



HAL
open science

Rôle du gène *Hacd2* au cours de l'embryogenèse et dans la vie postnatale de la souris

Nahed Khadhraoui

► To cite this version:

Nahed Khadhraoui. Rôle du gène *Hacd2* au cours de l'embryogenèse et dans la vie postnatale de la souris. Embryologie et organogenèse. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC0066 . tel-03564204

HAL Id: tel-03564204

<https://theses.hal.science/tel-03564204>

Submitted on 10 Feb 2022

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.

Université Paris-Est Créteil

École doctorale « Science de la vie et de la santé »

Spécialité « Biologie cellulaire »

Thèse de doctorat par **Nahed Khadhraoui**
en vue d'obtenir le grade de
docteur de l'Université Paris-Est Créteil

**Rôle du gène *Hacd2* au cours de l'embryogenèse
et dans la vie postnatale de la souris.**

codirigée par Fanny Pilot-Storck et Laurent Tiret,

et soutenue en public le 14 décembre 2020 devant le jury composé de :

Mme Lucile Miquerol	CNRS	Rapportrice
M. Michel Cohen-Tannoudji	CNRS	Rapporteur
Mme Véronique Duranthon	INRAE	Examinatrice
M. Vincent Procaccio	Université d'Angers	Examineur
Mme Fanny Pilot-Storck	Université Paris-Est	Directrice
M. Laurent Tiret	Université Paris-Est	Directeur

« Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir.

Autrement dit : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche. »

Proverbe Shadock

Remerciements

Je remercie en premier lieu les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux. Et tout d'abord Lucile Miquerol et Michel Cohen-Tannoudji qui ont accepté d'être rapportrice et rapporteur de ce travail, avec un temps très court pour l'évaluer. Merci. Un grand merci également à Véronique Duranthon et à Vincent Procaccio d'avoir accepté de juger ma thèse et pour le temps que vous y avez consacré.

Je remercie très sincèrement Fred Relaix de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 10 de l'IMRB en tant que doctorante : Fred, ton laboratoire est un lieu idéal pour réaliser une thèse. J'ai grandement apprécié ton impressionnante disponibilité pour gérer une équipe si grande que la nôtre, tout en maîtrisant l'ensemble des projets scientifiques.

Je remercie également les deux membres de mon comité de thèse, Sigolène Meilhac et Véronique Duranthon. Vos avis et vos conseils sur mon projet scientifique et ma carrière professionnelle ont été très précieux.

Je dois beaucoup à Virginie Rouiller-Fabre, responsable du Master « Reproduction et développement » de l'Université de Paris, qui m'a accordée sa confiance en m'inscrivant en Master 2, année de transition de vie pour moi. Merci Virginie pour votre accueil si chaleureux.

Ces travaux ont pu être réalisés grâce au soutien financier de la Fondation pour la Recherche Médicale et de l'Association Française contre les Myopathies (AFM). Je veux aussi remercier le Ministère tunisien de l'Enseignement et de la Recherche pour la bourse annuelle que j'ai reçue en 2014 et sans laquelle je ne serai pas venue en France.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à Fanny Pilot-Storck et Laurent Tiret, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre durant ces quatre ans de thèse. Merci pour votre rigueur, votre modestie et pour votre aide à l'élaboration de ce travail, pour votre disponibilité, votre accueil et vos conseils précieux.

Pour Fanny qui a assuré l'essentiel de l'encadrement de ma thèse : je te remercie très sincèrement et je suis consciente de la quantité énorme de travail que tu as fournie pendant ces années et ces derniers mois, pour que les articles qui sont la base de ma thèse puissent être présentés ici. À ton contact j'ai énormément appris, techniquement mais également dans la manière d'appréhender et résoudre les problèmes ou encore de présenter mes résultats. Ton exigence dans le domaine m'a parfois fait un peu souffrir, mais au final m'a surtout fait beaucoup progresser. En plus de tout ce que tu m'as appris, tu m'as aussi donné beaucoup de liberté, dans l'organisation de mon travail et dans l'orientation de mon projet de recherche, ce qui m'a permis de vraiment profiter de mes années de thèse. Je suis consciente de la chance que j'ai eue de bénéficier d'une si bonne formation, je t'en suis très reconnaissante et t'en remercie chaleureusement.

Ma plus grande gratitude revient à Laurent pour la confiance qu'il m'a accordée. Je te remercie de m'avoir guidée durant ces cinq années, de m'avoir aidée et de m'avoir confié des projets si intéressants. Tu m'as vraiment transmis le « goût » de la recherche. Je te remercie également pour l'aide précieuse dans les dissections et certaines expériences réalisées sur les embryons de souris, j'ai vu à quel point tu aimais les observer dans le moindre détail, les photographier et j'espère avoir appris que prendre ce temps n'était pas inutile. Merci aussi pour ton aide à la rédaction de ce manuscrit de thèse.

Je dois à toi « Laurent » ma réussite et mon épanouissement tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel et je resterai toujours reconnaissante. J'ai eu toutes mes chances pour réussir mon avenir et le valoriser par la poursuite d'une vie dans laquelle je me sens utile. Pour Nicole, merci pour tes qualités humaines et ton aide pour que je sois intégrée en France, je n'oublie jamais que grâce à toi j'ai découvert le théâtre donc merci pour toutes les pièces de théâtre que tu m'as emmenées voir.

Je remercie les amis que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse, Ambre, Guillaume, Zeynab, Jean-Daniel, Inès, Isabel, Nicolas, Khaoutar, Cyrielle, Joana, Reem et Diana pour leur gentillesse et leur soutien permanent.

Aymeline ma copine, ma sœur ou bien plutôt mon âme sœur je te remercie d'être toujours aussi présente depuis plus de 5 ans, à mon écoute. Les moments que nous partageons ensemble sont uniques !

Notre « petit couple » qui prenait ses pizza, kebab et coca-cola va bientôt se séparer, j'espère ne pas avoir trop altéré ta santé mentale.

Tu sais qu'on n'a pas besoin de parler ou d'écrire ces mots car on se comprend et on devine ce qu'on pense réciproquement.

Un immense merci à toi Alex qui m'a supportée (dans presque tous les sens du terme) quotidiennement dans notre bureau. Les discussions scientifiques que nous avons eues m'ont formée et m'ont permis d'acquérir de bonnes bases scientifiques. Je te remercie pour ton enthousiasme, ton encouragement et ta grande disponibilité.

