was used for morphometric analysis. The data presented here are the mean of 25 images from 4 independent trials for each cell-line and condition.

*Immunoblotting analysis* – Total protein extracts (25-60  $\mu$ g) were separated on acrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes (GE healthcare, life sciences). Specific proteins were detected using mouse anti-LC3 (1/2000, Enzo, #ALX-803-081-C100), mouse anti-VDAC (1/2000, Abcam, #ab34726), rabbit anti-P62 (1/1000, Enzo, #BML-PW9860-0100), anti-mouse P84 (1/1000, Abcam, #ab487), anti-mouse Human Oxphos (1/1000, Abcam, #ab110411) mouse anti-OPA1 (1/1000, “BD transduction #612606), rabbit anti-SIRT3 (1/1000, cell-signaling mAb #2627) and mouse anti-tubulin (1/2000, Sigma, #T9026). Anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibodies (GE healthcare, life sciences) were used at 1/10 000 and 1/20

000 respectively and signals were detected using a chemiluminescence system (Super signal<sup>®</sup> west femto, Thermo Scientific, #34095).

*Mitochondria Respiration measurements* – Respiration rates were assessed on intact cells ( $1.1 \times 10^6$  cells) suspended in DMEM-F12. Cellular oxygen consumption was measured at 37°C on a high-resolution oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria). Baseline respiration was measured in the absence of exogenous substrates, while non-phosphorylating respiration was achieved by addition of oligomycin at a concentration of 2 µg/ml. In order to see how the patients' cells would react to an increased ATP demand, the uncoupler, Carbonyl-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazine (FCCP), was added to dissipate the electrochemical gradient that drives ATP synthesis. This maximal respiration was accomplished by a stepwise manual titration of FCCP (4 mM). Finally mitochondrial specific respiration was controlled by inhibition of cytochrome bc<sub>1</sub> (complex III) with antimycin at a concentration of 2.5 µM.

***Statistical analysis***- Statistical analysis was performed using GraphPad statistical software (San Diego, CA). Independent sample *t*-test was used for two group comparisons, as required. For all analysis, a p value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

*Tubacin has no impact on cell-growth at low concentrations-* Tubacin is a selective inhibitor of HDAC6 (IC<sub>50</sub> = 0.004 µM) described to have anti-proliferative properties on cancer-cells (Haggarty *et al*, 2003). We thus tested tubacin at various concentrations in parallel of nocodazol a known cell-cycle inhibitor through its effect on microtubules polymerization. We observed that at our 10 µM working concentration, tubacin had no impact on fibroblasts division. While nocodazol led to high cell proliferation inhibition and led to high cell mortality within 48 hours, higher tubacin concentrations (20-50 µM) had no impact on cell viability, but reduced cell proliferation rate. Tubacin at 10 µM led to similar cell growth profile than untreated fibroblasts (Figure1).

*Tubacin induces hyper-acetylation of  $\alpha$ -tubulin-* We showed that HDAC6 inhibition with 10 µM tubacin leads to targeted  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation in skin fibroblasts. Cells were grown in media supplemented with either DMSO or tubacin. In normal conditions (without tubacin), tubulin filament acetylation was discrete, with few traces of hyperacetylation. Alpha-tubulin hyperacetylation seems to be confined to the MTOC (Figure 2, top panel) near the nucleus. This hyperacetylation seems to be essential in cell-division, as shown in figure 2. Tubacin treatment leads to an increase of acetylation of  $\alpha$ -tubulin. Immunofluorescence with anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin shows hyperacetylation of the whole microtubules within 24h tubacin treatment at 10 µM. Data acquired through western-blot analysis of anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin showed that 24h-tubacin treatment induces hyper-acetylation of alpha-tubulin at low concentrations, 2 µM (data not shown) and 10µM on fibroblasts (control and DOA+) (Figure 2).

*Tubacin induces mitochondrial elongation both in control and DOA+ fibroblasts-* Prior studies had shown an impact of KDAC inhibitors on mitochondria morphology (Lee *et al*, 2012). However, the HDAC6 tubulin deacetylase activity selectivity was questioned. In this study we have therefore focused on tubacin, which was characterized as a specific HDAC6 tubulin deacetylase activity inhibitor. Cells were treated for 24h and 7 days with either 10µM tubacin or DMSO. While  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation occurs within 24h of tubacin treatment, image analysis of mitochondrial network show no impact of this hyperacetylation on mitochondria distribution and structure at 24 hours. Mitochondrial structure modification occurs only after 7days treatment (data not shown). Our data shows an elongation of mitochondrial network both in control fibroblasts and DOA+ fibroblasts (Figure 3, top panel). Mitochondrial network in DOA+ fibroblasts which is characterized by increased fission, regain connectivity following treatment with tubacin. The average length of 85% of the mitochondrial population harbouring *OPA1* mutations is less than 10µm. Treatment with tubacin, reverses this fragmented phenotype;



only 20% of the mitochondrial population measures less than 10 $\mu$ m. The increased mitochondrial fusion is a late stage response, as it takes places only 7 days after tubacin exposures.

*Mitochondria elongation in control and DOA+ fibroblasts is independent of tubacin-induced  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation-* Several studies have reported a preferential localization of mitochondria on acetylated microtubules (Friedman *et al*, 2012). Moreover, acetylation is a key regulator of mitochondrial functions. Decreased levels of acetylated alpha-tubulin and impaired mitochondrial dynamics, such as reduced motility and excessive fission, are associated to various neurodegenerative diseases (Guedes-Dias *et al*, 2015). KDAC inhibitors lead to mitochondrial elongation in cancer cell-lines and untransformed cell-lines (Lee *et al*, 2012). Our data shows a decrease of  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation after 7 days treatment; the initial burst of hyper-acetylation that was present within 24 hours is lost to discrete focal point of acetylation. This acetylation seems not to involve the whole microtubule-population, as was the case after a few hours exposure (Figure 3).

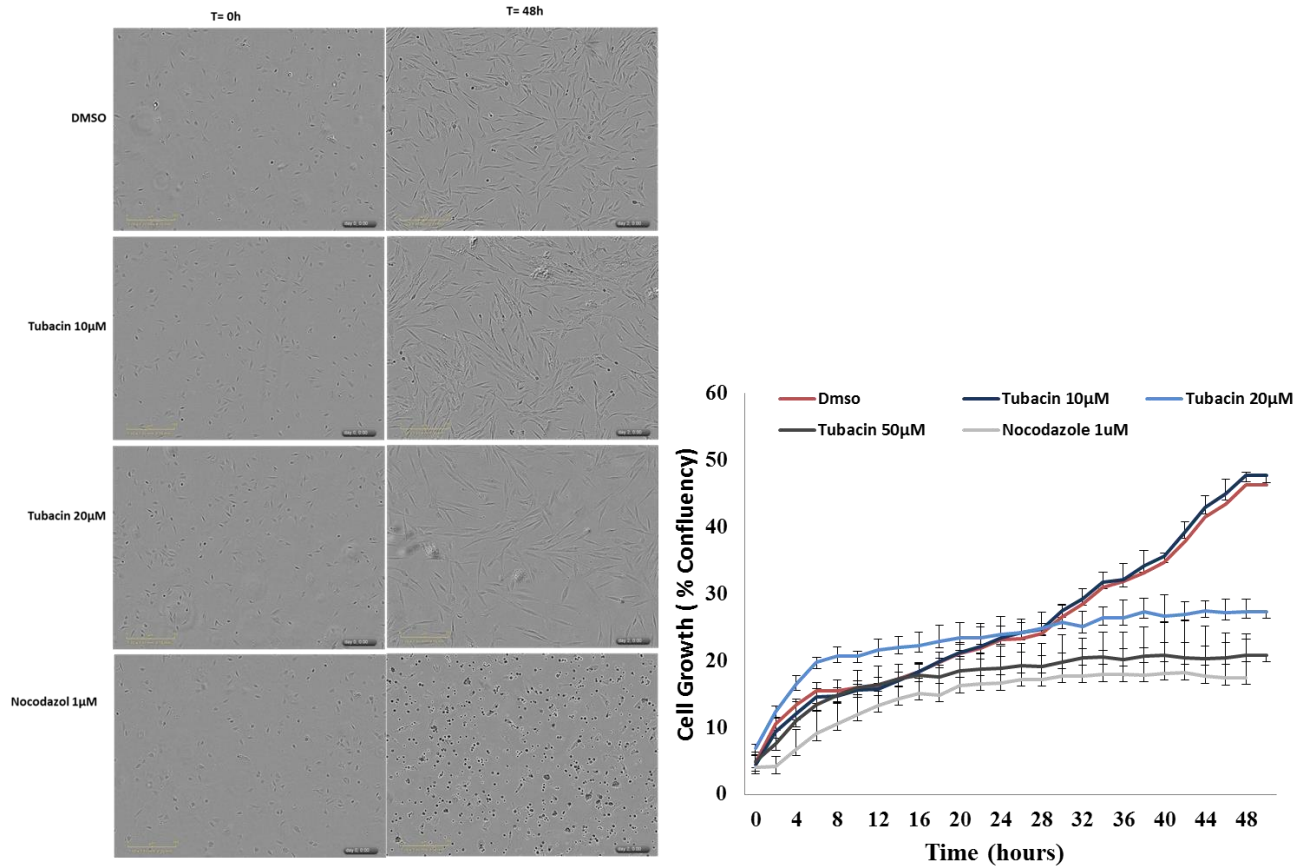
*Tubacin increases mitochondrial biogenesis-* Quantification mitochondrial mass using VDAC as a marker of mitochondria volume showed a 20% decrease of mitochondrial content in DOA+ fibroblasts, compared to controls (Figure 5). Treatment with 10  $\mu$ M-tubacin for 7 days led to mitochondrial mass and OXPHOS subunits expression increase both in control and DOA+ fibroblasts, consistent with image observations. Tubacin-treatment for 7 days led to 1.6 fold increase of VDAC expression in DOA+ patients and about 1.3 fold increase in control fibroblasts. OXPHOS chain complexes expression follow the same trend; NDUF8 expression which reflects complex I, is increased by 1.15 in control cells and 1.6 in DOA+ patients treated with tubacin. ATP5A, which reflect complex V expression, is higher in untreated DOA+ compared to untreated control fibroblasts. Treatment with tubacin lead increase of complex V content, but this latter is not significant. DOA+ patients' fibroblasts treatment with tubacin did not lead to complex IV increase, while this complex expression increases in control fibroblasts treated with tubacin (Figure 5). Mitochondrial biogenesis is further supported by an increase of mtDNA copy number (supplementary data).

*Tubacin improves mitochondrial respiration and reverses the energetic defect in DOA+ patients' fibroblasts-* Mitochondrial respiratory function was assessed in DOA+ and control fibroblasts with and without tubacin-treatment for 7 days. The oligomycin-insensitive respiration, i.e. independent of ATP-synthase, was 1.5 higher in DOA+ compared to control fibroblasts, indicating increased non-phosphorylating respiration in normal conditions (without treatment). These DOA+ fibroblasts showed a lower respiratory control ratio (RCR) compared control fibroblasts, indicating a mild

uncoupling. The RCRp showed that the respiration-related to ATP production was also higher in DOA+. And, as regard to the basal respiration, to reach such ATP production, DOA+ cells use a greater portion of their respiratory reserve capacity than do control fibroblasts, as reflected by the ratio of basal respiration to the FCCP-uncoupled respiration (R/FCCP) (Figure 6). Treatment with tubacin at 10  $\mu$ M for 7 days did not result in higher routine respiration compared to untreated DOA+ patients and untreated controls. However, the oligomycin-insensitive respiration is decreased, and the RCRp and the FCCP-uncoupled respiration, which were high in DOA+ under normal condition, also decrease in tubacin treatment. The respiration ratios are comparable to untreated control fibroblasts. Control fibroblasts treated with tubacin, show a slight increase of routine respiration and other respiration ratios, but these increases are moderate.

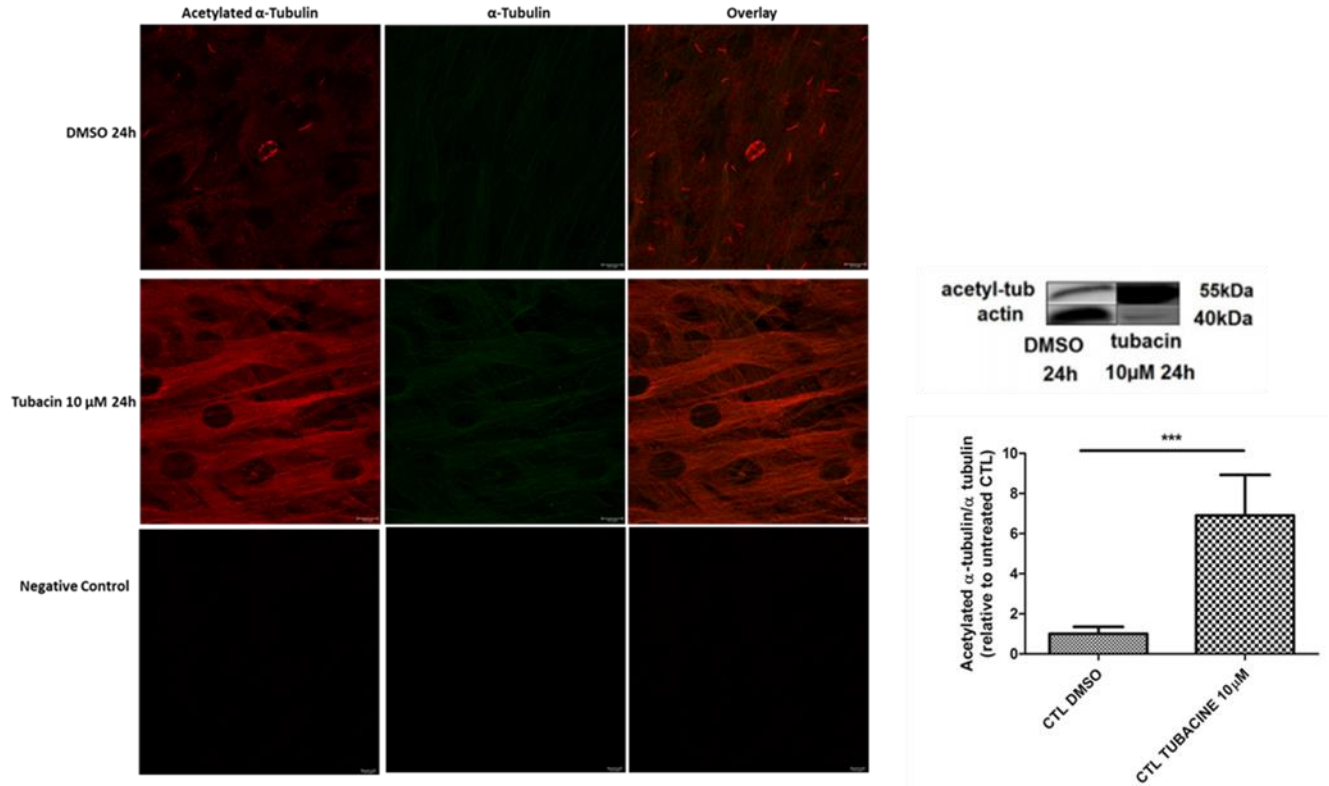
*Tubacin induced mitochondrial biogenesis and mitochondrial elongation is not through SIRT3-* Partial loss of tubulin-acetylation led us to investigate a possible increase of other KDACs in the process. Mitochondria fusion is under the control of OPA1, which is regulated by SIRT3. We therefore assessed both protein expressions in tubacin-treatment. Preliminary results on SIRT3 expression show that SIRT3 did not increase majorly following tubacin treatment and that it is unlikely that the moderate loss of  $\alpha$ -tubulin acetylation after 7days is mediated by this KDAC. Moreover, based on these preliminary results mitochondrial elongation cannot be attributed to an increased OPA1-GTPase activity mediated by increased SIRT3 level (Figure 7).

*Tubacin reduces autophagy flux-* Autophagy level was assessed by Western-blot analysis through LC3 and P62 expression, autophagy markers. In normal conditions, DOA+ patients' fibroblasts show a slightly higher LC3 conversion rate and lower P62 levels compared to control fibroblasts. When fibroblasts are treated with 10 $\mu$ M tubacin for 7 days, autophagy level decreases reflected by lower LC3II level and higher P62 level both in control and DOA+ fibroblasts (Figure 8).



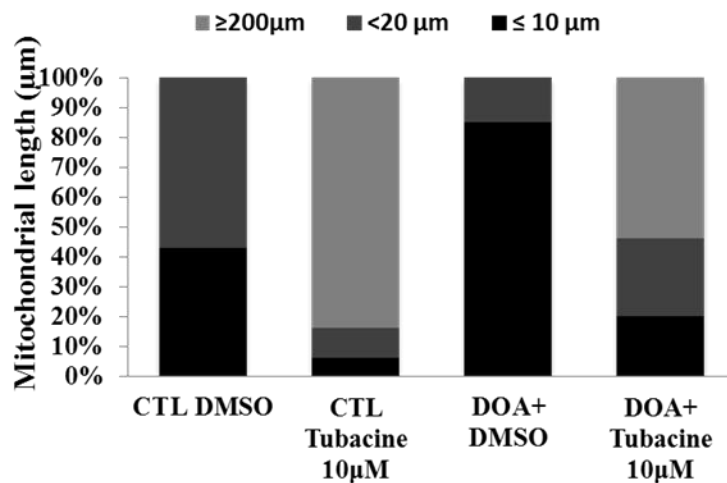
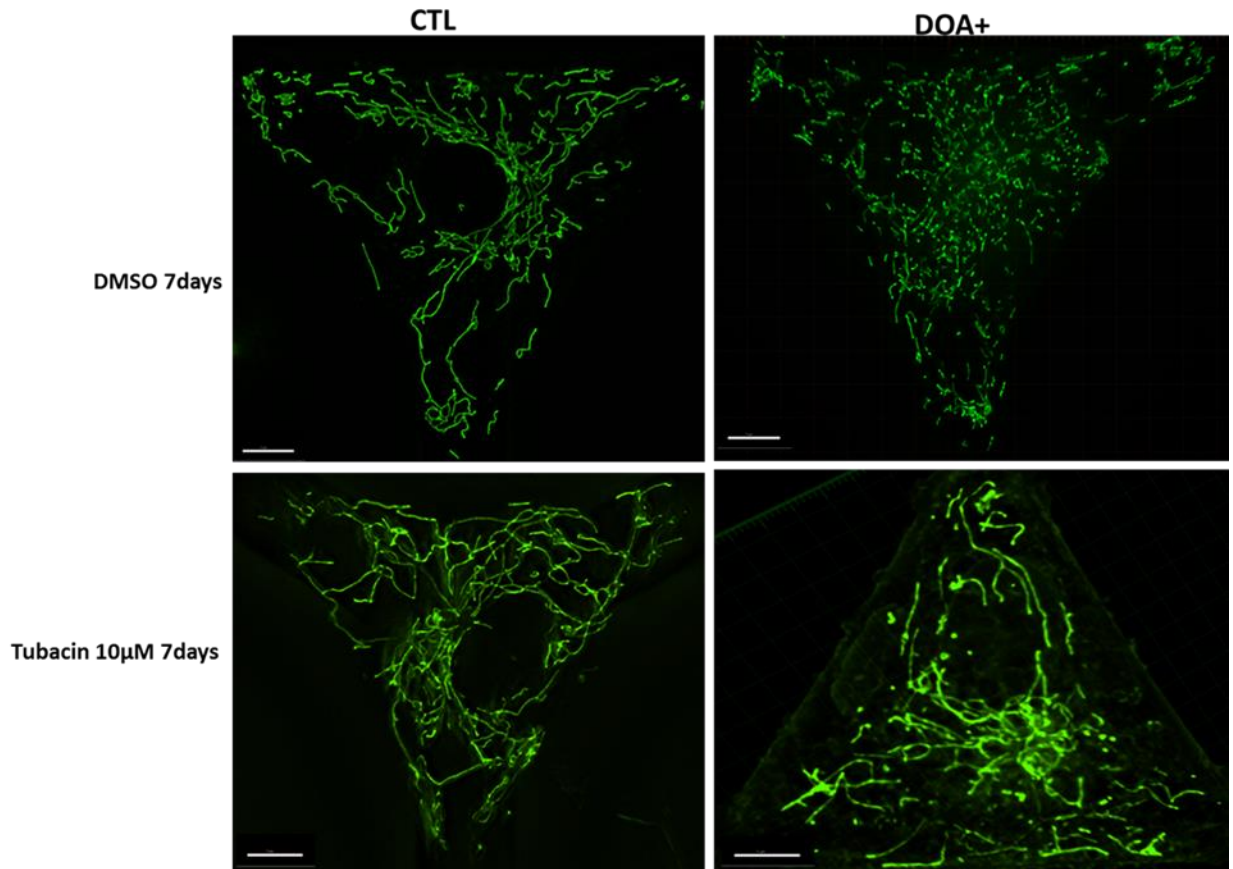
**Figure 1: Tubacin has no impact on cell growth at low concentrations**

Control fibroblasts were treated with different concentrations of Tubacin. Cell growth was monitored with IncuCyte ZOOM®. The graph represents automatically calculated cell-confluency at regular time points for 48 hours. High concentration Tubacin-treatment (20 µM and 50 µM) showed a marked cell growth reduction. Error bars indicate standard deviation.



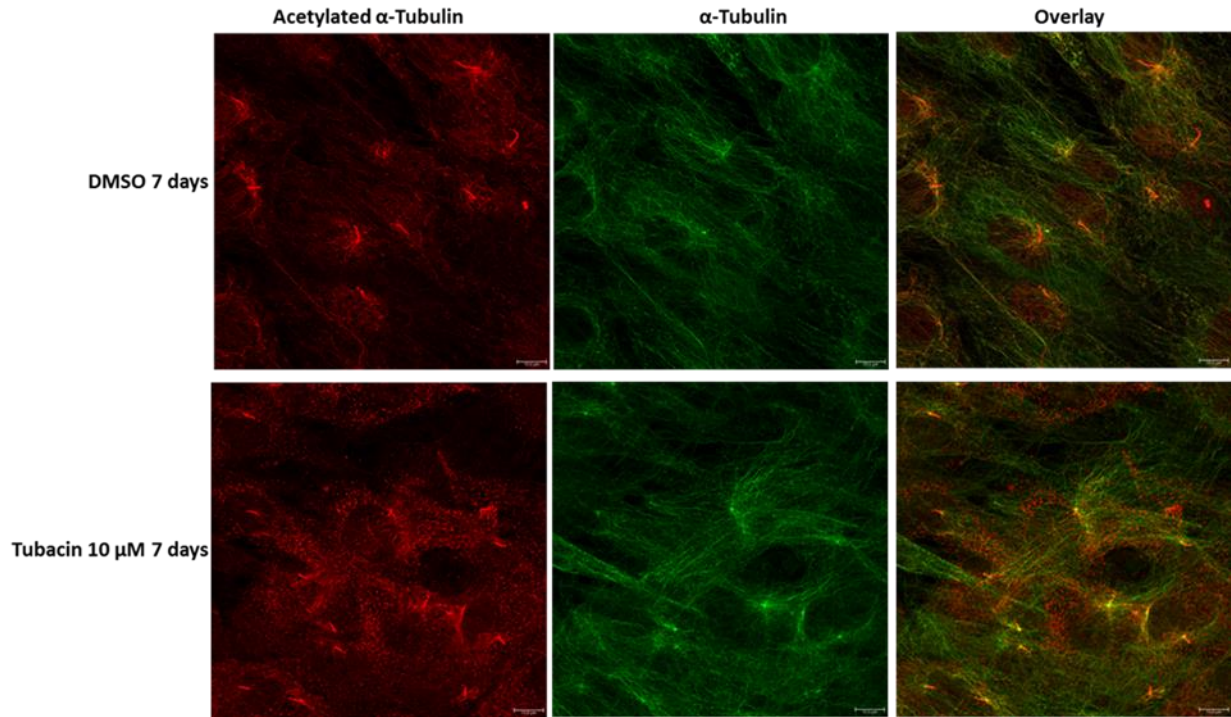
**Figure 2: Tubacin leads to  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation at low concentrations**

Control fibroblasts were treated with either DMSO or 10  $\mu$ M Tubacin for 24 hours. Images represent  $\alpha$ -tubulin acetylation detected by immunofluorescence with an anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin antibody (red) and  $\alpha$ -tubulin (green). Differences between cell lines and treatments were analyzed by Student-*t*-test: (\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).