Mille mercis du fond du cœur pour toi Mélody pour la relecture de certaines parties de ma thèse et la correction des fautes de français, merci aussi pour ton soutien.

Encore un grand merci pour vous tous, votre amitié est un trésor !!!

Je tiens à remercier également les personnes du laboratoire, Laurent G., Yasmine pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont donnés pour la réalisation des différentes techniques citées dans ce manuscrit. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Un grand merci aux animalières Camille, Diana et Marine ; merci pour le soin que vous apportez aux souris et pour votre aide, même indirecte, dans la réalisation de ce travail.

Merci Lila notre super gestionnaire, pour ton sens de l'organisation, ta réactivité et ta patience. Merci pour ton aide, ta compréhension et ton soutien lors de mes déboires administratifs.

Ma rencontre avec plusieurs membres de Biopôle a considérablement enrichi mes travaux, je souhaite donc remercier Edouard Reyes-Gomez et tout le personnel du laboratoire d'anatomie-pathologique de l'EnvA « Sophie, Hélène et Jean Luc » pour la réalisation et l'analyse des coupes histologiques et surtout pour les belles photos d'histologie. J'ai également eu la chance de Rencontrer Pierre Deshuillers et Isabelle Lagrange dont l'expertise en hématologie a permis à mes travaux de prendre une autre dimension. Sans oublier le service d'urgence du ChuvA, en particulier Patrick Verwaerde et tous les étudiants vétérinaires de service, pour votre aide dans les analyses de sang réalisées sur nos animaux.

Grâce à mes directeurs de thèse, j'ai également eu la chance de participer à plusieurs collaborations qui ont toujours été assorties d'échanges scientifiques d'un grand intérêt : je remercie pour cela Sébastien Storck pour son accueil sympathique et chaleureux dans son laboratoire et pour sa coopération professionnelle. Je remercie

aussi Jérôme Picquereau et son étudiante Julie Pires Da Silva pour leu aides dans les analyses d'enzymologie.

L'aide de Christine Longin, Martine Leutheule dans les expériences de microscopie électronique ont fait beaucoup avancer le projet donc merci beaucoup pour ça.

Un grand merci pour toi Karine Renaud pour ton dépannage pour tes créneaux de microscopie électronique à balayage ou bien pour le fixateur, tu es une personne adorable. Tu m'as toujours accueillie avec un sourire malgré mes plans de dernière minute.

Finalement je remercie énormément les plateformes de lipidomique et leurs animateurs : Audrey à Châtenay, Jean-Paul à Dijon. Vous avez beaucoup fait pour aider à faire avancer le projet, merci à vous et à vos équipes.

Une page se tourne ! C'est avec émotion que s'achèvent mes cinq années de thèse. Ce fut une expérience riche tant au niveau scientifique qu'humain et ces moments ainsi que toutes les personnes rencontrées resteront dans mon esprit.

Les dernières lignes restent pour mes plus chers au monde :

Je remercie ENORMEMENT ma famille que j'ai laissée en Tunisie pour mener cette thèse, en particulier mes fantastiques parents « Mahmoud & Zohra », mon frère « Ramzi » et mes 7 sœurs « Saida, Charifa, Khaouter, Sabah, Faouzia, Thouraya et la petite Wafa », qui ont toujours cru en moi et qui se sont intéressés semaine après semaine à l'avancée de mes recherches. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

Toutes mes pensées vont aussi vers mes neveux et nièces, ces belles créatures sur terre et dont la plupart sont nées alors que je n'étais pas à leurs côtés je demande l'excuse.

Une pensée spéciale pour mon père, mon héros qui m'a toujours soutenue et m'a toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même. Je te dédie cette thèse.

Sans oublier de remercier mes chers Hamma-Naceur, Nahed, Walid, Lina, Adam, Raoudha et Khairi, ma deuxième Famille en France je vous adore !

Au cours des 5 dernières années, j'ai fait la plus belle des découvertes. Ma dernière pensée sera pour toi Youssef, merci pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour, merci d'avoir été toujours à mes côtés pour m'aider à avancer et surmonter les moments difficiles dont le mariage fait partie.

Résumé

La mutation du gène *HACD1* provoque chez le chien et l'être humain une myopathie caractérisée par une faiblesse musculaire et une fatigabilité. *HACD1*, comme ses trois autres paralogues, code une enzyme qui participe à l'élongation des acides gras à très longue chaîne dans le réticulum endoplasmique. À l'aide de souris *KnockOut* (KO) pour *Hacd1*, notre équipe a démontré l'implication de ce gène dans le développement musculaire puis a cherché à caractériser son rôle dans le métabolisme musculaire. J'ai participé à cette étude qui a révélé un rôle clé du gène *Hacd1* dans l'organisation et le fonctionnement mitochondrial dans le muscle. L'absence d'*Hacd1* affecte en particulier le couplage respiratoire en raison d'un défaut en cardiolipine, un phospholipide spécifique de la membrane interne mitochondriale.

En parallèle, j'ai consacré l'essentiel de ma thèse à étudier le rôle du gène *Hacd2*, ubiquitaire et proche d'*Hacd1*. Grâce à deux lignées de souris mutantes, j'ai pu montrer que l'absence totale d'*Hacd2* (KO) entraîne une létalité embryonnaire caractérisée par une malformation cardiovasculaire et un retard de croissance, et que sa perte de fonction partielle (*KnockDown*, KD), conduit à la mort des souriceaux avant quatre semaines suite à une cachexie. Les embryons *Hacd2*-KO et les souriceaux *Hacd2*-KD présentent tous deux un dysfonctionnement mitochondrial touchant à la fois la chaîne respiratoire et le couplage mitochondrial. Dans les embryons *Hacd2*-KO, ces anomalies sont associées à une forte teneur en cardiolipine oxydée.

De plus, les souriceaux *Hacd2*-KD développent une ichtyose progressive, démontrant le rôle d'*Hacd2* dans la synthèse des lipides très particuliers de la peau.

Mots clés : *Hacd2*, AGTLC, embryogenèse, cardiolipine, foie, glande sébacée, ichtyose, métabolisme, mitochondrie, myopathie, peau, rein.