**Figure 3: Tubacin induces mitochondrial network elongation**

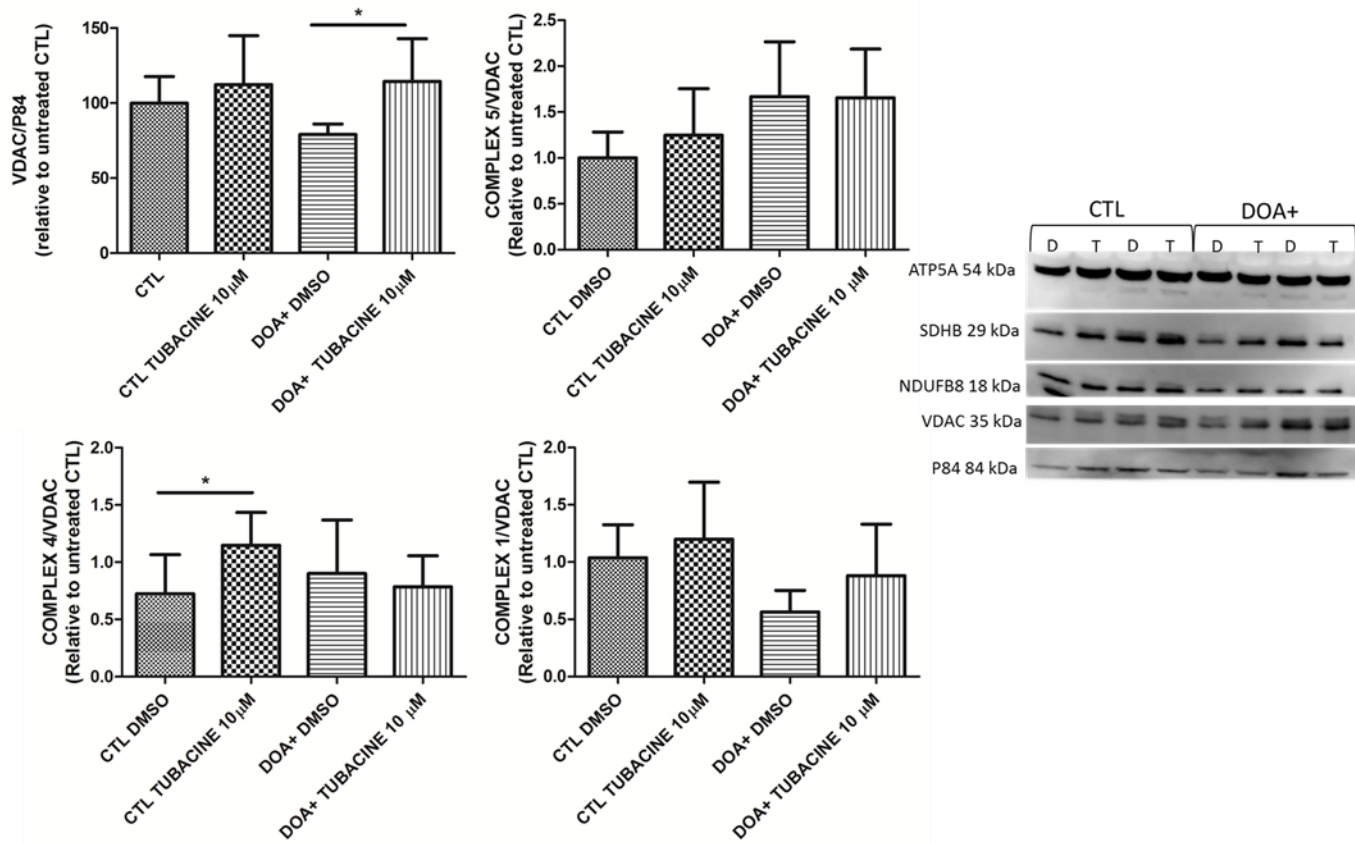
Mitochondrial network in Control (CTL, n=4), DOA+ (n=4). Cells were either treated with DMSO or 10µM Tubacin for 24h (data not shown) or 7 days. Mitochondrial networks were labelled with Mito-Tracker Green. Quantifications of mitochondrial lengths were performed by the standardization of cell size and shape using micropatterned coverslips. Data were inferred from a mean of 50 cell acquisitions from micropatterned slides. Scale Bar = 10 µm



**Figure 4: Mitochondria elongation is not correlated with  $\alpha$ -tubulin acetylation**

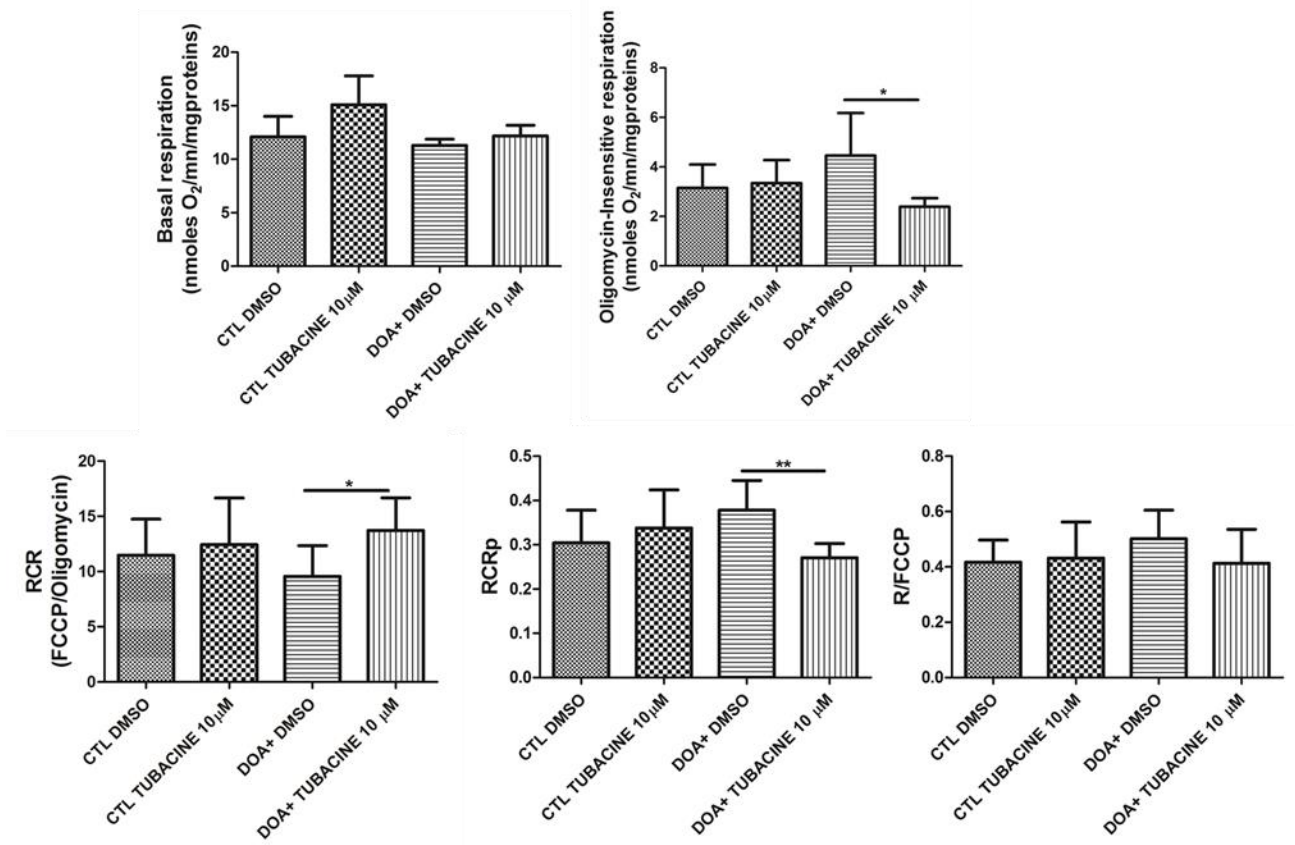
Control fibroblasts were treated with either DMSO or 10  $\mu$ M Tubacin for 7 days. Images represent  $\alpha$ -tubulin acetylation detected by immunofluorescence with an anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin antibody (red) and  $\alpha$ -tubulin (green).





### Figure 5: Tubacin increases mitochondrial mass and OXPHOS subunits expression

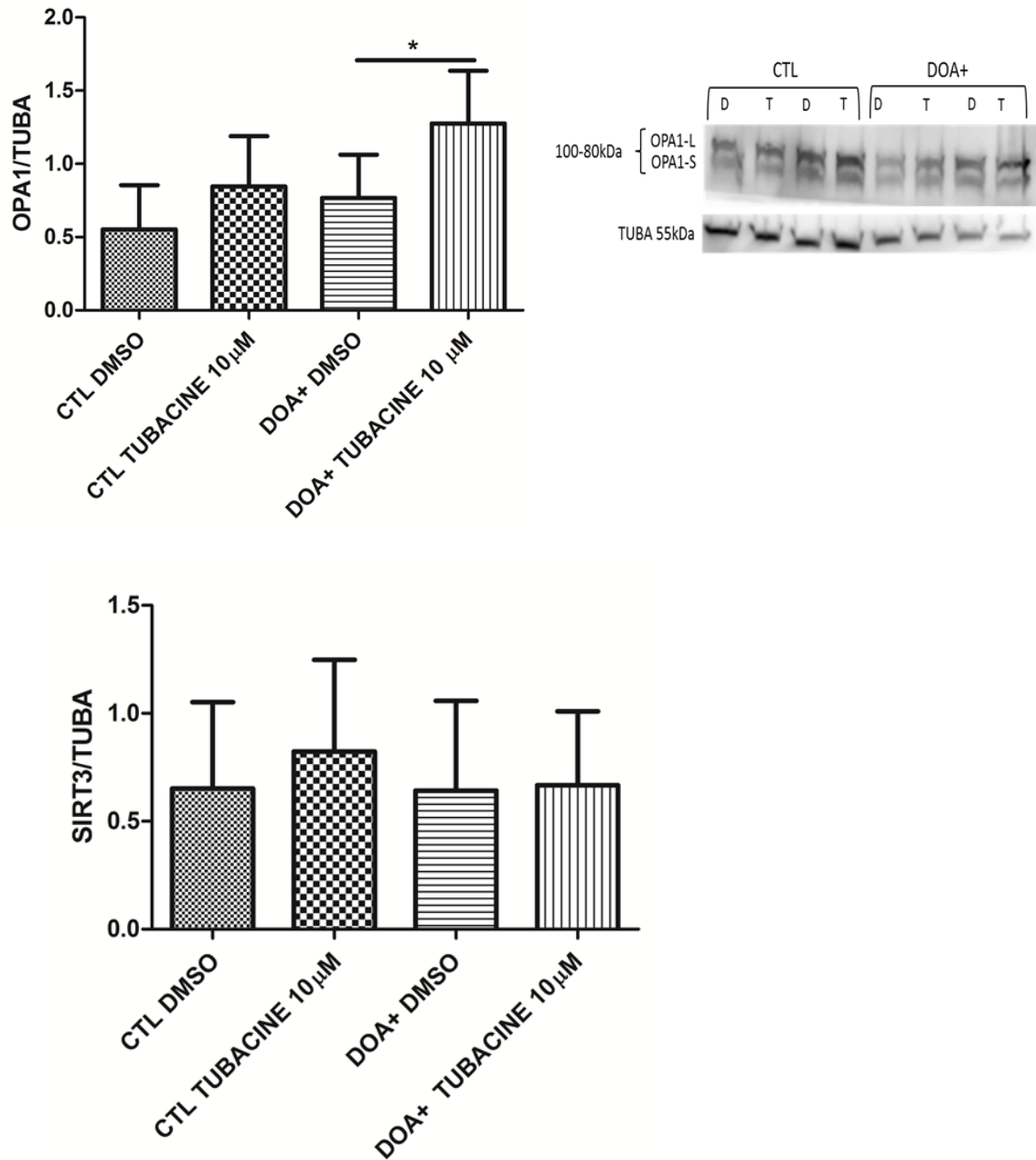
Western blot of respiratory chain subunits in Control (n=3), DOA+ (n=4). Cells were either treated with DMSO or 10 $\mu$ M Tubacin for 7days. Expressions of OXPHOS chain subunits were assessed. Data represented here are ATP5A from complex V, COXII from complex IV and NDUFB8 from complex I, which were normalized to VDAC, a mitochondrial marker. Mitochondria mass was also quantified as VDAC normalized to P84 a cytosolic protein marker. Data were collected from five independent experiments and results from treated samples are represented as percentage to untreated controls  $\pm$  SD. Differences between cell lines and treatments were analyzed by Student-*t*-test: (\*:  $p < 0.05$ ).



### Figure 6: Tubacin improves mitochondrial respiration and reverses the energetic impairment in DOA+ patients

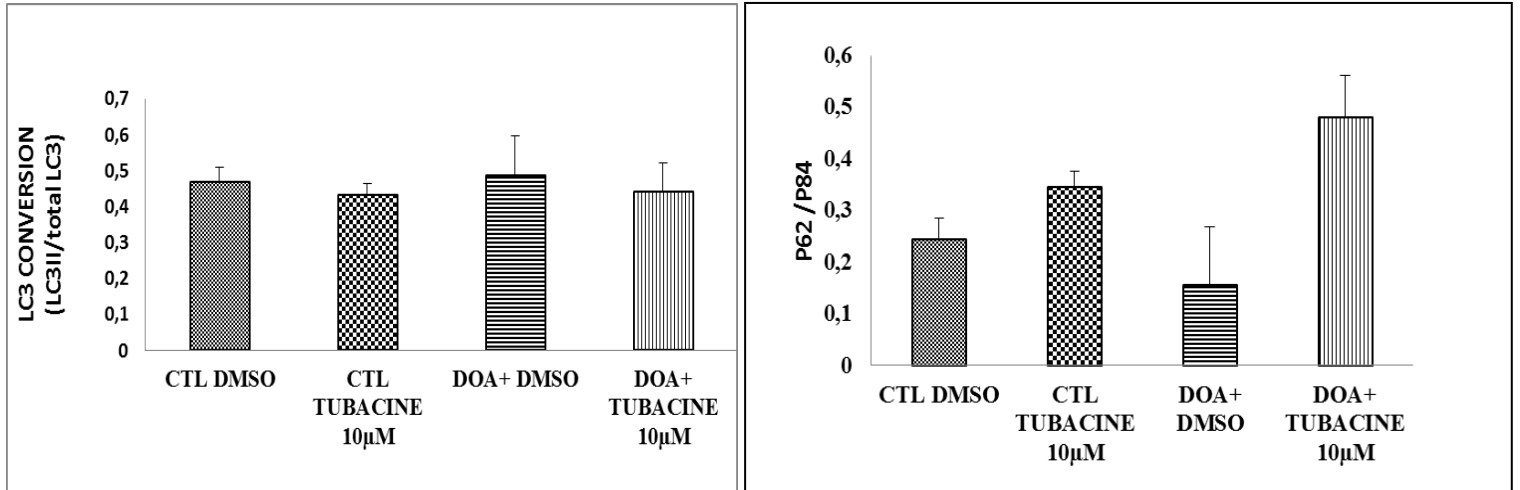
Mitochondrial oxidative phosphorylation were analyzed on control (CTL, n=4) and DOA+ fibroblasts (4 patients). Cells were either treated with DMSO or 10 μM Tubacin for 7 days. Oxygen consumption was measured under basal conditions (Basal respiration graph), in the presence of oligomycin (4 μg/ml) (oligomycin-insensitive respiration graph) and in the presence of FCCP (4mM). The respiratory control ratio (RCR graph) was calculated as the ratio of the FCCP-uncoupled to the oligomycin-insensitive respiration. Respiration coupled to ATP production (RCRp graph) was calculated as the ratio of the difference between the rates of basal and oligomycin-insensitive respiration to the uncoupled FCCP respiration. Respiratory reserve capacity was calculated as the ratio of basal respiration to the FCCP-uncoupled respiration (R/FCCP graph). Data were analyzed from six independent experiments and are presented as mean ± SD. Differences between cell lines were analyzed by Student-t-test: (\*: p < 0.05; \*\*: p<0.01).





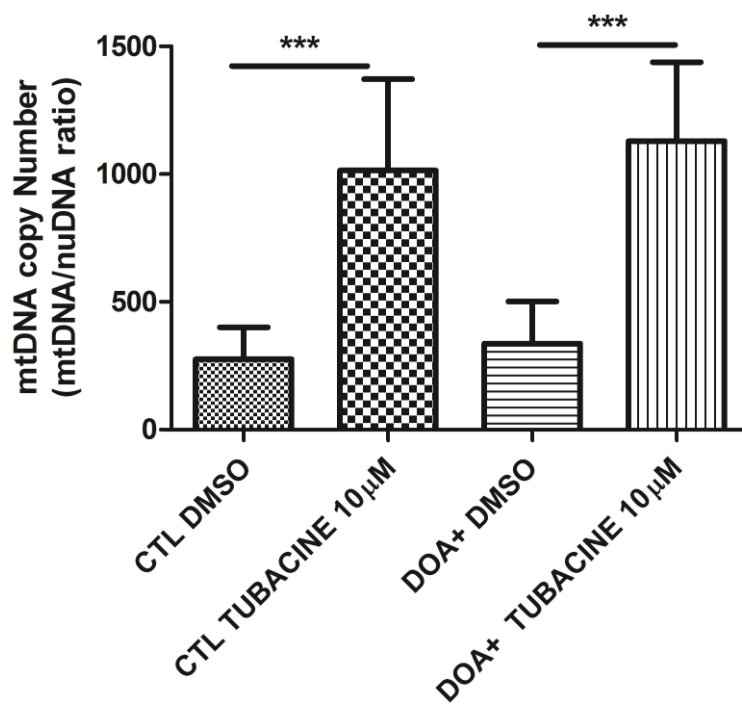
**Figure 7: Tubacin induced mitochondrial biogenesis and mitochondrial elongation is not through SIRT3**

Western blot of OPA1 expression and mitochondrial deacetylase SIRT3 in Control (n=3), DOA+ (n=4). Cells were either treated with DMSO or 10 $\mu$ M Tubacin for 7days. Expressions of OPA1 and SIRT3 were assessed. Data represented were normalized to TUBA ( $\alpha$ -tubulin) a cytosolic protein marker. Data were collected from (n=???) independent experiments and results from treated samples are represented as percentage to untreated controls  $\pm$  SD. Differences between cell lines and treatments were analyzed by Student-*t*-test: (\*: p < 0.05).



**Figure 8: Tubacin does not impact autophagy flux**

Western blot of autophagy in Control (n=3), DOA+ (n=4). Cells were either treated with DMSO or 10µM Tubacin for 7days. Autophagy was assessed as the conversion rate of LC3 and P62 expression. Data represented were normalized to P84 a cytosolic protein marker. Data were collected from (n=2) independent experiments and results from treated samples are represented as percentage to untreated controls ± SD. Differences between cell lines and treatments were analyzed by Student-*t*-test: (\*: p < 0.05).



**Supplementary: Tubacin increases mtDNA content**

Mitochondrial DNA copy number in Control (n=3), DOA+ (n=4). Cells were either treated with DMSO or 10µM Tubacin for 7days. mtDNA copy number were assessed by qPCR.. Data were collected from seven independent experiments and results from treated samples are represented as percentage to untreated controls ± SD. Differences between cell lines and treatments were analyzed by Student-*t*-test: (\*: p < 0.05).

## REFERENCES

- Burchell, V.S., Gandhi, S., Deas, E., Wood, N.W., Abramov, A.Y., and Plun-Favreau, H. (2010). Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: Part II. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 497–511.
- Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H., and Edelman, D.B. (2010). HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* *5*.
- Chevrollier, A., Cassereau, J., Ferré, M., Alban, J., Desquiret-Dumas, V., Gueguen, N., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., and Reynier, P. (2012). Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 980–988.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* *190*, 363–375.
- Guedes-Dias, P., and Oliveira, J.M.A. (2013). Lysine deacetylases and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1832*, 1345–1359.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y.-I., et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* *11*, 958–966.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzell, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 505–518.
- Landes, T., Emorine, L.J., Courilleau, D., Rojo, M., Belenguer, P., and Arnauné-Pelloquin, L. (2010). The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep.* *11*, 459–465.
- Lee, J.S., Yoon, Y.G., Yoo, S.H., Jeong, N.Y., Jeong, S.H., Lee, S.Y., Jung, D.-I., Jeong, S.-Y., and Yoo, Y.H. (2012). Histone deacetylase inhibitors induce mitochondrial elongation. *J. Cell. Physiol.* *227*, 2856–2869.
- Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., and Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* *7*, 46.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *191*, 1141–1158.
- Palmer, C.S., Elgass, K.D., Parton, R.G., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2013). Adaptor Proteins MiD49 and MiD51 Can Act Independently of Mff and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission. *J. Biol. Chem.* *288*, 27584–27593.
- Pareyson, D., Saveri, P., Sagnelli, A., and Piscoquito, G. (2015). Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci. Lett.*

- Samant, S.A., Zhang, H.J., Hong, Z., Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Wolfgeher, D., Archer, S.L., Chan, D.C., and Gupta, M.P. (2014). SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 807–819.
- Saxton, W.M., and Hollenbeck, P.J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* *125*, 2095–2104.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* *178*, 749–755.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*, 433–446.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlén, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U., and Nistér, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission: MIEF1, a key regulator of mitochondrial dynamics. *EMBO J.* *30*, 2762–2778.

## Discussion

L'altération de la dynamique mitochondriale, y compris une fragmentation mitochondriale excessive ont été suggérées comme prenant part dans le processus initial de la pathophysiologie dans plusieurs maladies neurodégénératives. Un défi notable est d'identifier des stratégies pharmacologiques pour contrer la fragmentation excessive du réseau mitochondrial dans ces pathologies. HDAC6 est une histone déacétylase cytosolique présentant une activité déacétylase  $\alpha$ -tubuline dépendante et une activité de liaison à l'ubiquitine. Dans les cellules neuronales et fibroblastiques humaines, le cytosquelette, spécifiquement les microtubules régulent la distribution et la biogenèse mitochondriale. Par ailleurs d'autres études ont montré une localisation préférentielle des mitochondries sur les microtubules acétylés. Sur la base de toutes ces constatations, nous avons émis l'hypothèse qu'une modulation de l'acétylation des microtubules conduirait à une distribution et une biogenèse accrue des mitochondries dans les fibroblastes de patients mutés sur le gène *OPA1*. Nous avons donc choisi de cibler HDAC6 et d'inhiber son activité  $\alpha$ -tubuline déacétylase en utilisant la tubacine. La tubacine a été initialement utilisée par Haggarty et al. où elle est décrite comme ayant une activité inhibitrice sélective sur HDAC6 et particulièrement le domaine  $\alpha$ -tubuline déacétylase avec une  $IC_{50}$  de  $0.004 \mu M$  (Haggarty et al. 2003). Nos résultats montrent que l'hyperacétylation des microtubules améliore le phénotype des cellules de patients DOA+. Cette modification semble être médiée par l'inhibition de HDAC6. Dans nos modèles cellulaires *OPA1* muté, l'inhibition de HDAC6 :

- restaure la connectivité de réseau mitochondrial
- stimule la biogénèse mitochondriale
- corrige le défaut de couplage mitochondrial des cellules DOA+

Nos résultats montrent que même si l'effet de la tubacine sur l'acétylation des microtubules est immédiat (traitement de 24h), l'élongation du réseau mitochondrial n'arrive que très tardivement, 7 jours plus tard. Ces données suggèrent donc un mécanisme secondaire ou indirect à l'hyperacétylation des

microtubules sur la modulation du réseau mitochondrial dans le cas des mutations *OPA1*. Les résultats d'immunofluorescence de la tubuline acétylée montrent une diminution de l'hyperacétylation initiale, même si celle-ci reste présente 7 jours après le traitement tubacine, nous confortant dans l'hypothèse que l'hyperacétylation seule ne suffit pas à induire cette réponse mitochondriale. La diminution de l'acétylation suggère un mécanisme de compensation mis en place par la cellule pour palier à l'inhibition de HDAC6. Nos données montrent également une augmentation de la biogénèse mitochondriale et une augmentation de la fusion mitochondriale. Ces données couplées à la baisse de l'acétylation observée à 7 jours de traitement suggèrent une implication des sirtuines. En effet, des études ont montré une augmentation de l'activité d'OPA1 suite à son acétylation par SIRT3 (Samant et al. 2014). Nos données préliminaires par Western blot ne montrent pas d'augmentation significative de l'expression de SIRT3. L'expression d'OPA1 semble augmenter très légèrement, mais compte tenu de l'augmentation significative de la masse mitochondriale consécutive au traitement tubacine, cette augmentation est à prendre avec précaution. Des études sur les autres inhibiteurs de HDAC montrent une élongation du réseau mitochondrial due à une diminution de l'expression de FIS1 et donc une diminution de l'activité de fission médié par DRP1 (J. S. Lee et al. 2012). Cette diminution de l'expression de FIS1 serait due à une augmentation de l'acétylation des histones nucléaires et non d'une hyperacétylation sélective des microtubules. Une étude plus récente sur l'inhibition de HDAC6 avec la tubastatin A, montrent également une augmentation de la fusion mitochondriale dans les neurones corticaux, néanmoins contrairement à l'étude de Lee et al., cette étude ne montre aucune modification de l'expression des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale (Guedes-Dias et al. 2015). Au regard de nos données, nous émettons l'hypothèse que dans nos lignées de fibroblastes DOA+, la dynamique de fission est plus importante que la fusion et que le traitement tubacine inhiberait cette fission. En effet, le traitement tubacine inhibe la fission médiée par les traitements CCCP (données préliminaires), suggérant que la tubacine inhibe la machinerie de fission. Des études récentes ont impliqué d'autres acteurs dans la

fission mitochondriale dont la F-actine (Li et al. 2015). L'assemblage et la polymérisation de la F-actine et son rôle dans la fission sont régulés par la cortactine (OMIM \*164765). Or des études montrent que les KDACS, outre les histones et l'alpha-tubuline, régulent également d'autres protéines cellulaires parmi lesquelles, la cortactine. Il a ainsi été montré que HDAC6 est capable de se lier à la cortactine. La surexpression de HDAC6 conduit à une hypoacétylation de la cortactine, alors que l'inhibition de l'activité de HDAC6 conduit à une hyperacétylation de la cortactine (X. Zhang et al. 2007). Nous émettons donc l'hypothèse selon laquelle HDAC6 modulerait la dynamique mitochondriale en modifiant l'état d'acétylation de la cortactine modifiant ainsi sa liaison à la F-actine.



# *Conclusion générale et perspectives*

Les pathologies mitochondriales regroupent un ensemble de phénotypes cliniques complexes et des origines génétiques multiples. Les maladies de la dynamique mitochondriale associées aux mutations des gènes nucléaires tels que *MFN2* et *OPA1* soulèvent la question de la relation entre la structure et la fonction des mitochondries au sein des tissus.

Les mutations *OPA1* ont été associées à l'atrophie optique autosomique dominante. L'ADOA est une maladie neurologique causée par des mutations du gène *OPA1*, qui affectent les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) dont les axones forment le nerf optique. La dégénérescence de ces CGRS conduit à une diminution de l'acuité visuelle voir une cécité. Depuis une décennie, le tableau clinique des mutations *OPA1* a énormément évolué comptant maintenant les cas sévères des syndromes DOA+, le syndrome de Behr, un syndrome de Parkinson et une démence (Amati-Bonneau et al. 2008; Bonneau et al. 2014; Carelli et al. 2015).

Alors que l'haploinsuffisance est considérée comme le principal mécanisme pathogénique dans l'ADOA, l'effet dominant négatif contribue également à la pathogenèse. Les anomalies du réseau mitochondrial, le déficit bioénergétique, la sensibilité à l'apoptose, une instabilité du génome mitochondrial ont tous été proposés comme causes possibles de la neurodégénérescence dans l'ADOA (Landes et al. 2010).

Les études sur les maladies neurodégénératives communes telles que la maladie de Parkinson montrent que la mort des neurones est entre autre induite par un défaut de la voie autophagique. Ce serait ce critère et particulièrement un défaut machinerie de contrôle qualité des mitochondries qui expliquerait la progression de la maladie. La morphologie des mitochondries détermine la réponse cellulaire à la macroautophagie. Les mitochondries tubulaires sont épargnées par la dégradation autophagique. Ces mitochondries possèdent plus de crêtes, les niveaux de dimérisation et l'activité de l'ATP synthase sont augmentés pour maintenir la production d'ATP. Inversement, lorsque la fusion et donc la formation de mitochondries tubulaires sont génétiquement ou pharmacologiquement bloquées,

les mitochondries consomment l'ATP, précipitant ainsi la mort des cellules. Les MEFs *Opa1*<sup>-/-</sup> présentent donc une sensibilité accrue à l'apoptose lors d'une privation en nutriments, car l'absence de fusion ne les protège plus de la dégradation (Gomes, Di Benedetto, et Scorrano 2011). La dégradation excessive des mitochondries aboutirait à une déplétion de la population et une mort des cellules due au déficit énergétique. Une augmentation du niveau de l'autophagie a été observée dans les CGRs dans le modèle de souris *Opa1* (Sarzi et al. 2012). De plus des études ont montré que les mitochondries ciblées par la machinerie de dégradation avaient un  $\Delta\psi_m$  réduit et une diminution des niveaux d'*OPA1*. Ces études avec le caractère progressif de la maladie suggèrent qu'un défaut d'autophagie serait le mécanisme physiopathologique dans l'ADOA. En effet, les premiers signes cliniques apparaissent dans l'enfance compliqués progressivement dans les cas syndromiques par une atteinte neuromusculaire. Dans le cas de la DOA+, la présence de délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle suggère que les défauts d'ADNmt secondaires contribuent dans le déclenchement des dysfonctionnements multisystémiques. Même si les modèles *OPA1*<sup>-/-</sup> montrent un défaut de fusion, des déficits énergétiques dus à une absence de la respiration mitochondriale, une apoptose accrue, les mutations *OPA1* chez les patients présentent des altérations moins drastiques, suggérant que ce serait l'accumulation des défauts qui mènerait à la dégénération neuronale.

Nous avons donc exploré deux pistes physiopathologiques de l'ADOA qui seraient en accord avec l'aspect progressif de la maladie. La première était d'étudier l'impact des mutations *OPA1* sur l'ADNmt, sachant que la protéine OPA1 est impliquée dans l'ancrage des nucléoïdes à la membrane interne et que cette membrane interne mitochondriale semble être le siège de la réplication de l'ADNmt (Elachouri et al. 2011; Rajala et al. 2014; Gerhold et al. 2015). L'autre question adressée était de déterminer les conséquences des mutations *OPA1* sur la dégradation des mitochondries.

## L'impact des mutations *OPA1* sur l'ADNmt

Nous avons étudié l'impact des mutations *OPA1* sur la taille, le nombre et la distribution des nucléoïdes. Il existe une grande hétérogénéité génétique, les mutations *OPA1* touchant différents domaines de la protéine avec une altération plus ou moins importante des fonctions d'*OPA1*. Nous avons donc utilisé des lignées de fibroblastes de patients qui ne présentent soit aucun impact sur le réseau mitochondrial soit un réseau mitochondrial hyper-fragmenté et un modèle KO d'*OPA1*, les MEFs *opa1*<sup>-/-</sup>.

Nous avons développé une approche de standardisation de la taille des cellules pour faciliter la quantification des nucléoïdes par cellule d'abord dans des cellules contrôles ensuite dans les modèles de mutations ou de déplétion d'*OPA1*.

Nos résultats montrent un lien entre la taille des cellules, le réseau mitochondrial et le nombre de nucléoïdes. En effet, le nombre de nucléoïdes augmente avec la taille du réseau mitochondrial qui elle-même est proportionnelle à la taille des cellules.

Nous avons démontré cette relation d'abord en utilisant différents types cellulaires, ensuite en utilisant une approche de standardisation de la taille des cellules. Avec cette technologie, nous avons été en mesure de moduler la taille du cytoplasme des fibroblastes, et avons confirmé cette relation entre la taille des organelles et la taille du cytoplasme, en nous affranchissant des spécificités des types cellulaires, telles que le métabolisme énergétique par exemple. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la dynamique des nucléoïdes est régie par la dynamique mitochondriale et pourraient être provoqués par la croissance de la membrane et la plasticité membranaire.

Plusieurs études ont démontré avec des modèles mathématiques que la taille du cytoplasme régule la taille des organelles qu'il contenait (Hara et Kimura 2011; Chan et Marshall 2010).

La quantification de l'ADNmt par qPCR dans les lignées *OPA1* ne montre aucune variation de la quantité d'ADNmt alors que la déplétion d'*OPA1* dans les MEFs entraîne une réduction d'environ 50% du nombre de copies d'ADNmt. Nous avons

montré une baisse du nombre de nucléoïdes qui est corrélée à la baisse du volume mitochondrial constatée dans les lignées où la mutation ou la déplétion d'*OPA1* impactait le réseau mitochondrial. Nos données de qPCR rapportées au nombre de nucléoïdes par cellule montrent une augmentation du nombre de copies d'ADNmt par nucléoïde uniquement dans les modèles où la réticulation du réseau mitochondrial était impactée.

Dans un modèle normale, la distribution et l'organisation des nucléoïdes est dépendant du remodelage mitochondrial de par leur ancrage à la MIM. Cet ancrage et la structure des crêtes limitent la sphère d'influence des nucléoïdes. Plusieurs études montrent qu'il faudrait plusieurs cycles de fusion et de fission répétitifs pour un échange des protéines de la membrane interne, et le suivi de TFAM montre que cette diffusion est encore plus limitée dans le nucléoïde (Busch et al. 2014).

Selon le modèle actuel et les données de super-résolution, il existerait une seule molécule d'ADNmt par nucléoïde, suggérant donc qu'une mutation dans cet ADNmt résulterait en un défaut du système OXPHOS et donc une dégradation sélective de cette portion de mitochondrie. Or, dans le cas des syndromes DOA *plus*, les mutations d'*OPA1* se traduisent par l'accumulation de délétions multiples de l'ADNmt dans le muscle (Amati-Bonneau et al. 2008). Ces observations suggèrent donc que la machinerie de contrôle qualité est incapable de discriminer sélectivement les molécules d'ADNmt mutées de l'ADNmt sauvage. La dégradation sélective repose sur une dépolarisation d'une portion de la mitochondrie due à la présence d'ADNmt mutant. Or dans les cellules de patients, les mitochondries présentent un potentiel de membrane assez hétérogène, rendant cette dégradation sélective des mutants presque impossible. Cette hétérogénéité peut être expliquée par :

- Soit un échange de molécules d'ADNmt par la fusion des mitochondries
- Soit par la coexistence de plusieurs molécules d'ADNmt par nucléoïde

Nos données supportent la coexistence de plusieurs copies d'ADNmt par nucléoïde chez les mutants *OPA1*. Nous n'excluons pas des phénomènes de fusion chez les

patients mutés dans le gène *OPA1* caractérisés par une hyper-fragmentation du réseau mitochondrial, même si l'hypothèse commune serait que l'absence de fusion serait à l'origine des délétions de l'ADNmt et l'accumulation de mutations sur celui-ci (Chen et al. 2007). Nous suggérons qu'il existe des phénomènes de fusion, mais que ces fusions sont soit transitoires, soit ralenties. Contrairement aux études qui suggèrent un avantage de réplication de l'ADNmt mutant, nous pensons que l'existence d'un nucléoïde multi-génomique est surtout due à la diminution de la fusion qui ne permet pas un plus large échange des molécules d'ADNmt.

Afin de répondre à cette question, il serait intéressant d'évaluer les taux d'échange intra et inter-mitochondrial des molécules d'ADNmt par la super-résolution dans les mutations *OPA1*. Ces tests de fusion mitochondriale permettront de déterminer le taux et la vitesse des événements de fusion dans les mutations *OPA1* et les conséquences de ces changements de dynamique sur la distribution de l'ADNmt.

L'hétérogénéité du contenu d'ADNmt a été soulevée par plusieurs études comme étant le mécanisme qui empêcherait une dégradation sélective et efficace des mitochondries ayant des molécules d'ADNmt muté et donc potentiellement une atteinte de la phosphorylation oxydative (Busch et al. 2014). Nous avons voulu étudier la dégradation sélective des mitochondries dans différentes mutations *OPA1*.

### **L'impact des mutations *OPA1* sur la réponse autophagique**

Jusqu'à présent, la physiopathologie de l'ADOA a été attribuée alternativement à l'altération de la structure du réseau mitochondrial et ensuite aux défauts énergétiques (Chevrollier et al. 2008; Mayorov et al. 2008; A. M. Bertholet et al. 2016). Pourtant, l'analyse collective des différentes mutations réfute la possibilité que l'ADOA découle uniquement du rôle d'*OPA1* sur la fusion mitochondriale, parce qu'il n'y a pas de lien entre la sévérité de la maladie et la fragmentation de réseau mitochondrial. Plusieurs publications ont suggéré que les mutations *OPA1* altèrent le mécanisme de contrôle-qualité des mitochondries, ce qui rend les cellules plus sensibles aux facteurs de stress, en particuliers les cellules ganglionnaires de la rétine (Alavi and Fuhrmann 2013; White et al. 2009; H. Chen et al. 2010). Une

accumulation de vésicules autophagosomales a été relevée dans ces études ; néanmoins que cette accumulation soit due à un défaut des étapes finales de la dégradation autophagique ou simplement une augmentation de la réponse autophagique n'a pas été abordée. Nous avons étudié cette réponse autophagique dans deux syndromes multi-systémiques dus à *OPA1* : le syndrome DOA *plus* et le syndrome Behr qui se distinguent par la présentation clinique et l'âge d'apparition des symptômes.

Notre travail d'exploration de la dynamique de la mitophagie et l'autophagie dans des modèles cellulaires a montré une corrélation entre un défaut de couplage, une fragmentation du réseau mitochondrial et une stimulation des processus de dégradation. La dégradation mitochondriale était augmentée chez les patients DOA *plus* en réponse à un réseau mitochondrial très fragmenté et un défaut de couplage de la phosphorylation oxydative. En revanche, les fibroblastes Behr n'ont montré aucune altération des fonctions mitochondriales quantifiables; cependant le taux de dégradation mitochondriale est sévèrement réduit. Les patients Behr sont également caractérisés par une accumulation de P62, or la neurodégénérescence peut être provoquée, selon différentes hypothèses, par l'accumulation des inclusions-p62 (Rusten et Stenmark 2010; Kirkin et al. 2009; Wooten et al. 2008; Komatsu et al. 2007; Nakaso et al. 2004; Kuusisto, Suuronen, et Salminen 2001).

Nos données suggèrent donc que le défaut de couplage mitochondrial pourrait permettre de stimuler un certain temps les voies autophagiques et ainsi favorisait le maintien d'une population mitochondriale fonctionnelle. Dans ces cellules mutées dans le gène *OPA1*, le défaut de couplage serait protecteur, en accord avec les débuts plus tardifs de la maladie chez les patients DOA+ comparés aux patients présentant le syndrome de Behr. Les effets potentiellement bénéfiques d'un découplage partiel sur les différentes fonctions cellulaires ont d'abord été soulevés par Skulachev dans les années 90, puis reconfirmés par différents essais thérapeutiques sur l'ischémie-reperfusion et les maladies neurodégénératives (Skulachev 1997; Mattiasson et al. 2003; Pandya, Pauly, et Sullivan 2009).

Notre étude bibliographique sur le CCCP renforce le lien entre le découplage et l'activation des voies anti-apoptotiques. Nous suggérons que certaines mutations *OPA1* caractérisées par effet dominant-négatif et un défaut de couplage présentent une expression similaire des voies de signalisation que lors d'un découplage transitoire par le CCCP, à savoir une activation des voies de la glycolyse, un remodelage mitochondrial, une inhibition de l'apoptose et une activation de l'autophagie (voir revue).

Une question que soulève cette étude est l'origine du défaut de couplage associé à certaines mutations *OPA1*. La fuite de protons est associée à une modification de la conductance des membranes qui elle-même dépend de la composition de la membrane. Des études sur différentes mutations *OPA1* montrent qu'elles présentent des défauts sélectifs dans plusieurs activités, y compris l'association aux cardiolipines (Ban et al. 2010). Nous suggérons donc que les mutations *OPA1* induisant un défaut de couplage modifient la composition des membranes, en particulier les cardiolipines. Il serait intéressant, par des approches lipidomiques, d'étudier l'impact de différentes mutations *OPA1* sur la composition lipidique des membranes.

Une autre hypothèse serait que la densité accrue des crêtes chez les mutations *OPA1* due à une augmentation du complexe V serait derrière la fuite des protons. Nous avons montré une augmentation des complexes de la chaîne respiratoire, celle-ci étant significative pour le complexe V. L'ATP-synthase mitochondriale F1-F0-ATP, joue un rôle dans la stabilisation des crêtes, leur surexpression permettant la formation de crêtes tubulaires (Kucharczyk et al. 2009; Bannwarth et al. 2014). L'expression accrue du complexe V pourrait-elle contrer la désorganisation des crêtes observée dans plusieurs mutations *OPA1*? Il semblerait, qu'effectivement, dans ces mutations *OPA1*, il y aurait plutôt une augmentation de la densité des crêtes, en cohérence avec les données précédentes sur un modèle murin d'atrophie optique. Ils ont constaté que le nombre de mitochondries opaques chez les souris mutantes augmentait à 6 et 24 mois pour satisfaire les besoins en énergie des axones (White *et al*, 2009). Les oligomères d'*OPA1* régulent l'ATP synthase qui



modifie la structure des crêtes, cette propriété d'OPA1 est indépendante de son activité de fusion et de son activité GTPase (Patten et al. 2014). L'altération de la structure de l'ATP-synthase conduit à la fission du réseau mitochondrial et la désorganisation ultra-structurelle mitochondriale (Johann Habersetzer et al. 2013). Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une surexpression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur l'efficacité du rendement énergétique. Une augmentation de la densité des complexes de la chaîne respiratoire par unité mitochondriale n'impacterait-elle pas la structure et la conductance de la membrane interne mitochondriale ?

Même si le syndrome de Behr a été inclus dans un spectre plus large qui est le syndrome DOA *plus* lié à *OPA1*, nos données recueillies tout au long de ce travail montrent que ce syndrome reste une entité à part entière et que les mécanismes physiopathologiques sont différents dans les différentes pathologies liées à *OPA1*. L'altération de la structure du réseau mitochondrial et de la fonction bioénergétique seule n'explique pas les disparités. Nous avons montré une régulation différentielle des réponses autophagiques dans les syndromes de Behr et DOA *plus*, ce qui expliquerait la disparité et l'hétérogénéité des tableaux cliniques des pathologies liées aux mutations du gène *OPA1*. Nos données montrent une modification des réponses mitophagiques et autophagiques, laissant penser que les maladies associées à *OPA1* devraient être traitées comme les maladies neurodégénératives communes. Une meilleure compréhension de la fission mitochondriale et de la fusion, et des facteurs de régulation impliqués, peut conduire à des traitements et des remèdes améliorés pour ces maladies.

### **L'impact de l'inhibition sélective de HDAC6 sur la fonction mitochondriale des fibroblastes *OPA1*<sup>+/-</sup>**

La majorité des maladies neurodégénératives sont caractérisées par un défaut de la dynamique mitochondriale, avec une propension pour une hyper-activation de la fission (Guedes-Dias et al. 2015). Une partie de nos travaux consistait à développer différentes approches et outils pharmacologiques qui corrigeraient le phénotype

hyper-fragmenté du réseau mitochondrial dans les fibroblastes de patients DOA+. Nous avons donc mis en place différents protocoles dont l'inhibition de la déacétylation du cytosquelette par la tubacine. Nos résultats montrent que l'inhibition sélective d'HDAC6, une histone déacétylase, permet au niveau cellulaire de corriger les altérations des fonctions mitochondriales caractéristiques de certaines mutations *OPA1*, à savoir l'hyperfragmentation du réseau mitochondrial, la baisse de la masse mitochondriale et enfin dans les cas de syndrome DOA+, l'augmentation de la réponse autophagique. La tubacine induit donc une élongation des mitochondries, stimule la biogénèse mitochondriale et corrige le défaut de couplage observé chez les patients DOA+. Nos données montrent que même si la tubacine induit une hyperacétylation des microtubules, la modulation des fonctions mitochondriales ne serait pas une réponse directe à cette hyperacétylation de la tubuline- $\alpha$ . Le temps de réponse de plusieurs jours implique d'autres mécanismes dans la modulation des fonctions mitochondriales. La restauration de la connectivité du réseau mitochondrial est concomitante à l'amélioration de la fonction bioénergétique. Serait-il possible qu'un switch métabolique soit le mécanisme derrière la stimulation de la fusion? Il est difficile de déterminer la part de chaque paramètre dans cette réponse. Le délai dans la modulation des fonctions mitochondriales est en accord avec d'autres études qui ont été menés sur différentes pathologies mitochondriales telles que le MELAS où la restriction calorique est mise en place pour améliorer le phénotype clinique. Pour ces cellules de patients, les effets bénéfiques sur la fonction mitochondriale à savoir l'assemblage du complexe I, une amélioration de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production d'ATP n'intervient que très tardivement, environ 3 semaines après. Le délai de la réponse impliquerait soit une régulation transcriptionnelle, soit une sélection positive par mitophagie des mitochondries fonctionnellement compétitives. Dans le dernier cas, ceci implique que le traitement à la tubacine des fibroblastes de patients induirait une pression de sélection mettant ainsi en évidence les défauts fonctionnels des mitochondries et leur dégradation. Cette hypothèse est vérifiée dans la restriction calorique dans les modèles de

MELAS (Busch et al. 2014). Cependant dans le cas des fibroblastes de patients DOA+, nos données préliminaires suggèrent que la tubacine induit une diminution du flux autophagique, suggérant donc que le mécanisme de sélection par mitophagie semble peu probable. La diminution du flux autophagique après un traitement à la tubacine est en accord avec l'élongation des tubules mitochondriaux et la restauration du défaut de couplage partiel, qui dans nos travaux sont responsables de la l'hyperstimulation de la réponse autophagique.

Les traitements à la tubacine confortent notre hypothèse d'une dynamique de fission hyper-stimulée dans le syndrome DOA+. Nos travaux nous font penser que les mitochondries des cellules mutées pour le gène *OPA1* conservent une activité réduite de fusion, mais que la dynamique de fission est certainement plus rapide que celle de la fusion aboutissant au phénotype fragmenté qui caractérise la pathologie. La tubulation du réseau induite par la tubacine dans les mutations *OPA1* avec des mitochondries hyperfragmentées va dans le sens cette observation. Notre hypothèse est supportée par des études récentes qui impliquent la F-actine dans la fission médiée par DRP1 (Li et al. 2015). La F-actine est régulée par la cortactine, qui est elle-même régulée par HDAC6 (X. Zhang et al. 2007). Il est donc probable que la tubacine induise une hyperfusion du réseau mitochondrial en inhibant la régulation de la F-actine par la cortactine et donc inhiber le processus de fission. Il serait intéressant d'étudier la voie des Sirtuines, en particulier SIRT1 sachant que l'augmentation de la biogénèse mitochondriale induite par la tubacine résulte très certainement en une régulation des gènes de la biogénèse mitochondriale. Les inhibiteurs des KDACs ont été décrits dans la littérature pour leurs effets protecteurs dans les pathologies neurodégénératives. Nos données sur la tubacine en traitement sur les fibroblastes DOA+ suggèrent un effet bénéfique. Au niveau cellulaire, la tubacine apparaît comme un agent pharmacologique prometteur dans le traitement des pathologies liées à une hyper-fragmentation du réseau mitochondrial induite par des mutations *OPA1*. Des études *in vivo* sur des modèles murins *OPA1*<sup>+/-</sup> sont nécessaires pour déterminer le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le syndrome DOA+.

## DOA + OPA1 mutations

### Altérations mitochondriales

	Structure	Fonction	Renouvellement
Résultats	Diminution volume mitochondrial  Augmentation rapport ADNmt/nucléotide	Découplage OXPHOS	Stimulation des processus autophagiques

### Perspectives

Mesure par imagerie super-résolution et MET :

Colocalisation  
- OPA1/nucléotide  
- OPA1/ jonctions des crêtes

Mesure métabolomique

- Composition lipidique des membranes mitochondriales  
- ANT/UCP protéines découplantes

Mesure de l'ADNmt par NGS :  
augmentation de la sensibilité de détection des copies mutées de l'ADNmt

Etude des modèles de mutations OPA1

Etudes des voies de signalisation :  
- NRF2  
- Transglutamisase

**Figure 19 : Schéma synoptique de l'impact des mutations OPA1 dans le DOA+**

# *Fiches techniques*

## Fiche Technique n° 1 : Culture cellulaire

### Milieux et réactifs :

- DMEM-F12 (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, Paris, France)
- SVF (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, Paris, France)
- Amniomax® (Gibco, New York, USA)
- Trypsine-EDTA (Gibco, New York, USA)
- PBS (Eurobio, Paris, France)

### Culture des cellules :

Les fibroblastes cutanés sont cultivés à 37°C, en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu constitué de 2/3 de DMEM-F12 - 10% de SVF et 1/3 d'Amniomax®. Les fibroblastes sont entretenus dans un milieu supplémenté en 50µg/ml d'uridine et 100µg/ml de pyruvate.