Role of the *Hacd2* gene during embryogenesis and in the postnatal life of the mouse

Abstract

The mutation of the *HACD1* gene causes myopathy in dogs and humans, characterized by muscle weakness and fatigability. *HACD1*, like its three other paralogs, encodes an enzyme that participates in the elongation of very long-chain fatty acids in the endoplasmic reticulum. Using knockout (KO) mice for *Hacd1*, our team demonstrated the involvement of this gene in muscle development and then sought to characterize its role in muscle metabolism. I participated in this study, which revealed a key role of the *Hacd1* gene in mitochondrial organization and function in muscle. The absence of *Hacd1* particularly affects respiratory coupling due to a deficit in cardiolipin, a phospholipid specific to the inner mitochondrial membrane.

In parallel, I devoted most of my thesis to study the role of the *Hacd2* gene, which is ubiquitous and close to *Hacd1*. Thanks to two mutant mouse lines, I was able to show that the complete loss of function (KO) of *Hacd2* leads to embryonic lethality characterized by cardiovascular malformation and growth retardation, and that its partial loss of function (knockdown, KD), leads to the death of the mice before four weeks of age, following cachexia. Both *Hacd2*-KO embryos and *Hacd2*-KD mice exhibit mitochondrial dysfunction affecting both the respiratory chain and mitochondrial coupling. In *Hacd2*-KO embryos, these abnormalities are associated with high levels of oxidized cardiolipin.

In addition, *Hacd2*-KD mice develop progressive ichthyosis, demonstrating the role of *Hacd2* in the synthesis of the very particular skin lipids.

Key Words: *Hacd2*, VLCFA, embryogenesis, cardiolipin, liver, sebaceous gland, ichthyosis, metabolism, mitochondria, myopathy, skin, kidney.

Communication écrites & orales

Communications écrites

Conférences internationales

* Role of *Hacd2* during embryogenesis and in the physiology of skeletal and cardiac muscles
Nahed Khadhraoui, J. Blondelle, G. Courtin, S. Gadin, E. Reyes-Gomez, A. Prola, L. Tiret & Fanny Pilot-Storck.

Meeting SFBD 2016 "Shaping Life" du 24 au 27 mai 2016 à Marseille

* HACD2, a VLCFA synthesis enzyme, is essential to embryonic development, skin barrier and multiorgan metabolism

Nahed Khadhraoui, A. Prola, A. Vandestienne, G. Courtin, L. Guillaud, E. Reyes-Gomez, J. Pires Da-Silva, J. Piquereau, F. Relaix, L. Tiret & F. Pilot-Storck.

Icbl International Conferences on the Biosciences of lipids

"Lipid Fluxes and Metabolism from Fundamental Mechanisms to Human Disease" Finland 4-8 September 2018.

Conférences nationales

* Phénotype métabolique lié à la perte de fonction du gène *Hacd2* : exploration du phénotype mitochondrial

Nahed Khadhraoui¹, Alexandre Prola¹, Aymeline Vandestienne¹, Guillaume Courtin¹, Laurent Guillaud¹, Édouard Reyes-Gomez¹, Julie Pires Da Silva², Jérôme Piquereau², Frédéric Relaix¹, Laurent Tiret¹ and Fanny Pilot-Storck¹.

Congrès meetochondrie : colloque Hossegor (Landes) 14-17 mai 2017.

* Pléiotropie fonctionnelle du gène *Hacd2* et des acides gras à très longue chaîne : des nouveaux candidats dans le fonctionnement mitochondrial.

Nahed Khadhraoui

Congrès meetochondrie : colloque Pornichet 27-30 mai 2018.

* Pléiotropie fonctionnelle du gène *Hacd2* et des acides gras à très longue chaîne : focus sur les muscles cardiaques et squelettiques.

Nahed Khadhraoui, A. Prola, A. Vandestienne, G. Courtin, L. Guillaud, E. Reyes-Gomez, J. Pires Da-Silva, J. Piquereau, F. Relaix, L. Tiret & F. Pilot-Storck.

Journée Sciences de la Vie 2018 à Créteil, ***Maladies et agressions environnementales : pollutions, infections, alimentation, stress psycho-social, expositions professionnelles***, Paris 10 octobre 2018.

* *Hacd2*, a VLCFA synthesis enzyme, is essential to embryonic development, skin barrier and multiorgan metabolism.

Nahed Khadhraoui, A. Prola, A. Vandestienne, G. Courtin, L. Guillaud, E. Reyes-Gomez, J. Pires Da-Silva, J. Piquereau, F. Relaix, L. Tiret & F. Pilot-Storck.

Journée Sciences de la Vie 2019 à Créteil, **OMICS et Santé, Paris 9 octobre 2019.**

Communications orales

Conférences nationales

* Rôle du gène *Hacd2* au cours de l'embryogenèse et dans la physiologie des muscles squelettiques.

Nahed Khadhraoui

Journée de la recherche de l'EnvA : Maisons-Alfort 22 juin 2016.

* Role of the *Hacd2* gene during embryonic development and in postnatal life of the mouse.

Nahed Khadhraoui

Journée de la recherche de l'EnvA : Maisons-Alfort 5 juin 2018.

COURS ET FORMATIONS SCIENTIFIQUES

* Cours de langue anglaise

Université Paris Est Créteil, 100 heures 2017.

* Formation en biostatistiques

Université Paris Est Créteil, 18-21 avril 2016.

* Primary Phenotyping of mouse embryos

Université de Strasbourg 23-25th 2016- Strasbourg France.

Liste des sigles et acronymes

- ABCA12** : *ATP binding cassette subfamily A member 12*
- ABHD5** : *Abhydrolase Domain Containing 5 Lysophosphatidic Acid*
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ADNmt** : ADN mitochondrial
- ADNn** : ADN nucléaire
- ADP** : adénosine diphosphate
- AG** : acide gras
- AGPI** : acides gras polyinsaturés
- AGLC** : acides gras à longues chaînes
- AGTLC** : acides gras à très longue chaîne
- ARN** : acide ribonucléiques
- ATP** : adénosine triphosphate
- CE** : enveloppe cornée
- CEL** : enveloppe lipidique des cornéocytes
- Cers** : céramides
- CERS3** : Céramide Synthase 3
- CI** : complexe I de la chaîne respiratoire, NADH déshydrogénase
- CII** : complexe II de la chaîne respiratoire, succinate déshydrogénase
- CIII** : complexe III de la chaîne respiratoire, cytochrome c réductase
- CIV** : complexe IV de la chaîne respiratoire, cytochrome c oxydase
- CV** : complexe V de la chaîne respiratoire, ATP synthase
- CL** : cardiolipine
- CNM** : *CentroNuclear Myopathy*, myopathies centronucléaires
- Cn** : atome de carbone
- CoA** : coenzyme A
- CYP4F22** : *cytochrome P450 family 4 subfamily F polypeptide 22*
- ELOVL** : *fatty acid elongase*
- FADH2** : flavine adénine dinucleotide
- FATP4** : long-chain fatty acid transport protein 4