### Récolte et utilisation des cellules :

Les travaux sont réalisés sur des cellules à 80% de confluence et à des passages inférieurs à 25 pour éviter les biais liés à la sénescence des cellules. Les cellules sont lavées par du tampon phosphate sans calcium ni magnésium (PBS) puis décollées avec de la trypsine 0,25 %-EDTA 0,02 %. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS - 5% SVF puis centrifugées 5 minutes à 900 rpm. Les cellules sont alors congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C.

## Fiche technique n° 2 : Dosage des protéines par spectrophotométrie

Ce dosage est un dosage colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (Lowry *et al*, 1951).

Il est réalisé à l'aide du kit BC Assay® (Interchim, Montluçon, France).

### Réactifs :

- Solution d'acide bicinchoninique (solution A)
- Solution de sulfate de cuivre (solution B)
- Solution de BSA (Bovine serum albumine) à 1mg/ml

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

### Technique :

- Préparation de la gamme étalon de BSA

Une gamme étalon est préparée à partir de la solution de BSA à 1mg/ml (0,125mg/ml ; 0,250mg/ml ; 0,5mg).

- Préparation des réactifs

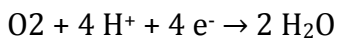
La solution B est diluée au 50<sup>ème</sup> dans la solution A

- Préparation des échantillons

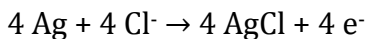
Les culots cellulaires sont repris dans du NaCl de manière à ce que les valeurs soient comprises dans la gamme étalon. 200µl des réactifs (A+B) sont ajoutés à chaque puits. La plaque est alors incubée 30 min à 37°C avant d'être lue au spectrophotomètre à 562 nm.

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

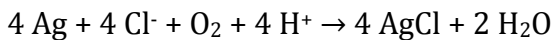
Cette technique consiste à mesurer la vitesse de consommation d'oxygène de cellules intactes dans différents états métaboliques (Hütter *et al*, 2004). Les cellules utilisent leurs substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour alimenter la chaîne respiratoire. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe contenant une électrode de «Clark » sensible à l'oxygène (Rank Brothers Ltd, Cambridge, Angleterre). Cette électrode est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent avec une différence de potentiel de -0,7 V, immergées dans une solution de KCl à demi saturée et isolées de la cuve par une membrane semi-perméable laissant diffuser l'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'oxygène traversant la membrane va être réduite au niveau de la cathode selon la réaction suivante :



Une oxydation se produit à l'anode :



L'équation bilan de la réaction est donc :



Dans ces conditions, la variation de courant induite par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation.

L'électrode est associée à une cuve de mesure thermostatée et est calibrée dans le milieu d'incubation équilibré à l'air à 37°C. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu.

Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Ensuite une solution de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu, est injectée dans la chambre, conduisant ainsi au 0% d'oxygène.

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

- Routine : respiration basale de la cellule.
- Oligomycine : respiration insensible à l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), il s'agit donc d'une respiration en conditions non phosphorylantes, qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP.



- FCCP : le gradient de protons est dissipé par un protonophore (le FCCP). La respiration ainsi mesurée est contrôlée par le système d'oxydation et reflète donc la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire dans des conditions découplées.

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

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

### Réactifs :

- DMEM-F12 (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, Paris, France)
- Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 1 mg/ml
- FCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 200  $\mu$ M
- Antimycine A (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2 mg/ml

### Technique :

Les cellules, soit une flasque T75, sont récoltées par l'action de la trypsine. Entre 1 et  $2 \cdot 10^6$  cellules sont nécessaires, pour une oxygraphie. Reprendre les cellules dans 200  $\mu$ l de milieu de respiration, les mettre dans la cuve de l'oxygraphe et fermer le bouchon.

Lorsque la pente correspondant à la respiration basale est régulière, ajouter 2  $\mu$ l d'oligomycine 1 mg/ml, de sorte à être en condition saturante.

Ensuite faire une titration du FCCP en ajoutant 0,5  $\mu$ l de FCCP à 200  $\mu$ M jusqu'à l'obtention de la respiration maximale.

Ajouter 2  $\mu$ l d'antimycine A à 2 mg/ml (8  $\mu$ g/ml final). Ce réactif est un inhibiteur du complexe III permettant de mesurer la consommation d'oxygène qui n'est pas due à la chaîne respiratoire mitochondriale. La valeur de cette respiration en présence d'antimycine A sera retranchée à toutes les autres mesures afin d'exprimer spécifiquement la respiration mitochondriale.

A la fin de l'oxygraphie, prélever 400 $\mu$ l de suspension dans la chambre de mesure pour un dosage des protéines afin de pouvoir rapporter chaque respiration par mg de protéines.

## Fiche technique n° 4 : Western blot

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité relative d'une protéine contenue dans un échantillon. Elle est basée sur la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire. Cet anticorps est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation du complexe antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire se fait par chimiluminescence.

### Réactifs :

- Tampon Tris SDS pH 8,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (Eurobio, Paris, France) : 1 M
  - SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,2 %
  
- Tampon Tris SDS pH 6,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (Eurobio, Paris, France) : 325 mM
  - SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,2 %
  
- Tampon échantillon pH 6,8
  - Tris-HCl (Eurobio, Paris, France) : 0,4 M
  - SDS (Eurobio, Paris, France) : 4,5 %
  - Glycérol (Eurobio, Paris, France) : 4,5 %
  - Bleu de bromophénol (Eurobio, Paris, France) : 2 mM
  - $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,6 M
  
- Tampon électrophorèse pH 8,3
  - Tris (Eurobio, Paris, France) : 25 mM
  - Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 192 mM
  - SDS (Eurobio, Paris, France) : 0,1 %
  
- Tampon de transfert pH 8,3
  - Tris (Eurobio, Paris, France) : 20 mM
  - Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 150 mM
  - Ethanol : 20 %
  
- Tampon TBS pH 7,4
  - NaCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 0,2
  - KCl (Sigma Aldrich, Lyon, France) : 2,5 mM
  - Tris (Eurobio, Paris, France) : 25 mM

## Préparation des gels

Les gels sont coulés entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre les plaques (système Miniprotean, Biorad, CA, USA). Les gels sont constitués d'un gel de séparation et d'un gel de concentration.

- **Gel de séparation :**

- ✓ **Réactifs Gel à 12,5% (recette pour 4 gels)**

- 2 ml de H<sub>2</sub>O
- 12,5 ml de tampon Tris-SDS pH 8,8
- 10,4 ml de solution d'acrylamide/Bis à 30 %
- 250 µl de persulfate d'ammonium à 10%
- 12,5 µl de TEMED

- Couler le gel et laisser polymériser à température ambiante.

- **Gel de concentration :**

- ✓ **Réactifs Gel à 12,5% (recette pour 4 gels)**

- 4 ml H<sub>2</sub>O
- 5 ml de tampon Tris-SDS pH 8,8
- 1,2 ml de solution d'acrylamide/Bis à 30 %
- 100 µl de persulfate d'ammonium à 10%
- 10 µl de TEMED

- Couler le gel, insérer les peignes et laisser polymériser à température ambiante.

## Préparation des échantillons

Les western-blots ont été réalisés à partir de lysats cellulaires obtenus par congélation-décongélation de culots secs de fibroblastes.

Les échantillons sont d'abord repris dans une solution d'inhibiteurs de protéases. Après une étape de dosage de protéines, les échantillons sont dilués dans un tampon d'échantillon (2x ou 4x) puis dénaturés en les chauffant à des températures allant de 55°C à 95°C pendant 5 à 10min.

## L'électrophorèse en SDS-Page

Les échantillons sont ensuite chargés dans les gels puis les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. En parallèle un standard protéique de masse moléculaire connue afin d'estimer la masse moléculaire des protéines d'intérêts.

La migration se fait dans une cuve contenant du tampon d'électrophorèse à 100 volts pendant 15 minutes afin de concentrer les échantillons dans le gel de concentration puis à 140 volts pendant environ 1h30 pour séparer les protéines.

### **Transfert sur membrane de PVDF**

Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF par l'application d'un courant électrique.

La membrane de PVDF est activée par immersion dans un bain d'éthanol, ensuite dans un bain d'eau puis dans le tampon de transfert. Cette membrane déposée sur le gel d'électrophorèse sont placés dans un appareil de transfert entre deux papiers Whatman. Le tout est imbibé de tampon de transfert. Le transfert se fait à 280mA pendant environ 1h30 selon la taille de la protéine et le nombre de gels.

### **Blocage des sites non-spécifiques**

A l'issu du transfert, la membrane est incubée dans une solution de lait ou de BSA à 5 % (TBS-1X+ 0,1%Tween + 5% de lait en poudre demi-écrémé, Régilait ®). Cette étape se fait soit 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

### **Incubation avec les anticorps primaires et secondaires**

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire correspondant à la protéine d'intérêt pendant 2h à température ambiante sous agitation ou toute la nuit à 4°C. L'anticorps est dilué dans du TBS-1X, Tween-20 0,1%, lait 1%. Ensuite la membrane est lavée avec du TBS-1X-tween, puis ré-incubée avec un anticorps secondaire 1h30 à température ambiante. La révélation s'effectue par chimiluminescence. L'image est acquise par un imageur Li-COR®.

## Fiche technique n° 5 : Microscopie à épifluorescence sur fibroblastes en culture

### Préparation des échantillons :

Les cellules sont mises en culture dans des doubles-chambres (Labtek, Nunc International, Naperville, IL) pour l'étude de la structure ou des fonctions mitochondriales par exemple. Les cellules des patients et des témoins sont ensemencées dans du milieu DMEM F12-SVF 10% à raison de 30 000 cellules dans les doubles-chambres.

Les fluorophores utilisés :

- Mitotracker® Green/ Mitotracker® Red/TMRM (Molecular Probes, CA, USA): Ces molécules ont la propriété de se fixer sur les membranes chargées des mitochondries.
- Picogreen qui se fixe spécifiquement à l'ADNmt double brin et émet une fluorescence verte. Le marquage des cellules se fait avec 100ng/mL de picogreen, 15 min à 37°C. A l'issue de ce marquage, le milieu de marquage est éliminé et remplacé par 1 mL de milieu OPTIMEM qui servira de milieu d'observation.
- Hoechst 33342® qui se fixe spécifiquement aux bases adénine et thymine de l'ADN et émet une fluorescence bleue. Il diffuse librement à travers les membranes des cellules saines et apoptotiques.
- MitoSOX® (Molecular Probes, CA, USA) et CellROX interagissent spécifiquement avec les ROS « reactive oxygen species » d'origine mitochondrial et cellulaire en émettant respectivement dans le rouge et dans le vert. Le marquage des cellules se fait avec 5mM de MitoRox et CellRox, 45 min à 37°C. A l'issue de ce marquage, le milieu de marquage est éliminé et remplacé par 1 mL de milieu OPTIMEM qui servira de milieu d'observation.

### La microscopie

Le microscope utilisé est un vidéomicroscope à fluorescence inversé (DMI6000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) équipé d'une caméra (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA). Il est composé d'une source de lumière à vapeur de mercure, permettant un éclairage puissant et stable dont le spectre de la lumière émise possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores usuels (en utilisant des filtres pour sélectionner le pic choisi). Le principe de ce type de microscopie photonique est de marquer les molécules ou les structures d'intérêt avec une sonde fluorescente capable d'émettre elle-même de la lumière qui est récupérée par les

capteurs de la caméra CCD. Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon d'une énergie suffisante (avec la bonne longueur d'onde), elle se désexcite en émettant un photon d'énergie plus basse (à cause des relaxations d'énergie vibrationnelle). Afin de corriger les aberrations optiques (dues aux objectifs, aux vibrations, à l'huile utilisée sur l'objectif 100X) un processus est utilisé : la déconvolution. Ce processus a pour but de ramener sur le plan focal toute la diffraction. Ceci nécessite l'acquisition d'une pile d'images dans l'axe Z pour récupérer toute la diffraction au-dessus et en-dessous du plan focal afin d'avoir le maximum d'information de l'image. Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Metamorph® 7.6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Au minimum, 50 acquisitions sont réalisées par puits.

**L'analyse des images:** Les images obtenues sont déconvoluées afin de corriger les distorsions optiques et améliorer la qualité des images (réduction du bruit de fond), en utilisant un module de déconvolution se basant sur un algorithme de Meinel (Huygens software). Les images ainsi obtenues sont reconstruites en 3D. L'analyse des images est réalisée à l'aide du logiciel Imaris 6.3® (Bitplane, Zurich, Switzerland), permettant d'étudier la longueur des mitochondries, la fragmentation du réseau, l'état de connectivité des mitochondries, le volume mitochondrial, le nombre des nucléoides ou encore la production de ROS.

## Fiche technique n° 6: Extraction de l'ADN total

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit Roche life science (référence 11796828001)

### Réactifs

- Tampon de lyse cellulaire
- Tampon d'éluion
- Tampon de rinçage (wash buffer)
- Protéinase K
- RNase
- Solution de précipitation des protéines
- Isopropanol
- Culot cellulaire (≈2 millions)

### Protocole

- Reprendre le culot cellulaire par 200µl de PBS 1X
- Ajouter 40 µl de protéinase K
- Ajouter 40 µl de binding buffer, incuber 10 min à 70°C
- Ajouter 100 µl d'isopropanol et transférer 540 µl dans une colonne avec un tube collecteur, centrifuger 1 min à 10 000g
- Ajouter 500 µl de tampon de rinçage (wash buffer), centrifuger 1 min à 10 000g (x2)
- Centrifuger 10 s à 13000g, ensuite transférer la colonne dans un tube eppendorf
- Ajouter 100 µl de tampon d'éluion et centrifuger 1 min à 10 000g (x2)
- Dosage de la quantité d'ADN extrait au spectrophotomètre (Nanodrop)
- Stockage à -80°C pour utilisation ultérieure



## Fiche technique n° 7 : Quantification de l'ADN mitochondrial

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. La sonde fluorescente utilisée lors de ces manipulations est le SYBR green 1 qui se lie à toutes les molécules d'ADN double brin en émettant une fluorescence détectable à 521 nm. La fluorescence émise, détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé. ON utilise des paires d'amorces pour la réaction. Cet ensemble contient des paires d'amorces pour l'amplification de quatre régions: deux paires d'amorces pour la détection de l'ADN mitochondrial et deux paires d'amorces pour la détection de l'ADN. Chaque amorce est spécifiquement conçue pour ne pas amplifier de pseudogènes.

**Technique :** Les transcrits des gènes ND4 et  $\beta$ 2 microglobuline sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel grâce au thermocycleur Chromo 4 real-time PCR detector et au kit iQ Sybr green Supermix (BioRad, CA, USA).  $\beta$ 2 microglobuline sert de gène de référence pour normaliser la quantité d'ADNc de chaque échantillon.

### Etape1: Préparation d'une gamme de référence pour chaque gène

Afin de pouvoir analyser de manière quantitative l'amplification du gène d'intérêt, il est nécessaire d'établir au préalable une gamme de nombre de copies connues d'amplicons du gène cible. Pour cela, une PCR classique est réalisée : 2  $\mu$ l d'ADNc sont ajoutés à 15  $\mu$ l d'un mélange d'amorces (2 $\mu$ l d'amorces sens et antisens à 20 mM chacune et 11  $\mu$ l d'eau) et à 23  $\mu$ l du mélange de PCR (4  $\mu$ l de tampon 10X, 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM, 4 $\mu$ l de dNTP à 2 mM, 12  $\mu$ l d'eau DEPC et 0,5  $\mu$ l de l'enzyme Taq polymerase).

Les ADNc sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 3 minutes puis 35 cycles de dénaturation 94°C 30 secondes, hybridation au T<sub>m</sub> du couple d'amorces 30 secondes, élongation à 72°C pendant 30 secondes et enfin 72°C pendant 10 minutes. Les ADN amplifiés sont purifiés sur colonne (High Pure Product Purification kit, Boeringher) et sont quantifiés à la fois par lecture de la densité optique des ADN double brin à 260 nm et par quantification sur gel d'agarose à 2,5%. Le nombre de copies dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

Nombre de copies = DO (ng/ $\mu$ l) \* 9,1. 10<sup>11</sup> / nombre de paires de bases du produit de PCR Les échantillons sont dilués pour obtenir 1010 copies/ $\mu$ l.

La gamme est ensuite réalisée par dilutions en cascade de cet échantillon à 1010 copies/ $\mu$ l dans de l'eau stérile.

## Etape 2-PCR quantitative en temps réel

Mettre dans une barette adaptée au Chromo 4 real-time PCR detector : - 8 µl d'ADN issu de l'extraction d'ADN et dilué au 1/40ème (1/100ème final) - 1 µl d'amorce sens (0,5 µM final) - 1 µl d'amorce anti-sens (0,5 µM final) - 10 µl de mix 2X contenant l'enzyme Taq DNA polymerase et le fluorochrome.

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

ADNmt: MitoDNA\_RNAL: amorce sens 5'-CGCATAAAACTTAAACTTTACAG-3' et amorce antisens 5'-CTTTGCGTAGTTGTATATAGC-3'

MitoDNA\_ND4: amorce sens 5'-CAGCCACATAGCCCTCGTAG-3' et amorce antisens 5'-GCGAGGTTAGCGAGGCTTGC-3'

ADNnu: Nuclβ-glob: amorce sens 5'TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3' et amorce antisens ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3'

NuclAIB: amorce sens 5'-GGAGTTTCCTGGACAAATGA et amorce antisens 5'-AGGACTGGCGTTTATGTCTT-3'

Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- 95°C pendant 10 min, puis :
- Dénaturation : - Température : 95°C - Temps d'incubation : 10 s
- Hybridation : - Température : 59°C - Temps d'incubation : 15 s
- Elongation : -Température : 72°C- Temps d'incubation : 20 s
- Retour à l'étape de dénaturation : nombre de cycles : 45 cycles
- « Melting curves » de 70° à 99°C

# *Autres activités*

## ***Publications***

- **Cell and mitochondrial network size and shape control mitochondrial nucleoid number**

Mariame Selma KANE<sup>1,4</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1,3,4</sup>, Marc FERRE<sup>1,4</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Julien CASSEREAU<sup>3,4</sup>, Christophe VERNY<sup>3,4</sup>, Patrizia BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2,4</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2,4</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2,4</sup> Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,4</sup> **soumis à Mitochondrion**

- ***OPA1* mutations on autophagy: relevance to the pathogenesis of mitochondrial optic neuropathies**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Loyal ISHAK<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup> **soumis à journal of Medical Genetics**

- **The protonophores, CCCP and FCCP: their relevance to the mito/autophagic pathways**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Aurélien PARIS<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Loyal ISHAK<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup> **manuscrit en préparation**

- **Selective HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion in *OPA1*-mutated fibroblasts and reverses impaired mitochondrial function**

Mariame Selma KANE<sup>1</sup>, Jennifer ALBAN<sup>1</sup>, Valérie DESQUIRET-DUMAS<sup>1,2</sup>, Naïg GUEGUEN<sup>1,2</sup>, Kamel Madani<sup>3</sup>, Marc FERRE<sup>1</sup>, Patrizia AMATI-BONNEAU<sup>1,2</sup>, Vincent PROCACCIO<sup>1,2</sup>, Dominique BONNEAU<sup>1,2</sup>, Guy LENAERS<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>1,2</sup>, Arnaud CHEVROLLIER<sup>1,\*</sup> **manuscrit en préparation**

- **Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency**

Leman G, Gueguen N, Desquiret-Dumas V, Kane M.S, Wettervald C, Chupin S, Chevrollier A, Lebre AS, Bonnefont JP, Barth M, Amati-Bonneau P, Verny C, Henrion D, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V. **International journal of biochemistry** Août 2015

## **Communications**

- Bnmiale - Angers (*Septembre 2014*)  
*Mitochondria hyperpolarization, a checkpoint to mitophagy regulation?*
- Bnmiale - Angers (*Janvier 2014*)  
*Mitochondrial dynamics: Mitophagy in ADOA fibroblasts?*
- Journées scientifiques de l'ED BS-Nantes et ED international St Jacques De Compostelle (programme Mérimée) - Nantes (*Décembre 2013*)  
*Mitochondrial dynamics: Mitochondria structure/function relationship in ADOA fibroblasts*
- Febs-EMBO - Paris (*Août 2014*)  
*Hyperpolarization of isolated mitochondria triggers mitophagy in OPA1-mutated fibroblasts*
- Meetochondrie.Evian 2014 - Evian (*Mai 2014*)  
*OPA1-mutations related to mitochondrial fragmentations increase mitophagy in ADOA fibroblasts*

## **Enseignement**

- Poste d'ATER en santé (PLURIPASS) => Biochimie et Biologie Moléculaire
- Atelier de microscopie à fluorescence- IBS-IUT –Angers (*Janvier 2016*)
- Atelier de microscopie super-résolution - PARIS (*Juin 2015*)
- Atelier de microscopie IUT - Angers (*Décembre 2014*)
- Meetochondrie workshop (GDR CNRS 3159) - Angers (*Juin 2014*)  
*Voir la dynamique mitochondriale: santé et végétal*

# *Bibliographie*

## References

- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular Cell* 32 (4): 529–39. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.021.
- Agier, Virginie, Patricia Oliviero, Jeanne Lainé, Caroline L'Hermitte-Stead, Samantha Girard, Sandrine Fillaut, Claude Jardel, Frédéric Bouillaud, Anne Laure Bulteau, and Anne Lombès. 2012. "Defective Mitochondrial Fusion, Altered Respiratory Function, and Distorted Cristae Structure in Skin Fibroblasts with Heterozygous OPA1 Mutations." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1822 (10): 1570–80. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.002.
- Ahn, Bong-Hyun, Hyun-Seok Kim, Shiwei Song, In Hye Lee, Jie Liu, Athanassios Vassilopoulos, Chu-Xia Deng, and Toren Finkel. 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 (38): 14447–52. doi:10.1073/pnas.0803790105.
- Akimoto, Takayuki, Steven C. Pohnert, Ping Li, Mei Zhang, Curtis Gumbs, Paul B. Rosenberg, R. Sanders Williams, and Zhen Yan. 2005. "Exercise Stimulates Pgc-1 $\alpha$  Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 280 (20): 19587–93. doi:10.1074/jbc.M408862200.
- Alavi, Marcel V., Stefanie Bette, Simone Schimpf, Frank Schuettauf, Ulrich Schraermeyer, Hans F. Wehrl, Lukas Ruttiger, et al. 2007. "A Splice Site Mutation in the Murine Opa1 Gene Features Pathology of Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Brain: A Journal of Neurology* 130 (Pt 4): 1029–42. doi:10.1093/brain/awm005.
- Alavi, Marcel V., and Nico Fuhrmann. 2013. "Dominant Optic Atrophy, OPA1, and Mitochondrial Quality Control: Understanding Mitochondrial Network Dynamics." *Molecular Neurodegeneration* 8: 32. doi:10.1186/1750-1326-8-32.
- Alexander, C., M. Votruba, U. E. Pesch, D. L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, et al. 2000. "OPA1, Encoding a Dynamin-Related GTPase, Is Mutated in Autosomal Dominant Optic Atrophy Linked to Chromosome 3q28." *Nature Genetics* 26 (2): 211–15. doi:10.1038/79944.
- Amati-Bonneau, Patrizia, Agnès Guichet, Aurélien Olichon, Arnaud Chevrollier, Frédérique Viala, Stéphanie Miot, Carmen Ayuso, et al. 2005. "OPA1 R445H Mutation in Optic Atrophy Associated with Sensorineural Deafness." *Annals of Neurology* 58 (6): 958–63. doi:10.1002/ana.20681.
- Amati-Bonneau, Patrizia, Sylvie Odent, Christelle Derrien, Laurent Pasquier, Yves Malthiéry, Pascal Reynier, and Dominique Bonneau. 2003. "The Association of Autosomal Dominant Optic Atrophy and Moderate Deafness May Be due to the R445H Mutation in the OPA1 Gene." *American Journal of Ophthalmology* 136 (6): 1170–71.



- Amati-Bonneau, Patrizia, Maria Lucia Valentino, Pascal Reynier, Maria Esther Gallardo, Belén Bornstein, Anne Boissière, Yolanda Campos, et al. 2008. "OPA1 Mutations Induce Mitochondrial DNA Instability and Optic Atrophy 'plus' Phenotypes." *Brain: A Journal of Neurology* 131 (Pt 2): 338–51. doi:10.1093/brain/awm298.
- Amiott, Elizabeth A., Paul Lott, Jamie Soto, Peter B. Kang, J. Michael McCaffery, Salvatore DiMauro, E. Dale Abel, Kevin M. Flanigan, Victoria H. Lawson, and Janet M. Shaw. 2008. "Mitochondrial Fusion and Function in Charcot-Marie-Tooth Type 2A Patient Fibroblasts with Mitofusin 2 Mutations." *Experimental Neurology* 211 (1): 115–27. doi:10.1016/j.expneurol.2008.01.010.
- Anand, Ruchika, Timothy Wai, Michael J. Baker, Nikolay Kladt, Astrid C. Schauss, Elena Rugarli, and Thomas Langer. 2014. "The I-AAA Protease YME1L and OMA1 Cleave OPA1 to Balance Mitochondrial Fusion and Fission." *The Journal of Cell Biology* 204 (6): 919–29. doi:10.1083/jcb.201308006.
- Andersson, U., and R. C. Scarpulla. 2001. "Pgc-1-Related Coactivator, a Novel, Serum-Inducible Coactivator of Nuclear Respiratory Factor 1-Dependent Transcription in Mammalian Cells." *Molecular and Cellular Biology* 21 (11): 3738–49. doi:10.1128/MCB.21.11.3738-3749.2001.
- Anikster, Y., R. Kleta, A. Shaag, W. A. Gahl, and O. Elpeleg. 2001. "Type III 3-Methylglutaconic Aciduria (optic Atrophy plus Syndrome, or Costeff Optic Atrophy Syndrome): Identification of the OPA3 Gene and Its Founder Mutation in Iraqi Jews." *American Journal of Human Genetics* 69 (6): 1218–24. doi:10.1086/324651.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart, and H. Schägger. 1998. "Yeast Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits." *The EMBO Journal* 17 (24): 7170–78. doi:10.1093/emboj/17.24.7170.
- Baloh, Robert H., Robert E. Schmidt, Alan Pestronk, and Jeffrey Milbrandt. 2007. "Altered Axonal Mitochondrial Transport in the Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Disease from Mitofusin 2 Mutations." *The Journal of Neuroscience* 27 (2): 422–30. doi:10.1523/JNEUROSCI.4798-06.2007.
- Banduseela, Varuna C., Yi-Wen Chen, Hanna Göransson Kultima, Holly S. Norman, Sudhakar Aare, Peter Radell, Lars I. Eriksson, Eric P. Hoffman, and Lars Larsson. 2013. "Impaired Autophagy, Chaperone Expression, and Protein Synthesis in Response to Critical Illness Interventions in Porcine Skeletal Muscle." *Physiological Genomics* 45 (12): 477–86. doi:10.1152/physiolgenomics.00141.2012.
- Bandy, B., and A. J. Davison. 1990. "Mitochondrial Mutations May Increase Oxidative Stress: Implications for Carcinogenesis and Aging?" *Free Radical Biology & Medicine* 8 (6): 523–39.
- Ban-Ishihara, Reiko, Takaya Ishihara, Narie Sasaki, Katsuyoshi Mihara, and Naotada Ishihara. 2013. "Dynamics of Nucleoid Structure Regulated by Mitochondrial Fission Contributes to Cristae Reformation and Release of Cytochrome c." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (29): 11863–68. doi:10.1073/pnas.1301951110.

- Bannwarth, Sylvie, Samira Ait-El-Mkadem, Annabelle Chaussonot, Emmanuelle C. Genin, Sandra Lacas-Gervais, Konstantina Fragaki, Laetitia Berg-Alonso, et al. 2014. "A Mitochondrial Origin for Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis through CHCHD10 Involvement." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 8): 2329–45. doi:10.1093/brain/awu138.
- Ban, Tadato, Jürgen A. W. Heymann, Zhiyin Song, Jenny E. Hinshaw, and David C. Chan. 2010. "OPA1 Disease Alleles Causing Dominant Optic Atrophy Have Defects in Cardiolipin-Stimulated GTP Hydrolysis and Membrane Tubulation." *Human Molecular Genetics* 19 (11): 2113–22. doi:10.1093/hmg/ddq088.
- Barboni, Piero, Michele Carbonelli, Giacomo Savini, Beatrice Foscarini, Vincenzo Parisi, Maria L. Valentino, Arturo Carta, et al. 2010. "OPA1 Mutations Associated with Dominant Optic Atrophy Influence Optic Nerve Head Size." *Ophthalmology* 117 (8): 1547–53. doi:10.1016/j.ophtha.2009.12.042.
- Barboni, Piero, Giacomo Savini, Maria Lucia Cascavilla, Leonardo Caporali, Jacopo Milesi, Enrico Borrelli, Chiara La Morgia, et al. 2014. "Early Macular Retinal Ganglion Cell Loss in Dominant Optic Atrophy: Genotype-Phenotype Correlation." *American Journal of Ophthalmology* 158 (3): 628–36.e3. doi:10.1016/j.ajo.2014.05.034.
- Bashkirov, Pavel V., Sergey A. Akimov, Alexey I. Evseev, Sandra L. Schmid, Joshua Zimmerberg, and Vadim A. Frolov. 2008. "GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission." *Cell* 135 (7): 1276–86. doi:10.1016/j.cell.2008.11.028.
- Behr, C. 1909. "Die Komplizierte, Hereditäre-Familiale Optikusatrophie Des Kindesalters: Ein Bisher Nicht Beschriebener Symptomenkomplex." *Klin Monatsbl Augenheilkd* 47: 138–60.
- Bellenchi, Gian Carlo, Christine B. Gurniak, Emerald Perlas, Silvia Middei, Martine Ammassari-Teule, and Walter Witke. 2007. "N-Cofilin Is Associated with Neuronal Migration Disorders and Cell Cycle Control in the Cerebral Cortex." *Genes & Development* 21 (18): 2347–57. doi:10.1101/gad.434307.
- Benard, G., B. Faustin, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, K. Smolkova, L. Casteilla, R. Rossignol, and T. Letellier. 2008. "Functional Dynamic Compartmentalization of Respiratory Chain Intermediate Substrates: Implications for the Control of Energy Production and Mitochondrial Diseases." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (8): 1543–54. doi:10.1016/j.biocel.2007.11.023.
- Bereiter-Hahn, J. 1990. "Behavior of Mitochondria in the Living Cell." *International Review of Cytology* 122: 1–63.
- Bertholet, Ambre M., Aurélie M. E. Millet, Oriane Guillermin, Marlène Daloyau, Noélie Davezac, Marie-Christine Miquel, and Pascale Belenguer. 2013. "OPA1 Loss of Function Affects in Vitro Neuronal Maturation." *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 5): 1518–33. doi:10.1093/brain/awt060.
- Bertholet, A. M., T. Delerue, A. M. Millet, M. F. Moulis, C. David, M. Daloyau, L. Arnauné-Pelloquin, et al. 2016. "Mitochondrial Fusion/fission Dynamics in

- Neurodegeneration and Neuronal Plasticity." *Neurobiology of Disease* 90 (June): 3–19. doi:10.1016/j.nbd.2015.10.011.
- Bogenhagen, Daniel F. 2012. "Mitochondrial DNA Nucleoid Structure." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (9-10): 914–20. doi:10.1016/j.bbagr.2011.11.005.
- Bogenhagen, Daniel F., Denis Rousseau, and Stephanie Burke. 2008. "The Layered Structure of Human Mitochondrial DNA Nucleoids." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (6): 3665–75. doi:10.1074/jbc.M708444200.
- Bogenhagen, D., and D. A. Clayton. 1977. "Mouse L Cell Mitochondrial DNA Molecules Are Selected Randomly for Replication throughout the Cell Cycle." *Cell* 11 (4): 719–27.
- Bonawitz, Nicholas D., David A. Clayton, and Gerald S. Shadel. 2006. "Initiation and beyond: Multiple Functions of the Human Mitochondrial Transcription Machinery." *Molecular Cell* 24 (6): 813–25. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.024.
- Bonifert, Tobias, Kathrin N. Karle, Felix Tonagel, Marion Batra, Christian Wilhelm, Yvonne Theurer, Caroline Schoenfeld, et al. 2014. "Pure and Syndromic Optic Atrophy Explained by Deep Intronic OPA1 Mutations and an Intralocus Modifier." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 8): 2164–77. doi:10.1093/brain/awu165.
- Bonneau, Dominique, Estelle Colin, Florine Oca, Marc Ferré, Arnaud Chevrollier, Naïg Guéguen, Valérie Desquret-Dumas, et al. 2014. "Early-Onset Behr Syndrome due to Compound Heterozygous Mutations in OPA1." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 10): e301. doi:10.1093/brain/awu184.
- Bossy-Wetzell, Ella, Mark J. Barsoum, Adam Godzik, Robert Schwarzenbacher, and Stuart A. Lipton. 2003. "Mitochondrial Fission in Apoptosis, Neurodegeneration and Aging." *Current Opinion in Cell Biology* 15 (6): 706–16.
- Braschi, Emélie, Rodolfo Zunino, and Heidi M. McBride. 2009. "MAPL Is a New Mitochondrial SUMO E3 Ligase That Regulates Mitochondrial Fission." *EMBO Reports* 10 (7): 748–54. doi:10.1038/embor.2009.86.
- Brenmoehl, Julia, and Andreas Hoeflich. 2013. "Dual Control of Mitochondrial Biogenesis by Sirtuin 1 and Sirtuin 3." *Mitochondrion* 13 (6): 755–61. doi:10.1016/j.mito.2013.04.002.
- Brown, Timothy A., Ariana N. Tkachuk, Gleb Shtengel, Benjamin G. Kopeck, Daniel F. Bogenhagen, Harald F. Hess, and David A. Clayton. 2011. "Superresolution Fluorescence Imaging of Mitochondrial Nucleoids Reveals Their Spatial Range, Limits, and Membrane Interaction." *Molecular and Cellular Biology* 31 (24): 4994–5010. doi:10.1128/MCB.05694-11.
- Burchell, Victoria S, Sonia Gandhi, Emma Deas, Nicholas W Wood, Andrey Y Abramov, and Hélène Plun-Favreau. 2010. "Targeting Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disease: Part II." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 14 (5): 497–511. doi:10.1517/14728221003730434.
- Burté, Florence, Valerio Carelli, Patrick F. Chinnery, and Patrick Yu-Wai-Man. 2015. "Disturbed Mitochondrial Dynamics and Neurodegenerative Disorders." *Nature Reviews. Neurology* 11 (1): 11–24. doi:10.1038/nrneuro.2014.228.

- Busch, Karin B., Axel Kowald, and Johannes N. Spelbrink. 2014. "Quality Matters: How Does Mitochondrial Network Dynamics and Quality Control Impact on mtDNA Integrity?" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1646). doi:10.1098/rstb.2013.0442.
- Cagin, Umut, and José Antonio Enriquez. 2015. "The Complex Crosstalk between Mitochondria and the Nucleus: What Goes in Between?" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 63 (June): 10–15. doi:10.1016/j.biocel.2015.01.026.
- Caldeira da Silva, Camille C, Fernanda M Cerqueira, Lívea F Barbosa, Marisa H G Medeiros, and Alicia J Kowaltowski. 2008. "Mild Mitochondrial Uncoupling in Mice Affects Energy Metabolism, Redox Balance and Longevity." *Aging Cell* 7 (4): 552–60. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00407.x.
- Cantó, Carles, Zachary Gerhart-Hines, Jerome N. Feige, Marie Lagouge, Lilia Noriega, Jill C. Milne, Peter J. Elliott, Pere Puigserver, and Johan Auwerx. 2009. "AMPK Regulates Energy Expenditure by Modulating NAD<sup>+</sup> Metabolism and SIRT1 Activity." *Nature* 458 (7241): 1056–60. doi:10.1038/nature07813.
- Carelli, Valerio, Fred N. Ross-Cisneros, and Alfredo A. Sadun. 2004. "Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Optic Neuropathies." *Progress in Retinal and Eye Research* 23 (1): 53–89. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.10.003.
- Carelli, Valerio, Olimpia Musumeci, Leonardo Caporali, Claudia Zanna, Chiara La Morgia, Valentina Del Dotto, Anna Maria Porcelli, et al. 2015. "Syndromic Parkinsonism and Dementia Associated with OPA1 Missense Mutations." *Annals of Neurology* 78 (1): 21–38. doi:10.1002/ana.24410.
- Carelli, Valerio, Mario Sabatelli, Rosalba Carrozzo, Teresa Rizza, Simone Schimpf, Bernd Wissinger, Claudia Zanna, et al. 2015. "'Behr Syndrome' with OPA1 Compound Heterozygote Mutations." *Brain: A Journal of Neurology* 138 (Pt 1): e321. doi:10.1093/brain/awu234.
- Cassereau, Julien, Arnaud Chevrollier, Naïg Gueguen, Marie-Claire Malinge, Franck Letournel, Guillaume Nicolas, Laurence Richard, et al. 2009. "Mitochondrial Complex I Deficiency in GDAP1-Related Autosomal Dominant Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT2K)." *Neurogenetics* 10 (2): 145–50. doi:10.1007/s10048-008-0166-9.
- Chan, Yee-Hung M, and Wallace F Marshall. 2010. "Scaling Properties of Cell and Organelle Size." *Organogenesis* 6 (2): 88–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901812/>.
- Chao de la Barca, Juan Manuel, Delphine Prunier-Mirebeau, Patrizia Amati-Bonneau, Marc Ferré, Emmanuelle Sarzi, Céline Bris, Stéphanie Leruez, et al. 2015. "OPA1-Related Disorders: Diversity of Clinical Expression, Modes of Inheritance and Pathophysiology." *Neurobiology of Disease*, August. doi:10.1016/j.nbd.2015.08.015.
- Chatre, Laurent, and Miria Ricchetti. 2013a. "Large Heterogeneity of Mitochondrial DNA Transcription and Initiation of Replication Exposed by Single-Cell Imaging." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 4): 914–26. doi:10.1242/jcs.114322.

- . 2013b. “Prevalent Coordination of Mitochondrial DNA Transcription and Initiation of Replication with the Cell Cycle.” *Nucleic Acids Research* 41 (5): 3068–78. doi:10.1093/nar/gkt015.
- Chen, Guo, Zhe Han, Du Feng, Yanfang Chen, Linbo Chen, Hao Wu, Li Huang, et al. 2014. “A Regulatory Signaling Loop Comprising the PGAM5 Phosphatase and CK2 Controls Receptor-Mediated Mitophagy.” *Molecular Cell* 54 (3): 362–77. doi:10.1016/j.molcel.2014.02.034.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, and David C. Chan. 2003. “Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development.” *The Journal of Cell Biology* 160 (2): 189–200. doi:10.1083/jcb.200211046.
- Chen, Hsiuchen, J. Michael McCaffery, and David C. Chan. 2007. “Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum.” *Cell* 130 (3): 548–62. doi:10.1016/j.cell.2007.06.026.
- Chen, Hsiuchen, Marc Vermulst, Yun E. Wang, Anne Chomyn, Tomas A. Prolla, J. Michael McCaffery, and David C. Chan. 2010. “Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations.” *Cell* 141 (2): 280–89. doi:10.1016/j.cell.2010.02.026.
- Chen, Le, Tingting Liu, Alice Tran, Xiyuan Lu, Alexey A. Tomilov, Vanessa Davies, Gino Cortopassi, et al. 2012. “OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy: Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability.” *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 1 (5). doi:10.1161/JAHA.112.003012.
- Chen, Sigeng, Geoffrey C. Owens, Helen Makarenkova, and David B. Edelman. 2010. “HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons.” *PLoS ONE* 5 (5). doi:10.1371/journal.pone.0010848.
- Chevrollier, Arnaud, Julien Cassereau, Marc Ferré, Jennifer Alban, Valérie Desquirit-Dumas, Naïg Gueguen, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, and Pascal Reynier. 2012. “Standardized Mitochondrial Analysis Gives New Insights into Mitochondrial Dynamics and OPA1 Function.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (6): 980–88. doi:10.1016/j.biocel.2012.03.006.
- Chevrollier, Arnaud, Virginie Guillet, Dominique Loiseau, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Marc Ferre, et al. 2008. “Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect.” *Annals of Neurology* 63 (6): 794–98. doi:10.1002/ana.21385.
- Chinnery, P. F., and D. C. Samuels. 1999. “Relaxed Replication of mtDNA: A Model with Implications for the Expression of Disease.” *American Journal of Human Genetics* 64 (4): 1158–65.
- Choi, Sangdun, Xuebin Liu, Ping Li, Takayuki Akimoto, Sun Young Lee, Mei Zhang, and Zhen Yan. 2005. “Transcriptional Profiling in Mouse Skeletal Muscle Following a Single Bout of Voluntary Running: Evidence of Increased Cell Proliferation.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 99 (6): 2406–15. doi:10.1152/jappphysiol.00545.2005.

- Cipolat, Sara, Olga Martins de Brito, Barbara Dal Zilio, and Luca Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 15927–32. doi:10.1073/pnas.0407043101.
- Cipolat, Sara, Tomasz Rudka, Dieter Hartmann, Veronica Costa, Lutgarde Serneels, Katleen Craessaerts, Kristine Metzger, et al. 2006. "Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling." *Cell* 126 (1): 163–75. doi:10.1016/j.cell.2006.06.021.
- Civiletto, Gabriele, Tatiana Varanita, Raffaele Cerutti, Tatiana Gorletta, Serena Barbaro, Silvia Marchet, Costanza Lamperti, Carlo Viscomi, Luca Scorrano, and Massimo Zeviani. 2015. "Opa1 Overexpression Ameliorates the Phenotype of Two Mitochondrial Disease Mouse Models." *Cell Metabolism* 21 (6): 845–54. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.016.
- Clayton, D. A. 1982. "Replication of Animal Mitochondrial DNA." *Cell* 28 (4): 693–705.
- Clinton, Ryan W., Christopher A. Francy, Rajesh Ramachandran, Xin Qi, and Jason A. Mears. 2015. "Dynamin-Related Protein 1 Oligomerization in Solution Impairs Functional Interactions with Membrane-Anchored Mitochondrial Fission Factor." *Journal of Biological Chemistry*, November, jbc.M115.680025. doi:10.1074/jbc.M115.680025.
- Cogliati, Sara, Jose A. Enriquez, and Luca Scorrano. 2016. "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends in Biochemical Sciences*, Special Issue: Mitochondria & Metabolism, 41 (3): 261–73. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.001.
- Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, et al. 2013. "Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency." *Cell* 155 (1): 160–71. doi:10.1016/j.cell.2013.08.032.
- Cribbs, J. Thomas, and Stefan Strack. 2007. "Reversible Phosphorylation of Drp1 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Cell Death." *EMBO Reports* 8 (10): 939–44. doi:10.1038/sj.embor.7401062.
- Cruciat, C. M., S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert, and R. A. Stuart. 2000. "The Cytochrome bc1 and Cytochrome c Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (24): 18093–98. doi:10.1074/jbc.M001901200.
- Dason, Jeffrey S., Alex J. Smith, Leo Marin, and Milton P. Charlton. 2014. "Cholesterol and F-Actin Are Required for Clustering of Recycling Synaptic Vesicle Proteins in the Presynaptic Plasma Membrane." *The Journal of Physiology* 592 (4): 621–33. doi:10.1113/jphysiol.2013.265447.
- Dautant, Alain, Jean Velours, and Marie-France Giraud. 2010. "Crystal Structure of the Mg·ADP-Inhibited State of the Yeast F1c10-ATP Synthase." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (38): 29502–10. doi:10.1074/jbc.M110.124529.

- Davies, Vanessa J., Andrew J. Hollins, Malgorzata J. Piechota, Wanfen Yip, Jennifer R. Davies, Kathryn E. White, Phillip P. Nicols, Michael E. Boulton, and Marcela Votruba. 2007. "Opa1 Deficiency in a Mouse Model of Autosomal Dominant Optic Atrophy Impairs Mitochondrial Morphology, Optic Nerve Structure and Visual Function." *Human Molecular Genetics* 16 (11): 1307–18. doi:10.1093/hmg/ddm079.
- Dayanithi, Govindan, Murielle Chen-Kuo-Chang, Cedric Viero, Christian Hamel, Agnès Muller, and Guy Lenaers. 2010. "Characterization of Ca<sup>2+</sup> Signalling in Postnatal Mouse Retinal Ganglion Cells: Involvement of OPA1 in Ca<sup>2+</sup> Clearance." *Ophthalmic Genetics* 31 (2): 53–65. doi:10.3109/13816811003698117.
- Dayhoff, M. O., and R. M. Schwartz. 1981. "Evidence on the Origin of Eukaryotic Mitochondria from Protein and Nucleic Acid Sequences\*." *Annals of the New York Academy of Sciences* 361 (1): 92–104. doi:10.1111/j.1749-6632.1981.tb54359.x.
- de Brito, Olga Martins, and Luca Scorrano. 2008. "Mitofusin 2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria." *Nature* 456 (7222): 605–10. doi:10.1038/nature07534.
- Delettre, C., J. M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, and C. P. Hamel. 2001. "Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene." *Human Genetics* 109 (6): 584–91. doi:10.1007/s00439-001-0633-y.
- Delettre, C., G. Lenaers, J. M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, et al. 2000. "Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy." *Nature Genetics* 26 (2): 207–10. doi:10.1038/79936.
- Dompierre, Jim P., Juliette D. Godin, Bénédicte C. Charrin, Fabrice P. Cordelières, Stephen J. King, Sandrine Humbert, and Frédéric Saudou. 2007. "Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (13): 3571–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007.
- Dudkina, Natalya V., Jesco Heinemeyer, Wilko Keegstra, Egbert J. Boekema, and Hans-Peter Braun. 2005. "Structure of Dimeric ATP Synthase from Mitochondria: An Angular Association of Monomers Induces the Strong Curvature of the Inner Membrane." *FEBS Letters* 579 (25): 5769–72. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.065.
- East, Daniel A., Francesca Fagiani, James Crosby, Nikolaos D. Georgakopoulos, Hélène Bertrand, Marjolein Schaap, Adrian Fowkes, Geoff Wells, and Michelangelo Campanella. 2014. "PM1: A  $\Delta\Psi_m$  Independent Pharmacological Regulator of Mitophagy." *Chemistry & Biology* 21 (11): 1585–96. doi:10.1016/j.chembiol.2014.09.019.
- Elachouri, Ghizlane, Sara Vidoni, Claudia Zanna, Alexandre Pattyn, Hassan Boukhaddaoui, Karen Gaget, Patrick Yu-Wai-Man, et al. 2011. "OPA1 Links