Fe : fer

FCCP : carbonyle-p-trifluorométhoxy-yphényl-hydrazon

HACD1 : 3-Hydroxy-Acyl Co-A Déshydratase 1

HACD1-fl : *HACD1-Full-length*

HACD2 : 3-Hydroxy-Acyl Co-A Déshydratase 2

HACD3 : 3-Hydroxy-Acyl Co-A Déshydratase 3

HACD4 : 3-Hydroxy-Acyl Co-A Déshydratase 4

H2O2 : peroxyde d'hydrogène

HSD17B12 : *17-bêta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12*

IMM : *inner mitochondrial membrane*, membrane interne mitochondriale

IMRB : Institut Mondor de recherche biomédicale

IMS : *intermembrane space*, espace intermembranaire

KAR : 3-ketoacyl-CoA réductase

kDa : kilodalton

KO : *Knock-out*, délété pour le gène

LDH : lactate déshydrogénase

LG : granules lamellaires

LPC : lysophosphatidylcholine

MUFA : *Mono-unsaturated fatty acid*, acide gras mono-insaturé

MELAS : encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et pseudo-*stroke*

MERRF : épilepsie myoclonique avec fibres *ragged-red*

MNGIE : myopathie, neuropathie, trouble gastro-intestinaux et encéphalopathie avec leucodystrophie

NAD+ : *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NARP : neuropathie ataxiante et rétinite pigmentaire

NGS : Next-Generation Sequencing

NLS : syndrome de Neu-Laxova

NMFs : facteurs naturels d'hydratation

O2 : dioxygène

OCR : taux de consommation d'oxygène

OMM : *outer mitochondrial membrane*, membrane externe

OXPHOS : phosphorylation oxydative

PAS2 : PASTICCINO2

PC : phosphatidylcholine

PHGDH : Phosphoglycérate Déshydrogénase

PNPLA1 : *Patatin-like phospholipase domain containing 1*

PTPLA : *Protein Tyrosine Phosphatase-Like A*

PTPLB : *Protein Tyrosine Phosphatase-Like B*

PTPLD : *Protein Tyrosine Phosphatase-Like D*

PSAT1 : Phosphoserine Aminotransferase 1

PSPH : Phosphoserine Phosphatase

PUFA : *poly-unsaturated fatty acid*, acide gras poly-insaturé

ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène

RS : réticulum sarcoplasmique

S : soufre

SDH : succinate déshydrogénase

SFA : *Saturated fatty acid*, acide gras saturé

SG : Glande sébacée

STGD3 : Stargardt 3

TCA : *tricarboxylic acid cycle*, cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs)

TECR : 2,3-trans-énoylCoA réductase

TIM : *translocase of inner membrane*, translocase de l'IMM

TOM : *translocase of outer membrane*, translocase de l'OMM

UCP1 : *Uncoupling protein 1*

ULC : ultra-longue chaîne

Table des matières

LISTE DES FIGURES	1
PREAMBULE	2
INTRODUCTION	4
1. ACIDES GRAS A TRES LONG CHAINE (AGTLC) ET LIPIDES COMPLEXES	4
1.1. <i>Données biochimiques élémentaires sur les AGTLC</i>	4
1.1.1. Structure et nomenclature des AGTLC.....	4
1.1.2. Biotransformation des AGTLC.....	6
1.2. <i>Le cycle d'élongation des AGTLC</i>	8
1.2.1. Un cycle en quatre étapes.....	8
1.2.2. Découverte du gène <i>PHS1</i> chez la levure et orthologue de la plante	8
<i>Phs1p</i> , une protéine transmembranaire à activité HACD essentielle à la survie cellulaire.	8
Conservation de l'activité enzymatique chez la plante.....	11
1.2.3. Les gènes <i>Hacd</i>	11
1.3. <i>Rôle des AGTLC</i>	13
1.3.1 Au niveau moléculaire	13
1.3.2 Au niveau cellulaire.....	13
1.3.3. Au niveau de l'organisme.....	17
Dans la formation de la barrière cutanée	17
Dans la spermatogenèse.....	17
Dans le métabolisme.....	17
Dans le système nerveux central	17
Dans l'œil	19
2. DEFICIENCE EN <i>HACD1</i> : MYOPATHIE PAR DEFAUT DE FUSION ET DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL	19
2.1. <i>Une myopathie modérée chez le chien, l'humain et la souris</i>	19
2.2. <i>Une hypotrophie musculaire par défaut de fusion des myoblastes</i>	21
2.3. <i>Un phénotype métabolique par dysfonctionnement mitochondrial</i>	23
3. PREREQUIS POUR L'ANALYSE PHENOTYPIQUE DES MUTANTS <i>HACD2</i>	25
3.1. <i>Données de la littérature sur Hacd2</i>	25
3.1.1. Rappels sur la fonction et l'expression de la protéine	25
3.1.2. <i>Hacd2</i> et mécanismes pathologiques en santé humaine.....	27
3.2. <i>Initiation du développement embryonnaire du système cardiovasculaire chez la souris</i>	28
3.2.1. Étapes clés du développement de l'embryon en période péri-implantatoire	28
De la vie libre à l'implantation	28
Formation des précurseurs cellulaires du placenta et du sac vitellin	30
L'embryon à trois feuillets et trois cavités au jour E7.5.....	30
L'organogenèse débutante entre E7.5 et E9.5.....	31
3.2.2. Formation des vaisseaux sanguins du sac vitellin et de l'embryon.....	32
Mise en place du sac vitellin et fonction d'absorption	32
Hématopoïèse et vasculogenèse dans le sac vitellin et l'embryon.....	33
Angiogenèse et remodelage vasculaire	36
3.2.3. Morphogenèse cardiaque entre E7.5 et E9.5.....	36
Croissant cardiogénique, champs cardiaques et dérivés	36
Du tube cardiaque au cœur à quatre cavités.....	39
Contrôle de la spécification des lignages cardiaques et gelée cardiaque.....	41

3.3.	<i>Fonction et dysfonction mitochondriale</i>	44
3.3.1.	Structure et fonction respiratoire de la mitochondrie	44
	Origine et structure des mitochondries	44
	Complexes de la chaîne respiratoire	46
	Phosphorylation oxydative ou couplage OXPHOS	48
3.3.2.	Quantification du couplage mitochondrial avec un Seahorse.....	49
3.3.3.	Les syndromes mitochondriaux : une dysfonction multi-organes	51
	Définition d'un syndrome mitochondrial et causes génétiques	51
	Présentation clinique et biomarqueurs utilisables	51
	Stratégies thérapeutiques en cours	53
3.4.	<i>AGTLC et homéostasie cutanée</i>	54
3.4.1.	Structure histologique de la peau	54
	Subdivision générale des couches de la peau	54
	Annexes cutanées	58
3.4.2.	Les mutants <i>Elovl</i> impliqués dans la physiologie cutanée	59
3.4.3.	ω -acylcéramides et fonction de la barrière épidermique	59
	Anomalies génétiques de la production des acylcéramides et ichtyose.....	59
3.4.4.	Composition lipidique du sébum.....	65
4.	BILAN ET OBJECTIF DE LA THESE	67
RESULTATS ET ARTICLES		69
PUBLICATION 1		69
	<i>Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle</i>	69
PUBLICATION 2		153
	<i>Hacd2 deficiency leads to early and lethal mitochondrial disease</i>	153
PUBLICATION 3		193
	<i>Hacd2 deficiency in mice causes ichthyosis and atrophy of sebaceous glands</i>	193
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		231
<i>HACD1</i> , METABOLISME MUSCULAIRE ET PREVENTION DE L'OBESITE		231
DEFICIENCE PARTIELLE EN <i>HACD2</i> : UN MODELE DE SYNDROME MITOCHONDRIAL		232
ÉLONGATION DES ACIDES GRAS A TRES LONGUE CHAINE : UNE FONCTION ESSENTIELLE, CONSERVEE ET PLEIOTROPE.....		234
	<i>Perte de fonction des protéines du complexe, létalité et défaut de production de lipides essentiels</i>	234
	<i>Performance mitochondriale : contenu et intégrité des cardiolipines</i>	236
	<i>Vasculogenèse et angiogenèse : un autre exemple de fusion membranaire défectueuse ?</i>	238
	<i>Barrière cutanée : Hacd2 et ω-o-acylcéramides ?</i>	240
BIBLIOGRAPHIE		243

Liste des Figures

Figure 1 : Organigramme de l'équipe BNMS	3
Figure 2 : Nomenclature des acides gras à très longue chaîne (AGTLC).....	5
Figure 3 : Élongation et désaturation des AGTLC chez les mammifères	7
Figure 4 : Protéine HACD, membre du complexe d'élongation des AGTLC	ç
Figure 5 : Profil d'expression chez l'homme des gènes <i>ELOVL</i>	10
Figure 6 : Dendogramme chez les eucaryotes des protéines apparentées à HACD2	12
Figure 7 : Activité HACD des protéines paralogues HACD1-4.....	14
Figure 8 : Biosynthèse des sphingolipides	15
Figure 9 : Acides gras à très longue chaîne et propriétés membranaires	16
Figure 10 : Phénotype résultant de l'inactivation chez la souris des gènes <i>Elvl1</i> ou <i>Elovl4</i> ...	18
Figure 11 : Myopathie chez les mammifères victimes d'une perte de fonction du gène <i>HACD1</i>	20
Figure 12 : Bilan schématique sur la contribution d'HACD1 dans la fusion des myoblastes ...	22
Figure 13 : Bilan schématique sur les conséquences de la perte de fonction d'HACD1 sur la fonction mitochondriale et le métabolisme	24
Figure 14 : Données préliminaires sur l'expression décrite du gène <i>HACD2</i> et sa contribution à l'activité HACD du muscle squelettique.....	26
Figure 15 : Développement initial de l'embryon de souris.....	29
Figure 16 : Vagues hématopoïétiques dans le conceptus de souris.....	35
Figure 17 : Vasculogenèse et angiogenèse vitelline	37
Figure 18 : Vasculogenèse embryonnaire.....	38
Figure 19 : Contribution des champs cardiaques embryonnaires au cœur à quatre cavités ...	40
Figure 20 : Évolution morphologique du cœur de l'embryon de souris entre les stades E7.5 et E9.5	42
Figure 21 : Mitochondrie, crêtes de la membrane interne et complexes de la phosphorylation oxydative	45
Figure 22 : Quantification normalisée du couplage mitochondrial.....	50
Figure 23 : Atteintes mitochondriales syndromiques.....	52
Figure 24 : Structure générale de l'épiderme et des annexes cutanées	55
Figure 25 : Synthèse épidermique d'acyl-céramides et de céramides liées aux protéines	60
Figure 26 : Voies de biosynthèse des acylglucosylcéramides dans la peau.....	62
Figure 27 : Gènes impliqués dans les étapes de synthèse des acylcéramides de l'enveloppe lipidique des kératinocytes et maladies causées par leur dysfonction.....	63
Figure 28 : Composition lipidique du sébum	65

Préambule

Le groupe de Génétique médicale comparée au sein duquel j'ai réalisé mon travail de thèse fait partie de l'équipe Relaix « Biologie du système neuromusculaire » de l'Institut Mondor de recherche biomédicale (IMRB ; Figure 1). Le point d'entrée de mon projet a été l'identification chez des chiens de race Labrador retriever atteints d'une myopathie congénitale, d'une mutation perte de fonction dans le gène *HACD1*, codant une 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Une analyse réalisée avant le démarrage de mon projet sur les souris knockout pour le gène *Hacd1*, générées au laboratoire et récapitulant le phénotype de myopathie, avait permis de quantifier une activité HACD résiduelle dans le muscle, attribuée à l'expression du gène paralogue le plus proche, *Hacd2*. C'est dans ce contexte scientifique et historique que l'inactivation génétique du gène *Hacd2* a été entreprise, avec pour objectif d'obtenir *in fine* des doubles mutants invalidés pour les gènes *Hacd1* et *Hacd2* et donc, a priori, totalement dépourvus d'activité HACD.

L'analyse phénotypique des souris invalidées pour le gène *Hacd2*, objet de cette thèse, a perturbé ce plan initial en révélant un rôle essentiel du gène *Hacd2* dans le développement embryonnaire précoce et l'homéostasie des jeunes souriceaux, ainsi qu'un rôle important dans la physiologie cutanée.