- Human Mitochondrial Genome Maintenance to mtDNA Replication and Distribution." *Genome Research* 21 (1): 12–20. doi:10.1101/gr.108696.110.
- Elliott, Hannah R., David C. Samuels, James A. Eden, Caroline L. Relton, and Patrick F. Chinnery. 2008. "Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population." *American Journal of Human Genetics* 83 (2): 254–60. doi:10.1016/j.ajhg.2008.07.004.
- Farge, Géraldine, Niels Laurens, Onno D. Broekmans, Siet M. J. L. van den Wildenberg, Linda C. M. Dekker, Martina Gaspari, Claes M. Gustafsson, Erwin J. G. Peterman, Maria Falkenberg, and Gijs J. L. Wuite. 2012. "Protein Sliding and DNA Denaturation Are Essential for DNA Organization by Human Mitochondrial Transcription Factor A." *Nature Communications* 3: 1013. doi:10.1038/ncomms2001.
- Fernández-Vizarra, Erika, Valeria Tiranti, and Massimo Zeviani. 2009. "Assembly of the Oxidative Phosphorylation System in Humans: What We Have Learned by Studying Its Defects." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (1): 200–211. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.028.
- Ferré, Marc, Patrizia Amati-Bonneau, Yves Tourmen, Yves Malthièry, and Pascal Reynier. 2005. "eOPA1: An Online Database for OPA1 Mutations." *Human Mutation* 25 (5): 423–28. doi:10.1002/humu.20161.
- Ferré, Marc, Angélique Caignard, Dan Milea, Stéphanie Leruez, Julien Cassereau, Arnaud Chevrollier, Patrizia Amati-Bonneau, et al. 2015. "Improved Locus-Specific Database for OPA1 Mutations Allows Inclusion of Advanced Clinical Data." *Human Mutation* 36 (1): 20–25. doi:10.1002/humu.22703.
- Frezza, Christian, Sara Cipolat, Olga Martins de Brito, Massimo Micaroni, Galina V. Beznoussenko, Tomasz Rudka, Davide Bartoli, et al. 2006. "OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion." *Cell* 126 (1): 177–89. doi:10.1016/j.cell.2006.06.025.
- Friedman, Jonathan R., Laura L. Lackner, Matthew West, Jared R. DiBenedetto, Jodi Nunnari, and Gia K. Voeltz. 2011. "ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6054): 358–62. doi:10.1126/science.1207385.
- Friedman, Jonathan R., Brant M. Webster, David N. Mastronarde, Kristen J. Verhey, and Gia K. Voeltz. 2010. "ER Sliding Dynamics and ER–mitochondrial Contacts Occur on Acetylated Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 190 (3): 363–75. doi:10.1083/jcb.200911024.
- Fülöp, László, Anikó Rajki, Erika Maka, Mária Judit Molnár, and András Spät. 2015. "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake Correlates with the Severity of the Symptoms in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Cell Calcium* 57 (1): 49–55. doi:10.1016/j.ceca.2014.11.008.
- Galloway, Chad A., Hakjoo Lee, and Yisang Yoon. 2012. "Mitochondrial Morphology—Emerging Role in Bioenergetics." *Free Radical Biology & Medicine* 53 (12): 2218–28. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035.
- Gandre-Babbe, Shilpa, and Alexander M. van der Bliek. 2008. "The Novel Tail-Anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal



- Fission in Mammalian Cells." *Molecular Biology of the Cell* 19 (6): 2402–12. doi:10.1091/mbc.E07-12-1287.
- Gegg, Matthew E., J. Mark Cooper, Kai-Yin Chau, Manuel Rojo, Anthony H. V. Schapira, and Jan-Willem Taanman. 2010. "Mitofusin 1 and Mitofusin 2 Are Ubiquitinated in a PINK1/parkin-Dependent Manner upon Induction of Mitophagy." *Human Molecular Genetics* 19 (24): 4861–70. doi:10.1093/hmg/ddq419.
- Gerhold, Joachim M., Şirin Cansiz-Arda, Madis Löhmus, Oskar Engberg, Aurelio Reyes, Helga van Rennes, Alberto Sanz, Ian J. Holt, Helen M. Cooper, and Johannes N. Spelbrink. 2015. "Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure." *Scientific Reports* 5: 15292. doi:10.1038/srep15292.
- Gilkerson, Robert, Liliana Bravo, Iraselia Garcia, Norma Gaytan, Alan Herrera, Alicia Maldonado, and Brandi Quintanilla. 2013. "The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (5). doi:10.1101/cshperspect.a011080.
- Gilkerson, Robert W., Eric A. Schon, Evelyn Hernandez, and Mercy M. Davidson. 2008. "Mitochondrial Nucleoids Maintain Genetic Autonomy but Allow for Functional Complementation." *The Journal of Cell Biology* 181 (7): 1117–28. doi:10.1083/jcb.200712101.
- Giraud, Marie-France, Patrick Paumard, Vincent Soubannier, Jacques Vaillier, Geneviève Arselin, Bénédicte Salin, Jacques Schaeffer, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, and Jean Velours. 2002. "Is There a Relationship between the Supramolecular Organization of the Mitochondrial ATP Synthase and the Formation of Cristae?" *Biochimica Et Biophysica Acta* 1555 (1-3): 174–80.
- Gomes, Ligia C., Giulietta Di Benedetto, and Luca Scorrano. 2011. "During Autophagy Mitochondria Elongate, Are Spared from Degradation and Sustain Cell Viability." *Nature Cell Biology* 13 (5): 589–98. doi:10.1038/ncb2220.
- Gomes, Ligia C., and Luca Scorrano. 2013. "Mitochondrial Morphology in Mitophagy and Macroautophagy." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (1): 205–12. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.012.
- Guedes-Dias, Pedro, João de Proença, Tânia R. Soares, Ana Leitão-Rocha, Brígida R. Pinho, Michael R. Duchon, and Jorge M. A. Oliveira. 2015. "HDAC6 Inhibition Induces Mitochondrial Fusion, Autophagic Flux and Reduces Diffuse Mutant Huntingtin in Striatal Neurons." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1852 (11): 2484–93. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.012.
- Guedes-Dias, Pedro, and Jorge M. A. Oliveira. 2013a. "Lysine Deacetylases and Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1832 (8): 1345–59. doi:10.1016/j.bbadis.2013.04.005.
- . 2013b. "Lysine Deacetylases and Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832 (8): 1345–59. doi:10.1016/j.bbadis.2013.04.005.
- Guillery, Olwenn, Florence Malka, Thomas Landes, Emmanuelle Guillou, Craig Blackstone, Anne Lombès, Pascale Belenguer, Damien Arnoult, and Manuel Rojo. 2008. "Metalloprotease-Mediated OPA1 Processing Is Modulated by the

- Mitochondrial Membrane Potential." *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 100 (5): 315–25. doi:10.1042/BC20070110.
- Guo, Wen, Lan Jiang, Shalender Bhasin, Shaharyar M. Khan, and Russell H. Swerdlow. 2009. "DNA Extraction Procedures Meaningfully Influence qPCR-Based mtDNA Copy Number Determination." *Mitochondrion* 9 (4): 261–65. doi:10.1016/j.mito.2009.03.003.
- Habersetzer, Johann, Isabelle Larrieu, Muriel Priault, Bénédicte Salin, Rodrigue Rossignol, Daniel Brèthes, and Patrick Paumard. 2013. "Human F1F0 ATP Synthase, Mitochondrial Ultrastructure and OXPHOS Impairment: A (Super-)Complex Matter?" *PLoS ONE* 8 (10). doi:10.1371/journal.pone.0075429.
- Habersetzer, Johan, Widade Ziani, Isabelle Larrieu, Claire Stines-Chaumeil, Marie-France Giraud, Daniel Brèthes, Alain Dautant, and Patrick Paumard. 2013. "ATP Synthase Oligomerization: From the Enzyme Models to the Mitochondrial Morphology." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (1): 99–105. doi:10.1016/j.biocel.2012.05.017.
- Hackenbrock, C. R. 1981. "Energy-Linked Condensed-Orthodox Ultrastructural Transformations in Mitochondria." *Chemotherapy* 27 Suppl 2: 21–26.
- Haggarty, Stephen J., Kathryn M. Koeller, Jason C. Wong, Christina M. Grozinger, and Stuart L. Schreiber. 2003. "Domain-Selective Small-Molecule Inhibitor of Histone Deacetylase 6 (HDAC6)-Mediated Tubulin Deacetylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8): 4389–94. doi:10.1073/pnas.0430973100.
- Handschin, Christoph, James Rhee, Jiandie Lin, Paul T. Tarr, and Bruce M. Spiegelman. 2003. "An Autoregulatory Loop Controls Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1alpha Expression in Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12): 7111–16. doi:10.1073/pnas.1232352100.
- Hara, Yuki, and Akatsuki Kimura. 2011. "Cell-Size-Dependent Control of Organelle Sizes During Development." In *Cell Cycle in Development*, edited by Jacek Z. Kubiak, 93–108. Results and Problems in Cell Differentiation. Springer Berlin Heidelberg. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-19065-0\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-19065-0_5).
- Hardie, D. Grahame. 2011. "AMP-Activated Protein Kinase—an Energy Sensor That Regulates All Aspects of Cell Function." *Genes & Development* 25 (18): 1895–1908. doi:10.1101/gad.17420111.
- Hatch, Anna L., Pinar S. Gurel, and Henry N. Higgs. 2014. "Novel Roles for Actin in Mitochondrial Fission." *J Cell Sci* 127 (21): 4549–60. doi:10.1242/jcs.153791.
- Heytler, P. G., and W. W. Prichard. 1962. "A New Class of Uncoupling Agents--Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7 (May): 272–75.
- Hirota, Yuko, Shun-ichi Yamashita, Yusuke Kurihara, Xiulian Jin, Masamune Aihara, Tetsu Saigusa, Dongchon Kang, and Tomotake Kanki. 2015. "Mitophagy Is Primarily due to Alternative Autophagy and Requires the MAPK1 and

- MAPK14 Signaling Pathways." *Autophagy* 11 (2): 332–43. doi:10.1080/15548627.2015.1023047.
- Hirschey, Matthew D., Tadahiro Shimazu, John A. Capra, Katherine S. Pollard, and Eric Verdin. 2011. "SIRT1 and SIRT3 Deacetylate Homologous Substrates: AceCS1,2 and HMGCS1,2." *Aging* 3 (6): 635–42.
- Hollenbeck, Peter J., and William M. Saxton. 2005. "The Axonal Transport of Mitochondria." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 23): 5411–19. doi:10.1242/jcs.02745.
- Holt, Ian J., Dave Speijer, and Thomas B. L. Kirkwood. 2014. "The Road to Rack and Ruin: Selecting Deleterious Mitochondrial DNA Variants." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1646). doi:10.1098/rstb.2013.0451.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer, and H. T. Jacobs. 2000. "Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA." *Cell* 100 (5): 515–24.
- Houstek, Josef, Andrea Pícková, Alena Vojtísková, Tomáš Mráček, Petr Pecina, and Pavel Jesina. 2006. "Mitochondrial Diseases and Genetic Defects of ATP Synthase." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757 (9-10): 1400–1405. doi:10.1016/j.bbabo.2006.04.006.
- Houtkooper, Riekelt H., Carles Cantó, Ronald J. Wanders, and Johan Auwerx. 2010. "The Secret Life of NAD<sup>+</sup>: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways." *Endocrine Reviews* 31 (2): 194–223. doi:10.1210/er.2009-0026.
- Howng, Shen-Long, Wei-Di Sy, Tai-Shan Cheng, Ann-Shung Lieu, Chihuei Wang, Wen-Shyong Tzou, Chung-Lung Cho, and Yi-Ren Hong. 2004. "Genomic Organization, Alternative Splicing, and Promoter Analysis of Human Dynamin-like Protein Gene." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (3): 766–72. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.172.
- Huang, Huiyan, Qun Gao, Xiaoxue Peng, Seok-Yong Choi, Krishna Sarma, Hongmei Ren, Andrew J. Morris, and Michael A. Frohman. 2011. "piRNA-Associated Germline Nuage Formation and Spermatogenesis Require MitoPLD Profusogenic Mitochondrial-Surface Lipid Signaling." *Developmental Cell* 20 (3): 376–87. doi:10.1016/j.devcel.2011.01.004.
- Hudson, Gavin, Patrizia Amati-Bonneau, Emma L. Blakely, Joanna D. Stewart, Langping He, Andrew M. Schaefer, Philip G. Griffiths, et al. 2008. "Mutation of OPA1 Causes Dominant Optic Atrophy with External Ophthalmoplegia, Ataxia, Deafness and Multiple Mitochondrial DNA Deletions: A Novel Disorder of mtDNA Maintenance." *Brain: A Journal of Neurology* 131 (Pt 2): 329–37. doi:10.1093/brain/awm272.
- Iborra, Francisco J., Hiroshi Kimura, and Peter R. Cook. 2004. "The Functional Organization of Mitochondrial Genomes in Human Cells." *BMC Biology* 2: 9. doi:10.1186/1741-7007-2-9.
- Ikeda, Masataka, Tomomi Ide, Takeo Fujino, Shinobu Arai, Keita Saku, Takamori Kakino, Henna Tynismaa, et al. 2015. "Overexpression of TFAM or Twinkle Increases mtDNA Copy Number and Facilitates Cardioprotection Associated

- with Limited Mitochondrial Oxidative Stress." *PloS One* 10 (3): e0119687. doi:10.1371/journal.pone.0119687.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, and Katsuyoshi Mihara. 2006. "Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1." *The EMBO Journal* 25 (13): 2966–77. doi:10.1038/sj.emboj.7601184.
- Ishihara, Naotada, Akihiro Jofuku, Yuka Eura, and Katsuyoshi Mihara. 2003. "Regulation of Mitochondrial Morphology by Membrane Potential, and DRP1-Dependent Division and FZO1-Dependent Fusion Reaction in Mammalian Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (4): 891–98.
- Ishihara, Naotada, Masatoshi Nomura, Akihiro Jofuku, Hiroki Kato, Satoshi O. Suzuki, Keiji Masuda, Hidenori Otera, et al. 2009. "Mitochondrial Fission Factor Drp1 Is Essential for Embryonic Development and Synapse Formation in Mice." *Nature Cell Biology* 11 (8): 958–66. doi:10.1038/ncb1907.
- Iuso, Arcangela, Salvatore Scacco, Claudia Piccoli, Francesco Bellomo, Vittoria Petruzzella, Raffaella Trentadue, Michele Minuto, et al. 2006. "Dysfunctions of Cellular Oxidative Metabolism in Patients with Mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 Genes of Complex I." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (15): 10374–80. doi:10.1074/jbc.M513387200.
- Jäger, Sibylle, Christoph Handschin, Julie St.-Pierre, and Bruce M. Spiegelman. 2007. "AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Action in Skeletal Muscle via Direct Phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (29): 12017–22. doi:10.1073/pnas.0705070104.
- Jayashankar, Vaishali, and Susanne M Rafelski. 2014. "Integrating Mitochondrial Organization and Dynamics with Cellular Architecture." *Current Opinion in Cell Biology*, Cell architecture, 26 (February): 34–40. doi:10.1016/j.ceb.2013.09.002.
- Ježek, P., T. Olejár, K. Smolková, J. Ježek, A. Dlasková, L. Plecítá-Hlavatá, J. Zelenka, et al. 2014. "Antioxidant and Regulatory Role of Mitochondrial Uncoupling Protein UCP2 in Pancreatic Beta-Cells." *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 63 Suppl 1: S73–91.
- Jin, Seok Min, Michael Lazarou, Chunxin Wang, Lesley A. Kane, Derek P. Narendra, and Richard J. Youle. 2010. "Mitochondrial Membrane Potential Regulates PINK1 Import and Proteolytic Destabilization by PARL." *The Journal of Cell Biology* 191 (5): 933–42. doi:10.1083/jcb.201008084.
- Kadenbach, Bernhard. 2003. "Intrinsic and Extrinsic Uncoupling of Oxidative Phosphorylation." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1604 (2): 77–94.
- Kamei, Satomi, Murielle Chen-Kuo-Chang, Chantal Cazevielle, Guy Lenaers, Aurélien Olichon, Pascale Bélanguer, Gautier Roussignol, et al. 2005. "Expression of the Opa1 Mitochondrial Protein in Retinal Ganglion Cells: Its Downregulation Causes Aggregation of the Mitochondrial Network." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (11): 4288–94. doi:10.1167/iovs.03-1407.
- Karbowski, Mariusz, and Albert Neutzner. 2012. "Neurodegeneration as a Consequence of Failed Mitochondrial Maintenance." *Acta Neuropathologica* 123 (2): 157–71. doi:10.1007/s00401-011-0921-0.

- Kaufman, Brett A., Nela Durisic, Jeffrey M. Mativetsky, Santiago Costantino, Mark A. Hancock, Peter Grutter, and Eric A. Shoubridge. 2007. "The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures." *Molecular Biology of the Cell* 18 (9): 3225–36. doi:10.1091/mbc.E07-05-0404.
- Kim, Insil, Sara Rodriguez-Enriquez, and John J. Lemasters. 2007. "Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462 (2): 245–53. doi:10.1016/j.abb.2007.03.034.
- Kim, J. Y., J.-M. Hwang, H. S. Ko, M.-W. Seong, B.-J. Park, and S. S. Park. 2005. "Mitochondrial DNA Content Is Decreased in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Neurology* 64 (6): 966–72. doi:10.1212/01.WNL.0000157282.76715.B1.
- Kirkin, Vladimir, David G. McEwan, Ivana Novak, and Ivan Dikic. 2009. "A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy." *Molecular Cell* 34 (3): 259–69. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.026.
- Kitahara, T., H. S. Li-Korotky, and C. D. Balaban. 2005. "Regulation of Mitochondrial Uncoupling Proteins in Mouse Inner Ear Ganglion Cells in Response to Systemic Kanamycin Challenge." *Neuroscience* 135 (2): 639–53. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.056.
- Kjer, P. 1959. "Infantile Optic Atrophy with Dominant Mode of Inheritance: A Clinical and Genetic Study of 19 Danish Families." *Acta Ophthalmologica. Supplementum* 164 (Supp 54): 1–147.
- Kleffner, Ilka, Caroline Wessling, Burkhard Gess, Catharina Korsukewitz, Thomas Allkemper, Anja Schirmacher, Peter Young, Jan Senderek, and Ingo W. Husstedt. 2015. "Behr Syndrome with Homozygous C19ORF12 Mutation." *Journal of the Neurological Sciences* 357 (1-2): 115–18. doi:10.1016/j.jns.2015.07.009.
- Kline, L. B., and J. S. Glaser. 1979. "Dominant Optic Atrophy. The Clinical Profile." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 97 (9): 1680–86.
- Knöferle, Johanna, Jan C. Koch, Thomas Ostendorf, Uwe Michel, Véronique Planchamp, Polyva Vutova, Lars Tönges, et al. 2010. "Mechanisms of Acute Axonal Degeneration in the Optic Nerve in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (13): 6064–69. doi:10.1073/pnas.0909794107.
- Knott, Andrew B., Guy Perkins, Robert Schwarzenbacher, and Ella Bossy-Wetzel. 2008. "Mitochondrial Fragmentation in Neurodegeneration." *Nature Reviews Neuroscience* 9 (7): 505–18. doi:10.1038/nrn2417.
- Koene, S., and J. Smeitink. 2009. "Mitochondrial Medicine: Entering the Era of Treatment." *Journal of Internal Medicine* 265 (2): 193–209. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02058.x.
- Kogelnik, A. M., M. T. Lott, M. D. Brown, S. B. Navathe, and D. C. Wallace. 1996. "MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database." *Nucleic Acids Research* 24 (1): 177–79.

- Komatsu, Masaaki, Satoshi Waguri, Masato Koike, Yu-Shin Sou, Takashi Ueno, Taichi Hara, Noboru Mizushima, et al. 2007. "Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice." *Cell* 131 (6): 1149–63. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035.
- Kong, Xingxing, Rui Wang, Yuan Xue, Xiaojun Liu, Huabing Zhang, Yong Chen, Fude Fang, and Yongsheng Chang. 2010a. "Sirtuin 3, a New Target of PGC-1 $\alpha$ , Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis." *PLoS ONE* 5 (7). doi:10.1371/journal.pone.0011707.
- . 2010b. "Sirtuin 3, a New Target of PGC-1 $\alpha$ , Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis." *PLoS ONE* 5 (7). doi:10.1371/journal.pone.0011707.
- Kopeck, Benjamin G., Gleb Shtengel, C. Shan Xu, David A. Clayton, and Harald F. Hess. 2012. "Correlative 3D Superresolution Fluorescence and Electron Microscopy Reveal the Relationship of Mitochondrial Nucleoids to Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6136–41. doi:10.1073/pnas.1121558109.
- Korobova, Farida, Vinay Ramabhadran, and Henry N. Higgs. 2013. "An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118): 464–67. doi:10.1126/science.1228360.
- Korolchuk, Viktor I., Fiona M. Menzies, and David C. Rubinsztein. 2009. "A Novel Link between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System." *Autophagy* 5 (6): 862–63.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, Hsiuchen Chen, J. Michael McCaffery, and David C. Chan. 2004. "Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5685): 858–62. doi:10.1126/science.1099793.
- Kowald, Axel, and Thomas Bl Kirkwood. 2011. "The Evolution and Role of Mitochondrial Fusion and Fission in Aging and Disease." *Communicative & Integrative Biology* 4 (5): 627–29. doi:10.4161/cib.4.5.17110.
- Kucharczyk, Roza, Michael Zick, Mailis Bietenhader, Malgorzata Rak, Elodie Couplan, Marc Blondel, Stéphane-Duvezin Caubet, and Jean-Paul di Rago. 2009. "Mitochondrial ATP Synthase Disorders: Molecular Mechanisms and the Quest for Curative Therapeutic Approaches." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain*, 1793 (1): 186–99. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.06.012.
- Kukat, Christian, Christian A. Wurm, Henrik Spähr, Maria Falkenberg, Nils-Göran Larsson, and Stefan Jakobs. 2011. "Super-Resolution Microscopy Reveals That Mammalian Mitochondrial Nucleoids Have a Uniform Size and Frequently Contain a Single Copy of mtDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33): 13534–39. doi:10.1073/pnas.1109263108.
- Kushnareva, Y. E., A. A. Gerencser, B. Bossy, W.-K. Ju, A. D. White, J. Waggoner, M. H. Ellisman, G. Perkins, and E. Bossy-Wetzels. 2013. "Loss of OPA1 Disturbs

- Cellular Calcium Homeostasis and Sensitizes for Excitotoxicity." *Cell Death and Differentiation* 20 (2): 353–65. doi:10.1038/cdd.2012.128.
- Kuusisto, E., T. Suuronen, and A. Salminen. 2001. "Ubiquitin-Binding Protein p62 Expression Is Induced during Apoptosis and Proteasomal Inhibition in Neuronal Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280 (1): 223–28. doi:10.1006/bbrc.2000.4107.
- Landes, Thomas, Laurent J. Emorine, Delphine Courilleau, Manuel Rojo, Pascale Belenguer, and Laetitia Arnauné-Pelloquin. 2010. "The BH3-only Bnip3 Binds to the Dynamin Opa1 to Promote Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis by Distinct Mechanisms." *EMBO Reports* 11 (6): 459–65. doi:10.1038/embor.2010.50.
- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, and D. A. Clayton. 1998. "Mitochondrial Transcription Factor A Is Necessary for mtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice." *Nature Genetics* 18 (3): 231–36. doi:10.1038/ng0398-231.
- Lee, Hyo-Sang, Hong Ma, Rita Cervera Juanes, Masahito Tachibana, Michelle Sparman, Joy Woodward, Cathy Ramsey, et al. 2012. "Rapid Mitochondrial DNA Segregation in Primate Preimplantation Embryos Precedes Somatic and Germline Bottleneck." *Cell Reports* 1 (5): 506–15. doi:10.1016/j.celrep.2012.03.011.
- Lee, Jee Suk, Young Geol Yoon, Seung Hee Yoo, Na Young Jeong, Seung Hun Jeong, Sang Yeob Lee, Dai-Il Jung, Seon-Yong Jeong, and Young Hyun Yoo. 2012. "Histone Deacetylase Inhibitors Induce Mitochondrial Elongation." *Journal of Cellular Physiology* 227 (7): 2856–69. doi:10.1002/jcp.23027.
- Lee, Jin Gu, Ju Hye Shin, Hyo Sup Shim, Chang Young Lee, Dae Joon Kim, Young Sam Kim, and Kyung Young Chung. 2015. "Autophagy Contributes to the Chemo-Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer in Hypoxic Conditions." *Respiratory Research* 16: 138. doi:10.1186/s12931-015-0285-4.
- Lee, W., J. Johnson, D. J. Gough, J. Donoghue, G. L. M. Cagnone, V. Vaghjiani, K. A. Brown, T. G. Johns, and J. C. St John. 2015. "Mitochondrial DNA Copy Number Is Regulated by DNA Methylation and Demethylation of POLGA in Stem and Cancer Cells and Their Differentiated Progeny." *Cell Death & Disease* 6 (2): e1664. doi:10.1038/cddis.2015.34.
- Lee, Yang-ja, Seon-Yong Jeong, Mariusz Karbowski, Carolyn L. Smith, and Richard J. Youle. 2004. "Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis." *Molecular Biology of the Cell* 15 (11): 5001–11. doi:10.1091/mbc.E04-04-0294.
- Legros, Frédéric, Florence Malka, Paule Frachon, Anne Lombès, and Manuel Rojo. 2004. "Organization and Dynamics of Human Mitochondrial DNA." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 13): 2653–62. doi:10.1242/jcs.01134.
- Lemasters, John J. 2014. "Variants of Mitochondrial Autophagy: Types 1 and 2 Mitophagy and Micromitophagy (Type 3)." *Redox Biology* 2 (June): 749–54. doi:10.1016/j.redox.2014.06.004.