Ce manuscrit de thèse est organisé autour de la présentation de trois articles, l'un récemment accepté auquel j'ai participé, annexé au manuscrit et deux autres en cours de finalisation d'écriture et dont je suis la première auteure. La thèse est organisée autour de ces deux articles. L'un regroupe la caractérisation du phénotype de létalité embryonnaire et postnatale attribuée à un dysfonctionnement mitochondrial, l'autre contient les données sur le phénotype cutané. Chacun des deux articles est précédé d'une présentation succincte. L'ensemble est précédé d'une introduction générale et poursuivi par une discussion générale, à la suite des deux articles.

Ma langue maternelle est l'arabe. Je vis en France depuis six ans et n'éprouve plus de difficulté quotidienne à m'exprimer en français à l'oral. L'écrit académique est encore un peu difficile. En ce qui concerne l'anglais scientifique, je le lis suffisamment bien pour être autonome dans la lecture des articles, mais je ne suis pas autonome pour écrire un article complet. Pour toutes ces raisons, je souhaite être honnête et préciser que mes encadrants m'ont apporté une aide importante pour produire une partie des documents écrits présentés ici, jugeant qu'il était important d'éviter au lecteur un nombre trop élevé de difficultés syntaxiques. Les parties que j'ai rédigées moi-même, dans l'introduction ou la discussion générale, ont été relues pour les corrections de forme par Mélody, doctorante au laboratoire.

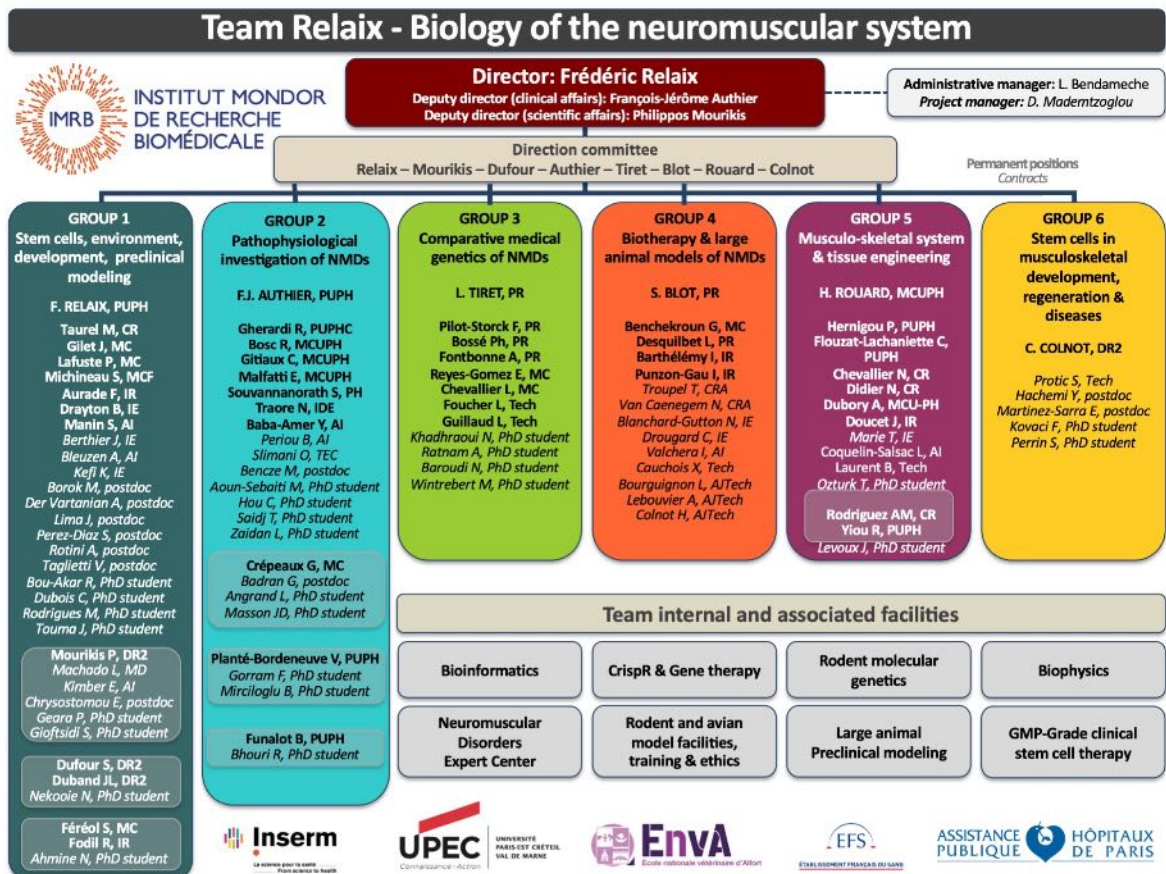


Figure 1 : Organigramme de l'équipe BNMS

L'équipe d'une centaine de personnes est dirigée par le Professeur Frédéric Relaix. Elle est organisée en six groupes interdépendants et dispose d'outils communs tels que les plateformes d'hébergement et d'analyse fonctionnelle des animaux (rongeurs et carnivores domestiques) ou les compétences en ingénierie moléculaire. J'ai réalisé ma thèse dans le groupe 3 de Génétique médicale comparée, localisé sur le campus de l'EnvA. L'équipe est sous cotutelle des organismes dont les logos figurent en dessous de l'organigramme.

Mise à jour Novembre 2020

d'après www.bnmslab.fr

Introduction

1. Acides gras à très long chaîne (AGTLC) et lipides complexes

Les lipides constituent l'une des classes majeures des molécules organiques qui fondent l'organisation et le fonctionnement du monde vivant. Plus de 43 000 lipides ont été répertoriés à ce jour (lipidmaps.org), subdivisés en huit catégories parmi lesquelles on peut citer les acides gras et leurs dérivés, catégorie la plus importante quantitativement, les glycérolipides, les glycérophospholipides et les sphingolipides qui sont des lipides complexes incorporant des acides gras (Sud *et al.*, 2007). Ces quatre catégories représentent plus des trois quarts des lipides décrits dans la base de données qui fait référence (Fahy *et al.*, 2009).

1.1. Données biochimiques élémentaires sur les AGTLC

1.1.1. Structure et nomenclature des AGTLC

Un acide gras est un acide monocarboxylique à chaîne ouverte hydrocarbonée et contenant en général 12 à 26 carbones chez les mammifères (Figure 2). Plus rarement, des acides gras contenant quatre à 10 carbones ou 28 à 36 carbones sont identifiés dans certains tissus. À partir de 18 carbones et au-delà, on les nomme acides gras "à très longue chaîne", dont le sigle français est AGTLC (VLCFA en anglais). Les acides gras peuvent être sous forme libre et dans ce cas leur transport dans le sang est favorisé par leur liaison à l'albumine via l'interaction ionique du groupement carboxylique sur les groupements basiques de la protéine (Curry *et al.*, 1999). Ils peuvent également être incorporés à des molécules d'alcool par une liaison ester et sous toutes leurs formes, ils jouent un rôle dans la structure des membranes biologiques, dans la production énergétique cellulaire ou dans la médiation humorale entre les organes.

La classification des acides gras se fonde sur le nombre d'atomes de carbone (C_n) et sur le nombre de doubles liaisons éthyléniques entre deux atomes de carbone ($C_n:D$), permettant de définir les acides gras saturés (SFA) sans double liaison, les acides gras mono-insaturés (MUFA) avec une unique double liaison et les acides gras polyinsaturés (PUFA) comportant plus d'une double liaison (Figure 2). En l'absence de double liaison, la structure d'un acide gras est linéaire et leur richesse dans les membranes biologiques favorise la formation d'un réseau moléculaire ordonné qui en limite la fluidité. Au contraire, la présence de doubles liaisons adoptant une configuration en *cis*, c'est-à-dire avec les deux atomes de carbone du

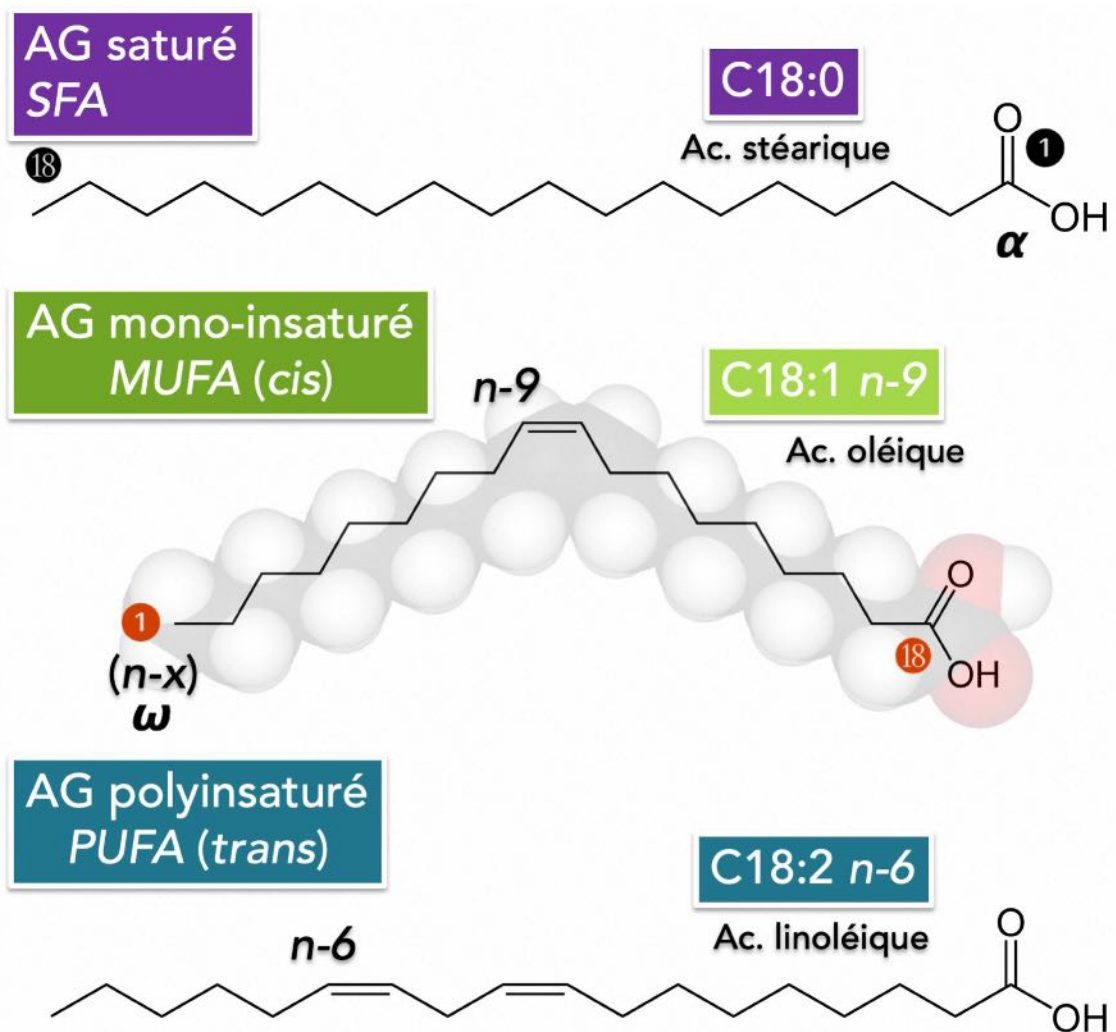


Figure 2 : Nomenclature
des acides gras à très longue chaîne (AGTLC)

Un acide gras (AG) est un acide carboxylique à chaîne aliphatique, il possède une chaîne carbonée contenant entre 12 à 26 atomes de carbones. Les chimistes considèrent le carbone du groupement carboxylique comme le carbone alpha, numéro 1 (numéros cerclés de noir). Les biologistes considèrent le premier carbone comme celui porteur du groupement méthyle (numéros cerclés d'orange). On appelle AGTLC les acides gras formés d'au moins 18 atomes de carbones. Il existe trois catégories d'AG, les AG saturés (SFA, en violet), mono-insaturés (MUFA, en vert) et polyinsaturés (PUFA, en bleu). Ils sont symbolisés par un "C", suivi du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne aliphatique, puis on précise le nombre d'insaturation(s) ainsi que la position de la première à partir du système de numérotation des biologistes ($n-x$; x correspond au numéro du premier carbone impliqué dans l'insaturation).

même côté de la liaison, induit une courbure de la chaîne hydrocarbonée d'autant plus marquée que le nombre de doubles liaisons augmente, produisant des molécules courbées, en forme de crochet ou arrondies. Cette configuration en *cis*, largement favorisée dans les structures biologiques, réduit la capacité de former un réseau ordonné et accroît donc la fluidité des membranes enrichies en acides gras insaturés.