- Lemasters, John J. 2005. "Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging." *Rejuvenation Research* 8 (1): 3–5. doi:10.1089/rej.2005.8.3.
- . 2014. "Variants of Mitochondrial Autophagy: Types 1 and 2 Mitophagy and Micromitophagy (Type 3)." *Redox Biology* 2: 749–54. doi:10.1016/j.redox.2014.06.004.
- Lenaers, Guy, Christian Hamel, Cécile Delettre, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, and Dan Milea. 2012a. "Dominant Optic Atrophy." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7: 46. doi:10.1186/1750-1172-7-46.
- . 2012b. "Dominant Optic Atrophy." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7 (July): 46. doi:10.1186/1750-1172-7-46.
- Lenaz, Giorgio, and Maria Luisa Genova. 2009. "Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject." *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (8): 961–1008. doi:10.1089/ars.2009.2704.
- Leruez, Stéphanie, Dan Milea, Sabine Defoort-Dhellemmes, Estelle Colin, Martine Crochet, Vincent Procaccio, Marc Ferré, et al. 2013. "Sensorineural Hearing Loss in OPA1-Linked Disorders." *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 7): e236. doi:10.1093/brain/aws340.
- Liesa, Marc, and Orian S. Shirihai. 2013. "Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure." *Cell Metabolism* 17 (4): 491–506. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002.
- Li, Sunan, Shan Xu, Brian A. Roelofs, Liron Boyman, W. Jonathan Lederer, Hiromi Sesaki, and Mariusz Karbowski. 2015. "Transient Assembly of F-Actin on the Outer Mitochondrial Membrane Contributes to Mitochondrial Fission." *The Journal of Cell Biology* 208 (1): 109–23. doi:10.1083/jcb.201404050.
- Liu, Song, Tomoyo Sawada, Seongsoo Lee, Wendou Yu, George Silverio, Philomena Alapatt, Ivan Millan, et al. 2012. "Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria." *PLoS Genetics* 8 (3). doi:10.1371/journal.pgen.1002537.
- Lodi, Raffaele, Caterina Tonon, Maria Lucia Valentino, Stefano Iotti, Valeria Clementi, Emil Malucelli, Piero Barboni, et al. 2004. "Deficit of in Vivo Mitochondrial ATP Production in OPA1-Related Dominant Optic Atrophy." *Annals of Neurology* 56 (5): 719–23. doi:10.1002/ana.20278.
- Lodi, Raffaele, Caterina Tonon, Maria Lucia Valentino, David Manners, Claudia Testa, Emil Malucelli, Chiara La Morgia, et al. 2011. "Defective Mitochondrial Adenosine Triphosphate Production in Skeletal Muscle from Patients with Dominant Optic Atrophy due to OPA1 Mutations." *Archives of Neurology* 68 (1): 67–73. doi:10.1001/archneurol.2010.228.
- Loiseau, Dominique, Arnaud Chevrollier, Christophe Verny, Virginie Guillet, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Marc Ferré, et al. 2007. "Mitochondrial Coupling Defect in Charcot-Marie-Tooth Type 2A Disease." *Annals of Neurology* 61 (4): 315–23. doi:10.1002/ana.21086.



- Lombard, David B., Frederick W. Alt, Hwei-Ling Cheng, Jakob Bunkenborg, Ryan S. Streeper, Raul Mostoslavsky, Jennifer Kim, et al. 2007. "Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation." *Molecular and Cellular Biology* 27 (24): 8807–14. doi:10.1128/MCB.01636-07.
- Lu, Bin, Jae Lee, Xiaobo Nie, Min Li, Yaroslav I. Morozov, Sundararajan Venkatesh, Daniel F. Bogenhagen, Dmitry Temiakov, and Carolyn K. Suzuki. 2013. "Phosphorylation of Human TFAM in Mitochondria Impairs DNA Binding and Promotes Degradation by the AAA+ Lon Protease." *Molecular Cell* 49 (1): 121–32. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.023.
- Luthi-Carter, Ruth, David M. Taylor, Judit Pallos, Emmanuel Lambert, Allison Amore, Alex Parker, Hilary Moffitt, et al. 2010. "SIRT2 Inhibition Achieves Neuroprotection by Decreasing Sterol Biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7927–32. doi:10.1073/pnas.1002924107.
- MacVicar, Thomas D. B., and Jon D. Lane. 2014. "Impaired OPA1-Dependent Cleavage of OPA1 and Reduced DRP1 Fission Activity Combine to Prevent Mitophagy in Cells That Are Dependent on Oxidative Phosphorylation." *Journal of Cell Science* 127 (Pt 10): 2313–25. doi:10.1242/jcs.144337.
- Malka, Florence, Anne Lombès, and Manuel Rojo. 2006. "Organization, Dynamics and Transmission of Mitochondrial DNA: Focus on Vertebrate Nucleoids." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (5-6): 463–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.001.
- Mannella, Carmen A. 2006. "Structure and Dynamics of the Mitochondrial Inner Membrane Cristae." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitochondrial Dynamics in Cell Life and Death*, 1763 (5–6): 542–48. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.006.
- Marelli, Cecilia, Patrizia Amati-Bonneau, Pascal Reynier, Valérie Layet, Antoine Layet, Giovanni Stevanin, Etienne Brissaud, Dominique Bonneau, Alexandra Durr, and Alexis Brice. 2011. "Heterozygous OPA1 Mutations in Behr Syndrome." *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 4): e169; author reply e170. doi:10.1093/brain/awq306.
- Maresca, Alessandra, Chiara la Morgia, Leonardo Caporali, Maria Lucia Valentino, and Valerio Carelli. 2013. "The Optic Nerve: A 'Mito-Window' on Mitochondrial Neurodegeneration." *Molecular and Cellular Neurosciences* 55 (July): 62–76. doi:10.1016/j.mcn.2012.08.004.
- Matsuda, Noriyuki, Shigeto Sato, Kahori Shiba, Kei Okatsu, Keiko Saisho, Clement A. Gautier, Yu-Shin Sou, et al. 2010. "PINK1 Stabilized by Mitochondrial Depolarization Recruits Parkin to Damaged Mitochondria and Activates Latent Parkin for Mitophagy." *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 211–21. doi:10.1083/jcb.200910140.
- Mattiasson, Gustav, Mehrdad Shamloo, Gunilla Gido, Kavitha Mathi, Gregor Tomasevic, Saili Yi, Craig H. Warden, et al. 2003. "Uncoupling Protein-2 Prevents Neuronal Death and Diminishes Brain Dysfunction after Stroke and Brain Trauma." *Nature Medicine* 9 (8): 1062–68. doi:10.1038/nm903.

- Mauro, Claudio, Shi Chi Leow, Elena Anso, Sonia Rocha, Anil K. Thotakura, Laura Tornatore, Marta Moretti, et al. 2011. "NF- $\kappa$ B Controls Energy Homeostasis and Metabolic Adaptation by Upregulating Mitochondrial Respiration." *Nature Cell Biology* 13 (10): 1272–79. doi:10.1038/ncb2324.
- Mayorov, Vladimir I., Angela J. Lowrey, Valerie Biousse, Nancy J. Newman, Susan D. Cline, and Michael D. Brown. 2008. "Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *BMC Biochemistry* 9: 22. doi:10.1186/1471-2091-9-22.
- May-Panloup, P., M. F. Chrétien, C. Jacques, C. Vasseur, Y. Malthièry, and P. Reynier. 2005. "Low Oocyte Mitochondrial DNA Content in Ovarian Insufficiency." *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (3): 593–97. doi:10.1093/humrep/deh667.
- McCarron, John G., Calum Wilson, Mairi E. Sandison, Marnie L. Olson, John M. Girkin, Christopher Saunter, and Susan Chalmers. 2013. "From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle." *Journal of Vascular Research* 50 (5): 357–71. doi:10.1159/000353883.
- McKinney, Emily A., and Marcos T. Oliveira. 2013. "Replicating Animal Mitochondrial DNA." *Genetics and Molecular Biology* 36 (3): 308–15. doi:10.1590/S1415-47572013000300002.
- Meeusen, Shelly, and Jodi Nunnari. 2003. "Evidence for a Two Membrane-Spanning Autonomous Mitochondrial DNA Replisome." *The Journal of Cell Biology* 163 (3): 503–10. doi:10.1083/jcb.200304040.
- Melser, Su, Etienne Hébert Chatelain, Julie Lavie, Walid Mahfouf, Caroline Jose, Emilie Obre, Susan Goorden, et al. 2013. "Rheb Regulates Mitophagy Induced by Mitochondrial Energetic Status." *Cell Metabolism* 17 (5): 719–30. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.014.
- Mishra, Prashant, and David C. Chan. 2014a. "Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (10): 634–46. doi:10.1038/nrm3877.
- . 2014b. "Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (10): 634–46. doi:10.1038/nrm3877.
- Misko, Albert, Sirui Jiang, Iga Wegorzewska, Jeffrey Milbrandt, and Robert H. Baloh. 2010. "Mitofusin 2 Is Necessary for Transport of Axonal Mitochondria and Interacts with the Miro/Milton Complex." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (12): 4232–40. doi:10.1523/JNEUROSCI.6248-09.2010.
- Misko, Albert L., Yo Sasaki, Elizabeth Tuck, Jeffrey Milbrandt, and Robert H. Baloh. 2012. "Mitofusin2 Mutations Disrupt Axonal Mitochondrial Positioning and Promote Axon Degeneration." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (12): 4145–55. doi:10.1523/JNEUROSCI.6338-11.2012.

- Mitchell, P. 1961. "Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism." *Nature* 191 (July): 144–48.
- . 1976. "Possible Molecular Mechanisms of the Protonmotive Function of Cytochrome Systems." *Journal of Theoretical Biology* 62 (2): 327–67.
- Mitra, Kasturi, Christian Wunder, Badrinath Roysam, Gang Lin, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2009. "A Hyperfused Mitochondrial State Achieved at G1-S Regulates Cyclin E Buildup and Entry into S Phase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (29): 11960–65. doi:10.1073/pnas.0904875106.
- Mohr, F. C., and C. Fewtrell. 1987. "Depolarization of Rat Basophilic Leukemia Cells Inhibits Calcium Uptake and Exocytosis." *The Journal of Cell Biology* 104 (3): 783–92.
- Molina, Anthony J. A., Jakob D. Wikstrom, Linsey Stiles, Guy Las, Hibo Mohamed, Alvaro Elorza, Gil Walzer, et al. 2009. "Mitochondrial Networking Protects Beta-Cells from Nutrient-Induced Apoptosis." *Diabetes* 58 (10): 2303–15. doi:10.2337/db07-1781.
- Moon, Ji-Hong, Seong Kug Eo, John Hwa Lee, and Sang-Youel Park. 2015. "Quercetin-Induced Autophagy Flux Enhances TRAIL-Mediated Tumor Cell Death." *Oncology Reports* 34 (1): 375–81. doi:10.3892/or.2015.3991.
- Moreno-Lastres, David, Flavia Fontanesi, Inés García-Consuegra, Miguel A. Martín, Joaquín Arenas, Antoni Barrientos, and Cristina Ugalde. 2012. "Mitochondrial Complex I Plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly." *Cell Metabolism* 15 (3): 324–35. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.015.
- Morselli, Eugenia, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, Alfredo Criollo, Maria Chiara Maiuri, Nektarios Tavernarakis, Frank Madeo, and Guido Kroemer. 2009. "Autophagy Mediates Pharmacological Lifespan Extension by Spermidine and Resveratrol." *Aging* 1 (12): 961–70.
- Moscat, Jorge, and Maria T. Diaz-Meco. 2009. "To Aggregate or Not to Aggregate? A New Role for p62." *EMBO Reports* 10 (8): 804. doi:10.1038/embor.2009.172.
- Müller-Rischart, Anne Kathrin, Anna Pils, Patrick Beaudette, Maria Patra, Kamyar Hadian, Maria Funke, Regina Peis, et al. 2013. "The E3 Ligase Parkin Maintains Mitochondrial Integrity by Increasing Linear Ubiquitination of NEMO." *Molecular Cell* 49 (5): 908–21. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.036.
- Nakaso, Kazuhiro, Yuko Yoshimoto, Toshiya Nakano, Takao Takeshima, Yoko Fukuhara, Kenichi Yasui, Shigeru Araga, Toru Yanagawa, Tetsuro Ishii, and Kenji Nakashima. 2004. "Transcriptional Activation of p62/A170/ZIP during the Formation of the Aggregates: Possible Mechanisms and the Role in Lewy Body Formation in Parkinson's Disease." *Brain Research* 1012 (1-2): 42–51. doi:10.1016/j.brainres.2004.03.029.
- Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, and Richard J. Youle. 2010. "PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin." *PLoS Biology* 8 (1): e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
- Narendra, Derek P., and Richard J. Youle. 2011. "Targeting Mitochondrial Dysfunction: Role for PINK1 and Parkin in Mitochondrial Quality Control."

- Antioxidants & Redox Signaling* 14 (10): 1929–38.  
doi:10.1089/ars.2010.3799.
- Nemoto, Shino, Maria M. Fergusson, and Toren Finkel. 2005. "SIRT1 Functionally Interacts with the Metabolic Regulator and Transcriptional Coactivator PGC-1 $\alpha$ ." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 16456–60. doi:10.1074/jbc.M501485200.
- Neupert, Walter, and Johannes M. Herrmann. 2007. "Translocation of Proteins into Mitochondria." *Annual Review of Biochemistry* 76: 723–49. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- Ngo, Huu B., Geoffrey A. Lovely, Rob Phillips, and David C. Chan. 2014. "Distinct Structural Features of TFAM Drive Mitochondrial DNA Packaging versus Transcriptional Activation." *Nature Communications* 5: 3077. doi:10.1038/ncomms4077.
- Nochez, Yannick, Sophie Arsene, Naig Gueguen, Arnaud Chevrollier, Marc Ferré, Virginie Guillet, Valérie Desquret, et al. 2009. "Acute and Late-Onset Optic Atrophy due to a Novel OPA1 Mutation Leading to a Mitochondrial Coupling Defect." *Molecular Vision* 15: 598–608.
- Olichon, Aurélien, Laurent J. Emorine, Eric Descoins, Laetitia Pelloquin, Laetitia Brichese, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, et al. 2002. "The Human Dynamin-Related Protein OPA1 Is Anchored to the Mitochondrial Inner Membrane Facing the Inter-Membrane Space." *FEBS Letters* 523 (1-3): 171–76.
- Olichon, Aurélien, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Thomas Landes, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J. Emorine, Valérie Mils, et al. 2006. "Mitochondrial Dynamics and Disease, OPA1." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitochondrial Dynamics in Cell Life and Death*, 1763 (5–6): 500–509. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.003.
- Oliveira, Marcos T., Jani Haukka, and Laurie S. Kaguni. 2015. "Evolution of the Metazoan Mitochondrial Replicase." *Genome Biology and Evolution* 7 (4): 943–59. doi:10.1093/gbe/evv042.
- Osteryoung, K. W. 2001. "Organelle Fission in Eukaryotes." *Current Opinion in Microbiology* 4 (6): 639–46.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M. Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J. Youle, and Katsuyoshi Mihara. 2010. "Mff Is an Essential Factor for Mitochondrial Recruitment of Drp1 during Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 191 (6): 1141–58. doi:10.1083/jcb.201007152.
- Palade, G. E. 1953. "An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1 (4): 188–211.
- Palikaras, Konstantinos, and Nektarios Tavernarakis. 2014. "Mitochondrial Homeostasis: The Interplay between Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis." *Experimental Gerontology* 56 (August): 182–88. doi:10.1016/j.exger.2014.01.021.
- Palmer, Catherine S., Kirstin D. Elgass, Robert G. Parton, Laura D. Osellame, Diana Stojanovski, and Michael T. Ryan. 2013. "Adaptor Proteins MiD49 and MiD51

- Can Act Independently of Mff and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission." *Journal of Biological Chemistry* 288 (38): 27584–93. doi:10.1074/jbc.M113.479873.
- Pandya, Jignesh D., James R. Pauly, and Patrick G. Sullivan. 2009. "The Optimal Dosage and Window of Opportunity to Maintain Mitochondrial Homeostasis Following Traumatic Brain Injury Using the Uncoupler FCCP." *Experimental Neurology* 218 (2): 381–89. doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.023.
- Pareyson, Davide, Paola Saveri, Anna Sagnelli, and Giuseppe Piscoquito. 2015. "Mitochondrial Dynamics and Inherited Peripheral Nerve Diseases." *Neuroscience Letters*. doi:10.1016/j.neulet.2015.04.001.
- Parra, Valentina, Hugo E. Verdejo, Myriam Iglewski, Andrea del Campo, Rodrigo Troncoso, Deborah Jones, Yi Zhu, et al. 2014. "Insulin Stimulates Mitochondrial Fusion and Function in Cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFκB-Opa-1 Signaling Pathway." *Diabetes* 63 (1): 75–88. doi:10.2337/db13-0340.
- Patten, David A, Jacob Wong, Mireille Khacho, Vincent Soubannier, Ryan J Mailloux, Karine Pilon-Larose, Jason G MacLaurin, et al. 2014. "OPA1-Dependent Cristae Modulation Is Essential for Cellular Adaptation to Metabolic Demand." *The EMBO Journal* 33 (22): 2676–91. doi:10.15252/embj.201488349.
- Payne, Marielle, Zhenglin Yang, Bradley J. Katz, Judith E. A. Warner, Christopher J. Weight, Yu Zhao, Erik D. Pearson, et al. 2004. "Dominant Optic Atrophy, Sensorineural Hearing Loss, Ptosis, and Ophthalmoplegia: A Syndrome Caused by a Missense Mutation in OPA1." *American Journal of Ophthalmology* 138 (5): 749–55. doi:10.1016/j.ajo.2004.06.011.
- Pesch, U. E., B. Leo-Kottler, S. Mayer, B. Jurklies, U. Kellner, E. Apfelstedt-Sylla, E. Zrenner, C. Alexander, and B. Wissinger. 2001. "OPA1 Mutations in Patients with Autosomal Dominant Optic Atrophy and Evidence for Semi-Dominant Inheritance." *Human Molecular Genetics* 10 (13): 1359–68.
- Peterkofsky, A., and C. Gazdar. 1979. "Escherichia Coli Adenylate Cyclase Complex: Regulation by the Proton Electrochemical Gradient." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (3): 1099–1103.
- Pohjoismäki, Jaakko L. O., J. Bradley Holmes, Stuart R. Wood, Ming-Yao Yang, Takehiro Yasukawa, Aurelio Reyes, J. Bailey Laura, et al. 2010. "Mammalian Mitochondrial DNA Replication Intermediates Are Essentially Duplex, but Contain Extensive Tracts of RNA/DNA Hybrid." *Journal of Molecular Biology* 397 (5): 1144–55. doi:10.1016/j.jmb.2010.02.029.
- Prachar, Jarmil. 2010. "Mouse and Human Mitochondrial Nucleoid--Detailed Structure in Relation to Function." *General Physiology and Biophysics* 29 (2): 160–74.
- Prieto, Javier, Marian León, Xavier Ponsoda, Ramón Sendra, Roque Bort, Raquel Ferrer-Lorente, Angel Raya, Carlos López-García, and Josema Torres. 2016. "Early ERK1/2 Activation Promotes DRP1-Dependent Mitochondrial Fission

- Necessary for Cell Reprogramming.” *Nature Communications* 7 (March). doi:10.1038/ncomms11124.
- Prudent, Julien, Rodolfo Zunino, Ayumu Sugiura, Sevan Mattie, Gordon C. Shore, and Heidi M. McBride. 2015. “MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death.” *Molecular Cell* 59 (6): 941–55. doi:10.1016/j.molcel.2015.08.001.
- Quirós, Pedro M., Andrew J. Ramsay, David Sala, Erika Fernández-Vizorra, Francisco Rodríguez, Juan R. Peinado, Maria Soledad Fernández-García, et al. 2012. “Loss of Mitochondrial Protease OMA1 Alters Processing of the GTPase OPA1 and Causes Obesity and Defective Thermogenesis in Mice.” *The EMBO Journal* 31 (9): 2117–33. doi:10.1038/emboj.2012.70.
- Rahn, Jennifer J., Krista D. Stackley, and Sherine S. L. Chan. 2013. “Opa1 Is Required for Proper Mitochondrial Metabolism in Early Development.” *PLOS ONE* 8 (3): e59218. doi:10.1371/journal.pone.0059218.
- Rajala, Nina, Joachim M. Gerhold, Peter Martinsson, Alexey Klymov, and Johannes N. Spelbrink. 2014. “Replication Factors Transiently Associate with mtDNA at the Mitochondrial Inner Membrane to Facilitate Replication.” *Nucleic Acids Research* 42 (2): 952–67. doi:10.1093/nar/gkt988.
- Rambold, Angelika S., Brenda Kostelecky, Natalie Elia, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2011. “Tubular Network Formation Protects Mitochondria from Autophagosomal Degradation during Nutrient Starvation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (25): 10190–95. doi:10.1073/pnas.1107402108.
- Rodriguez-Enriquez, Sara, Insil Kim, Robert T. Currin, and John J. Lemasters. 2006. “Tracker Dyes to Probe Mitochondrial Autophagy (mitophagy) in Rat Hepatocytes.” *Autophagy* 2 (1): 39–46.
- Rolfe, D. F., and M. D. Brand. 1996. “Contribution of Mitochondrial Proton Leak to Skeletal Muscle Respiration and to Standard Metabolic Rate.” *The American Journal of Physiology* 271 (4 Pt 1): C1380–89.
- Rönnbäck, Cecilia, Karen Grønskov, and Michael Larsen. 2014. “Retinal Vessel Diameters Decrease with Macular Ganglion Cell Layer Thickness in Autosomal Dominant Optic Atrophy and in Healthy Subjects.” *Acta Ophthalmologica* 92 (7): 670–74. doi:10.1111/aos.12378.
- Rouzier, Cécile, Sylvie Bannwarth, Annabelle Chaussonot, Arnaud Chevrollier, Annie Verschueren, Nathalie Bonello-Palot, Konstantina Fragaki, et al. 2012. “The MFN2 Gene Is Responsible for Mitochondrial DNA Instability and Optic Atrophy ‘plus’ Phenotype.” *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 1): 23–34. doi:10.1093/brain/awr323.
- Rusten, Tor Erik, and Harald Stenmark. 2010. “p62, an Autophagy Hero or Culprit?” *Nature Cell Biology* 12 (3): 207–9. doi:10.1038/ncb0310-207.
- Safiulina, Dzhamilja, Vladimir Veksler, Alexander Zharkovsky, and Allen Kaasik. 2006. “Loss of Mitochondrial Membrane Potential Is Associated with Increase in Mitochondrial Volume: Physiological Role in Neurons.” *Journal of Cellular Physiology* 206 (2): 347–53. doi:10.1002/jcp.20476.

- Samant, Sadhana A., Hannah J. Zhang, Zhigang Hong, Vinodkumar B. Pillai, Nagalingam R. Sundaresan, Donald Wolfgeher, Stephen L. Archer, David C. Chan, and Mahesh P. Gupta. 2014. "SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 to Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress." *Molecular and Cellular Biology* 34 (5): 807–19. doi:10.1128/MCB.01483-13.
- Sanchez-Varo, Raquel, Laura Trujillo-Estrada, Elisabeth Sanchez-Mejias, Manuel Torres, David Baglietto-Vargas, Ines Moreno-Gonzalez, Vanessa De Castro, et al. 2012. "Abnormal Accumulation of Autophagic Vesicles Correlates with Axonal and Synaptic Pathology in Young Alzheimer's Mice Hippocampus." *Acta Neuropathologica* 123 (1): 53–70. doi:10.1007/s00401-011-0896-x.
- Santel, A., and M. T. Fuller. 2001. "Control of Mitochondrial Morphology by a Human Mitofusin." *Journal of Cell Science* 114 (5): 867–74. <http://jcs.biologists.org/content/114/5/867>.
- Santel, Ansgar, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler, Richard J. Youle, and Margaret T. Fuller. 2003. "Mitofusin-1 Protein Is a Generally Expressed Mediator of Mitochondrial Fusion in Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 116 (13): 2763–74. doi:10.1242/jcs.00479.
- Sarzi, Emmanuelle, Claire Angebault, Marie Seveno, Naïg Gueguen, Benjamin Chaix, Guy Bielicki, Nathalie Boddaert, et al. 2012. "The Human OPA1delTTAG Mutation Induces Premature Age-Related Systemic Neurodegeneration in Mouse." *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 12): 3599–3613. doi:10.1093/brain/aws303.
- Satoh, M., and T. Kuroiwa. 1991. "Organization of Multiple Nucleoids and DNA Molecules in Mitochondria of a Human Cell." *Experimental Cell Research* 196 (1): 137–40.
- Saxton, William M., and Peter J. Hollenbeck. 2012. "The Axonal Transport of Mitochondria." *Journal of Cell Science* 125 (9): 2095–2104. doi:10.1242/jcs.053850.
- 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." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (23): 17578–82. doi:10.1074/jbc.M001174200.
- Scarpulla, Richard C. 2008. "Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function." *Physiological Reviews* 88 (2): 611–38. doi:10.1152/physrev.00025.2007.
- Schaaf, Christian P., Maria Blazo, Richard Alan Lewis, Ross E. Tonini, Hidehiro Takei, Jing Wang, Lee-Jun Wong, and Fernando Scaglia. 2011. "Early-Onset Severe Neuromuscular Phenotype Associated with Compound Heterozygosity for OPA1 Mutations." *Molecular Genetics and Metabolism* 103 (4): 383–87. doi:10.1016/j.ymgme.2011.04.018.
- Schägger, Hermann, and Kathy Pfeiffer. 2000a. "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *The EMBO Journal* 19 (8): 1777–83. doi:10.1093/emboj/19.8.1777.

- . 2000b. “Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria.” *The EMBO Journal* 19 (8): 1777–83. doi:10.1093/emboj/19.8.1777.
- Schägger, H., T. A. Link, W. D. Engel, and G. von Jagow. 1986. “Isolation of the Eleven Protein Subunits of the bc1 Complex from Beef Heart.” *Methods in Enzymology* 126: 224–37.
- Schwarz, Thomas L. 2013. “Mitochondrial Trafficking in Neurons.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6). doi:10.1101/cshperspect.a011304.
- Schwer, Bjoern, Jakob Bunkenborg, Regis O. Verdin, Jens S. Andersen, and Eric Verdin. 2006. “Reversible Lysine Acetylation Controls the Activity of the Mitochondrial Enzyme Acetyl-CoA Synthetase 2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10224–29. doi:10.1073/pnas.0603968103.
- Scorrano, Luca, Mona Ashiya, Karolyn Buttle, Solly Weiler, Scott A. Oakes, Carmen A. Mannella, and Stanley J. Korsmeyer. 2002. “A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis.” *Developmental Cell* 2 (1): 55–67.
- Shadel, G. S., and D. A. Clayton. 1997. “Mitochondrial DNA Maintenance in Vertebrates.” *Annual Review of Biochemistry* 66: 409–35. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.409.
- Shamseldin, Hanan E., Muneera Alshammari, Tarfa Al-Sheddi, Mustafa A. Salih, Hisham Alkhalidi, Amal Kentab, Gabriela M. Repetto, Mais Hashem, and Fowzan S. Alkuraya. 2012. “Genomic Analysis of Mitochondrial Diseases in a Consanguineous Population Reveals Novel Candidate Disease Genes.” *Journal of Medical Genetics* 49 (4): 234–41. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100836.
- Shin, Hye-Won, Chisa Shinotsuka, Seiji Torii, Kazuo Murakami, and Kazuhisa Nakayama. 1997. “Identification and Subcellular Localization of a Novel Mammalian Dynamin-Related Protein Homologous to Yeast Vps1p and Dnm1p.” *Journal of Biochemistry* 122 (3): 525–30. <http://jbc.oxfordjournals.org/content/122/3/525>.
- Skulachev, V. P. 1997. “Membrane-Linked Systems Preventing Superoxide Formation.” *Bioscience Reports* 17 (3): 347–66.
- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, and A. M. van der Bliek. 2001. “Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 12 (8): 2245–56.
- Sol, Eri Maria, Sebastian A. Wagner, Brian T. Weinert, Amit Kumar, Hyun-Seok Kim, Chu-Xia Deng, and Chunaram Choudhary. 2012. “Proteomic Investigations of Lysine Acetylation Identify Diverse Substrates of Mitochondrial Deacetylase sirt3.” *PLoS One* 7 (12): e50545. doi:10.1371/journal.pone.0050545.
- Song, Zhiyin, Hsiuchen Chen, Maja Fiket, Christiane Alexander, and David C. Chan. 2007. “OPA1 Processing Controls Mitochondrial Fusion and Is Regulated by mRNA Splicing, Membrane Potential, and Yme1L.” *The Journal of Cell Biology* 178 (5): 749–55. doi:10.1083/jcb.200704110.
- Soubannier, Vincent, Gian-Luca McLelland, Rodolfo Zunino, Emelie Braschi, Peter Rippstein, Edward A. Fon, and Heidi M. McBride. 2012. “A Vesicular



- Transport Pathway Shuttles Cargo from Mitochondria to Lysosomes." *Current Biology: CB* 22 (2): 135–41. doi:10.1016/j.cub.2011.11.057.
- Spiegel, Ronen, Ann Saada, Padraig J. Flannery, Florence Burté, Devorah Soiferman, Morad Khayat, Verónica Eisner, et al. 2016. "Fatal Infantile Mitochondrial Encephalomyopathy, Hypertrophic Cardiomyopathy and Optic Atrophy Associated with a Homozygous OPA1 Mutation." *Journal of Medical Genetics* 53 (2): 127–31. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103361.
- Spikings, Emma C., Jon Alderson, and Justin C. St John. 2007. "Regulated Mitochondrial DNA Replication during Oocyte Maturation Is Essential for Successful Porcine Embryonic Development." *Biology of Reproduction* 76 (2): 327–35. doi:10.1095/biolreprod.106.054536.
- Starkov, Anatoly A., Gary Fiskum, Christos Chinopoulos, Beverly J. Lorenzo, Susan E. Browne, Mulchand S. Patel, and M. Flint Beal. 2004. "Mitochondrial Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (36): 7779–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004.
- Stewart, James B., and Patrick F. Chinnery. 2015. "The Dynamics of Mitochondrial DNA Heteroplasmy: Implications for Human Health and Disease." *Nature Reviews. Genetics* 16 (9): 530–42. doi:10.1038/nrg3966.
- Stotland, Aleksandr, and Roberta A. Gottlieb. 2015. "Mitochondrial Quality Control: Easy Come, Easy Go." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitophagy*, 1853 (10, Part B): 2802–11. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.041.
- Suen, Der-Fen, Derek P. Narendra, Atsushi Tanaka, Giovanni Manfredi, and Richard J. Youle. 2010. "Parkin Overexpression Selects against a Deleterious mtDNA Mutation in Heteroplasmic Cybrid Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26): 11835–40. doi:10.1073/pnas.0914569107.
- Sugiura, Ayumu, Gian-Luca McLelland, Edward A. Fon, and Heidi M. McBride. 2014. "A New Pathway for Mitochondrial Quality Control: Mitochondrial-Derived Vesicles." *The EMBO Journal* 33 (19): 2142–56. doi:10.15252/embj.201488104.
- Sullivan, P. G., Joe E. Springer, Edward D. Hall, and Stephen W. Scheff. 2004. "Mitochondrial Uncoupling as a Therapeutic Target Following Neuronal Injury." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36 (4): 353–56. doi:10.1023/B:JOB.0000041767.30992.19.
- Tanaka, Atsushi, Megan M. Cleland, Shan Xu, Derek P. Narendra, Der-Fen Suen, Mariusz Karbowski, and Richard J. Youle. 2010. "Proteasome and p97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin." *The Journal of Cell Biology* 191 (7): 1367–80. doi:10.1083/jcb.201007013.
- Tondera, Daniel, Frank Czauderna, Katharina Paulick, Rolf Schwarzer, Jörg Kaufmann, and Ansgar Santel. 2005. "The Mitochondrial Protein MTP18 Contributes to Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 14): 3049–59. doi:10.1242/jcs.02415.

- Tondera, Daniel, Stéphanie Grandemange, Alexis Jourdain, Mariusz Karbowski, Yves Mattenberger, Sébastien Herzig, Sandrine Da Cruz, et al. 2009. "SLP-2 Is Required for Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion." *The EMBO Journal* 28 (11): 1589–1600. doi:10.1038/emboj.2009.89.
- Trounce, Ian. 2000. "Genetic Control of Oxidative Phosphorylation and Experimental Models of Defects." *Human Reproduction* 15 (suppl 2): 18–27. doi:10.1093/humrep/15.suppl\_2.18.
- Turrens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J. A. Molina, Hibo Mohamed, Jakob D. Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008a. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO Journal* 27 (2): 433–46. doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
- . 2008b. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO Journal* 27 (2): 433–46. doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
- Van Laar, Victor S., Beth Arnold, Steven J. Cassady, Charleen T. Chu, Edward A. Burton, and Sarah B. Berman. 2011. "Bioenergetics of Neurons Inhibit the Translocation Response of Parkin Following Rapid Mitochondrial Depolarization." *Human Molecular Genetics* 20 (5): 927–40. doi:10.1093/hmg/ddq531.
- Varanita, Tatiana, Maria Eugenia Soriano, Vanina Romanello, Tania Zaglia, Rubén Quintana-Cabrera, Martina Semenzato, Roberta Menabò, et al. 2015. "The OPA1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage." *Cell Metabolism* 21 (6): 834–44. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.007.
- Verny, C., D. Loiseau, C. Scherer, P. Lejeune, A. Chevrollier, N. Gueguen, V. Guillet, et al. 2008. "Multiple Sclerosis-like Disorder in OPA1-Related Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Neurology* 70 (13 Pt 2): 1152–53. doi:10.1212/01.wnl.0000289194.89359.a1.
- Vidoni, Sara, Claudia Zanna, Michela Rugolo, Emmanuelle Sarzi, and Guy Lenaers. 2013. "Why Mitochondria Must Fuse to Maintain Their Genome Integrity." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (4): 379–88. doi:10.1089/ars.2012.4800.
- Vielhaber, Stefan, Grazyna Debska-Vielhaber, Viktoriya Peeva, Susanne Schoeler, Alexei P. Kudin, Irina Minin, Stefanie Schreiber, et al. 2013. "Mitofusin 2 Mutations Affect Mitochondrial Function by Mitochondrial DNA Depletion." *Acta Neuropathologica* 125 (2): 245–56. doi:10.1007/s00401-012-1036-y.
- Vincow, Evelyn S., Gennifer Merrihew, Ruth E. Thomas, Nicholas J. Shulman, Richard P. Beyer, Michael J. MacCoss, and Leo J. Pallanck. 2013. "The PINK1-Parkin Pathway Promotes Both Mitophagy and Selective Respiratory Chain Turnover in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): 6400–6405. doi:10.1073/pnas.1221132110.

- Wallace, Douglas C. 2005. "The Mitochondrial Genome in Human Adaptive Radiation and Disease: On the Road to Therapeutics and Performance Enhancement." *Gene* 354 (July): 169–80. doi:10.1016/j.gene.2005.05.001.
- Wallace, Douglas C., Weiwei Fan, and Vincent Procaccio. 2010. "Mitochondrial Energetics and Therapeutics." *Annual Review of Pathology* 5: 297–348. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314.
- Walther, Dirk M., Drazen Papić, Martine P. Bos, Jan Tommassen, and Doron Rapaport. 2009. "Signals in Bacterial Beta-Barrel Proteins Are Functional in Eukaryotic Cells for Targeting to and Assembly in Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2531–36. doi:10.1073/pnas.0807830106.
- Wang, Chunxin, and Richard J. Youle. 2009. "The Role of Mitochondria in Apoptosis\*." *Annual Review of Genetics* 43: 95–118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850.
- Wang, Xinglong, Bo Su, Hyoung-gon Lee, Xinyi Li, George Perry, Mark A. Smith, and Xiongwei Zhu. 2009. "Impaired Balance of Mitochondria Fission and Fusion in Alzheimer Disease." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (28): 9090–9103. doi:10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.
- Wang, Xinnan, Dominic Winter, Ghazaleh Ashrafi, Julia Schlehe, Yao Liang Wong, Dennis Selkoe, Sarah Rice, Judith Steen, Matthew J. LaVoie, and Thomas L. Schwarz. 2011. "PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility." *Cell* 147 (4): 893–906. doi:10.1016/j.cell.2011.10.018.
- Wasiak, Sylwia, Rodolfo Zunino, and Heidi M. McBride. 2007. "Bax/Bak Promote Sumoylation of DRP1 and Its Stable Association with Mitochondria during Apoptotic Cell Death." *The Journal of Cell Biology* 177 (3): 439–50. doi:10.1083/jcb.200610042.
- Waterham, Hans R., Janet Koster, Carlo W.T. van Roermund, Petra A.W. Mooyer, Ronald J.A. Wanders, and James V. Leonard. 2007. "A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission." *New England Journal of Medicine* 356 (17): 1736–41. doi:10.1056/NEJMoa064436.
- White, Kathryn E., Vanessa J. Davies, Vanessa E. Hogan, Malgorzata J. Piechota, Philip P. Nichols, Douglas M. Turnbull, and Marcela Votruba. 2009. "OPA1 Deficiency Associated with Increased Autophagy in Retinal Ganglion Cells in a Murine Model of Dominant Optic Atrophy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (6): 2567–71. doi:10.1167/iovs.08-2913.
- Will, Yvonne, James Hynes, Vladimir I. Ogurtsov, and Dmitri B. Papkovsky. 2006. "Analysis of Mitochondrial Function Using Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes." *Nature Protocols* 1 (6): 2563–72. doi:10.1038/nprot.2006.351.
- Wooten, Marie W., Thangiah Geetha, J. Ramesh Babu, M. Lamar Seibenhener, Junmin Peng, Nancy Cox, Maria-T. Diaz-Meco, and Jorge Moscat. 2008. "Essential Role of Sequestosome 1/p62 in Regulating Accumulation of Lys63-Ubiquitinated Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (11): 6783–89. doi:10.1074/jbc.M709496200.

- Yarosh, Will, Jessica Monserrate, James Jiayuan Tong, Stephanie Tse, Phung Khanh Le, Kimberly Nguyen, Carrie B. Brachmann, Douglas C. Wallace, and Taosheng Huang. 2008. "The Molecular Mechanisms of OPA1-Mediated Optic Atrophy in *Drosophila* Model and Prospects for Antioxidant Treatment." *PLoS Genetics* 4 (1): e6. doi:10.1371/journal.pgen.0040006.
- Yasukawa, Takehiro, Aurelio Reyes, Tricia J. Cluett, Ming-Yao Yang, Mark Bowmaker, Howard T. Jacobs, and Ian J. Holt. 2006. "Replication of Vertebrate Mitochondrial DNA Entails Transient Ribonucleotide Incorporation throughout the Lagging Strand." *The EMBO Journal* 25 (22): 5358–71. doi:10.1038/sj.emboj.7601392.
- Yi, Muqing, David Weaver, and György Hajnóczky. 2004. "Control of Mitochondrial Motility and Distribution by the Calcium Signal: A Homeostatic Circuit." *The Journal of Cell Biology* 167 (4): 661–72. doi:10.1083/jcb.200406038.
- Yoon, Yisang, Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, and Mark A. McNiven. 2003. "The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-like Protein DLP1." *Molecular and Cellular Biology* 23 (15): 5409–20.
- Yoon, Y., and M. A. McNiven. 2001. "Mitochondrial Division: New Partners in Membrane Pinching." *Current Biology: CB* 11 (2): R67–70.
- Yu-Wai-Man, Patrick, Michael I. Trenell, Kieren G. Hollingsworth, Philip G. Griffiths, and Patrick F. Chinnery. 2011. "OPA1 Mutations Impair Mitochondrial Function in Both Pure and Complicated Dominant Optic Atrophy." *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 4): e164. doi:10.1093/brain/awq288.
- Zanna, Claudia, Anna Ghelli, Anna Maria Porcelli, Mariusz Karbowski, Richard J. Youle, Simone Schimpf, Bernd Wissinger, et al. 2008. "OPA1 Mutations Associated with Dominant Optic Atrophy Impair Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Fusion." *Brain* 131 (2): 352–67. doi:10.1093/brain/awm335.
- Zhang, Kezhong. 2010. "Integration of ER Stress, Oxidative Stress and the Inflammatory Response in Health and Disease." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 3 (1): 33–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2848304/>.
- Zhang, Xiaohong, Zhigang Yuan, Yingtao Zhang, Sarah Yong, Alexis Salas-Burgos, John Koomen, Nancy Olashaw, et al. 2007. "HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin." *Molecular Cell* 27 (2): 197–213. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.033.
- Zhao, Jian, Tong Liu, Shaobo Jin, Xinming Wang, Mingqi Qu, Per Uhlén, Nikolay Tomilin, Oleg Shupliakov, Urban Lendahl, and Monica Nistér. 2011. "Human MIEF1 Recruits Drp1 to Mitochondrial Outer Membranes and Promotes Mitochondrial Fusion rather than Fission: MIEF1, a Key Regulator of Mitochondrial Dynamics." *The EMBO Journal* 30 (14): 2762–78. doi:10.1038/emboj.2011.198.
- Zhong, Lei, and Raul Mostoslavsky. 2011. "Fine Tuning Our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology." *Cell Metabolism* 13 (6): 621–26. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.004.

Zhong, Minghao, Zhimin Lu, and David A. Foster. 2002. "Downregulating PKC Delta Provides a PI3K/Akt-Independent Survival Signal That Overcomes Apoptotic Signals Generated by c-Src Overexpression." *Oncogene* 21 (7): 1071–78. doi:10.1038/sj.onc.1205165.

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Mariame selma KANE .....  
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 **26 / 04 / 2016**

## Résumé

L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) est une maladie mitochondriale rare. Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) et les axones qui forment le nerf optique dégénèrent entraînant une perte visuelle progressive. Cette neuropathie héréditaire est liée aux mutations du gène *OPA1*. Différentes atteintes du système nerveux central, périphérique et autonome ont été rapportés chez des patients ADOA syndromiques avec des variations de l'âge d'apparition et de la gravité. La protéine mitochondriale *OPA1* est impliquée dans la fusion mitochondriale, la constriction des crêtes et la maintenance du génome mitochondrial. La conjonction d'une dynamique mitochondriale perturbée, d'une instabilité l'ADNmt et d'une altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale précipiterait la mort des CGRs et autres cellules neuronales. Les fibroblastes de patients ADOA permettent d'étudier la physiopathologie des différentes mutations du gène *OPA1*. Une caractérisation biochimique et par microscopie fluorescente nous a permis d'isoler des cellules de patients ADOA syndromiques présentant un défaut de couplage mitochondrial et un réseau mitochondrial hyperfragmenté. Nous avons montré une altération de la compaction de l'ADNmt et de la distribution des nucléoïdes. Une étude des voies autophagiques des cellules mutées *OPA1* montre une corrélation entre le défaut de couplage et l'activation de la mitophagie. Ces mécanismes physiopathologiques sont en accord avec l'aspect progressif de l'ADOA. La recherche de pistes thérapeutiques nous a permis de mettre en évidence un effet bénéfique d'un inhibiteur spécifique d'une histone-déacétylase, la tubacine, sur le phénotype des cellules mutées *OPA1*. L'hyper-acétylation des microtubules permet une réversion du phénotype du réseau mitochondrial, une biogénèse mitochondriale et une amélioration du défaut de couplage mitochondrial.

**Mots clés : Neuropathie optique, Dynamique mitochondriale, *OPA1*, Nucléoïde, Mitophagie**

## Abstract

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is a rare mitochondrial disease. Retinal ganglion cells (RGCs) and axons that form the optic nerve degenerate, resulting in progressive visual loss. This hereditary neuropathy is linked to mutations of the *OPA1* gene. Various alterations of the central nervous system, peripheral and autonomous have been reported in syndromic ADOA patients with variation in age of onset and severity. The mitochondrial protein OPA1 is involved in mitochondrial fusion, cristae constriction and mitochondrial genome maintenance. The conjunction of disturbed mitochondrial dynamics, mtDNA instability and impaired mitochondrial oxidative phosphorylation precipitate RGCs and other neuronal cells death. The use of ADOA patients' fibroblasts allows the pathophysiology study of different *OPA1* mutations. Biochemical characterization and fluorescent microscopy allowed the isolation of syndromic ADOA patients with mitochondrial network defects and mitochondrial uncoupling. We showed an alteration of mtDNA compaction and nucleoids' distribution. A study of the autophagic pathways in *OPA1*-mutated cells showed a correlation between partial uncoupling and an increased mitophagy response. These pathophysiological mechanisms are consistent with the progressive aspect of ADOA. The search for therapeutic approaches highlighted the beneficial effect of tubacine, a specific histone deacetylase's inhibitor, on *OPA1*-mutated-cells' phenotype. Microtubules hyperacetylation led to a reversal of mitochondrial network phenotype, an increased mitochondrial biogenesis and a tighter mitochondrial coupling.

**Key Word: Optic neuropathy, Mitochondrial dynamics, *OPA1*, Nucleoids, Mitophagy**



#### Résumé

L'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) est une maladie mitochondriale rare. Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) et les axones qui forment le nerf optique dégénèrent entraînant une perte visuelle progressive. Cette neuropathie héréditaire est liée aux mutations du gène *OPA1*. Différentes atteintes du système nerveux central, périphérique et autonome ont été rapportés chez des patients ADOA syndromiques avec des variations de l'âge d'apparition et de la gravité. La protéine mitochondriale *OPA1* est impliquée dans la fusion mitochondriale, la constriction des crêtes et la maintenance du génome mitochondrial. La conjonction d'une dynamique mitochondriale perturbée, d'une instabilité l'ADNmt et d'une altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale précipiterait la mort des CGRs et autres cellules neuronales. Les fibroblastes de patients ADOA permettent d'étudier la physiopathologie des différentes mutations du gène *OPA1*. Une caractérisation biochimique et par microscopie fluorescente nous a permis d'isoler des cellules de patients ADOA syndromiques présentant un défaut de couplage mitochondrial et un réseau mitochondrial hyperfragmenté. Nous avons montré une altération de la compaction de l'ADNmt et de la distribution des nucléoïdes. Une étude des voies autophagiques des cellules mutées *OPA1* montre une corrélation entre le défaut de couplage et l'activation de la mitophagie. Ces mécanismes physiopathologiques sont en accord avec l'aspect progressif de l'ADOA. La recherche de pistes thérapeutiques nous a permis de mettre en évidence un effet bénéfique d'un inhibiteur spécifique d'une histone-déacétylase, la tubacine, sur le phénotype des cellules mutées *OPA1*. L'hyper-acétylation des microtubules permet une réversion du phénotype du réseau mitochondrial, une biogénèse mitochondriale et une amélioration du défaut de couplage mitochondrial.

**Mots clés :** Neuropathie optique, Dynamique mitochondriale, *OPA1*, Nucléoïde, Mitophagie

#### Abstract

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is a rare mitochondrial disease. Retinal ganglion cells (RGCs) and axons that form the optic nerve degenerate, resulting in progressive visual loss. This hereditary neuropathy is linked to mutations of the *OPA1* gene. Various alterations of the central nervous system, peripheral and autonomous have been reported in syndromic ADOA patients with variation in age of onset and severity. The mitochondrial protein *OPA1* is involved in mitochondrial fusion, cristae constriction and mitochondrial genome maintenance. The conjunction of disturbed mitochondrial dynamics, mtDNA instability and impaired mitochondrial oxidative phosphorylation precipitate RGCs and other neuronal cells death. The use of ADOA patients' fibroblasts allows the pathophysiology study of different *OPA1* mutations. Biochemical characterization and fluorescent microscopy allowed the isolation of syndromic ADOA patients with mitochondrial network defects and mitochondrial uncoupling. We showed an alteration of mtDNA compaction and nucleoids' distribution. A study of the autophagy pathways in *OPA1*-mutated cells showed a correlation between partial uncoupling and an increased mitophagy response. These pathophysiological mechanisms are consistent with the progressive aspect of ADOA. The search for therapeutic approaches highlighted the beneficial effect of tubacin, a specific histone deacetylase's inhibitor, on *OPA1*-mutated-cells' phenotype. Microtubules hyper-acetylation led to a reversal of mitochondrial network phenotype, an increased mitochondrial biogenesis and a tighter mitochondrial coupling.

**Key Words:** Optic neuropathy, Mitochondrial dynamics, *OPA1*, Nucleoids, Mitophagy