Le nom d'usage des acides gras, utilisé en particulier en nutrition, provient de la source à partir de laquelle ils ont été initialement identifiés ou dans laquelle ils sont présents en grande quantité (par exemple l'acide palmitique), mais les biologistes préfèrent utiliser une nomenclature biochimique qui précise la position de la première double liaison à partir du carbone 1 de la chaîne carbonée, défini comme celui qui porte le groupement méthyle. Un acide gras dont la première double liaison concerne le troisième carbone à partir de l'extrémité méthylée de la chaîne s'écrira $n-3$, également abrégé par la lettre grecque oméga suivie de la position du carbone, dans ce cas $\omega 3$ (Figure 2). Au bilan, l'acide linoléique long de 18 carbones, contenant deux doubles liaisons dont la première est positionnée sur le sixième atome de carbone s'écrira $C18:2n-6$ ou $C18:2\omega 6$ (Figure 2).

Les acides gras présents en grande quantité dans nos organismes sont l'acide oléique ($C18:1n-9$; 45%), l'acide palmitique ($C16:0$; 25%), l'acide linoléique ($C18:2n-6$; 10%), l'acide stéarique ($C18:0$; 8%) et l'acide linoléique ($C18:3n-3$). Dans l'organisme, la fonction carboxylique est ionisée et pour cette raison, on parlera parfois d'oléate, de stéarate etc.

1.1.2. Biotransformation des AGTLC

La production d'acides gras saturés contenant 16 atomes de carbone ou moins est possible dans le foie, le tissu adipeux et la glande mammaire par ajout de molécules d'acétyl-coenzyme A et consommation d'ATP. Ce processus de lipogenèse est réalisé dans le cytoplasme des cellules par un complexe multienzymatique appelé synthase des acides gras. Les acides gras saturés et insaturés de 16 carbones ou plus sont pris en charge par un autre complexe multienzymatique inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique et capable d'allonger les acides gras de deux carbones à chaque tour de cycle (élongation) ou d'ajouter une double liaison à la chaîne aliphatique (désaturation) grâce à l'action de delta-désaturases qui catalysent l'ajout d'une double liaison à partir de l'extrémité carboxylique (Lee *et al.*, 2016), générant des acides gras mono-insaturés à partir d'acides gras saturés ou amplifiant l'insaturation des acides gras polyinsaturés (Figure 3). Il n'existe pas chez les mammifères de capacité suffisante pour produire des acides gras polyinsaturés à partir d'acides gras mono-insaturés et c'est la raison pour laquelle il convient pour survivre d'absorber par l'alimentation

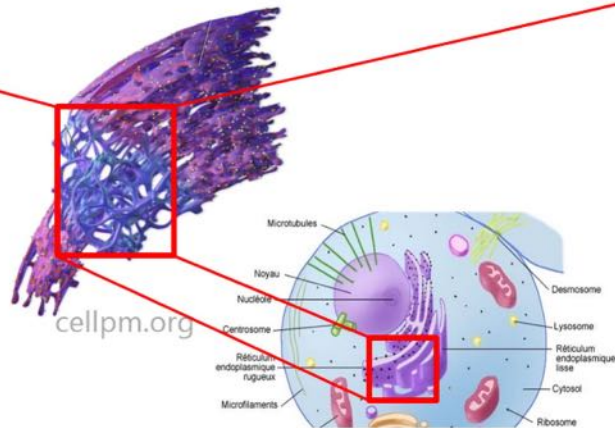
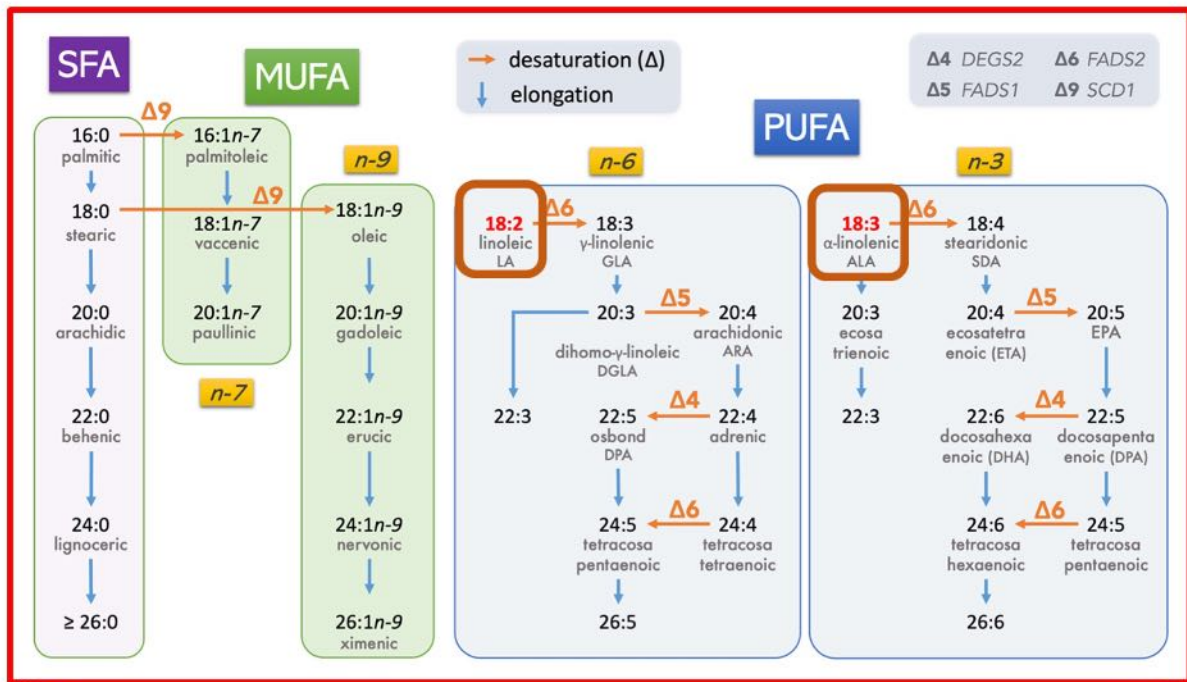


Figure 3 : Élongation et désaturation des AGTLC chez les mammifères

L'élongation des acides gras contenant au moins 16 atomes de carbone est réalisée dans le réticulum endoplasmique par les enzymes du complexe d'élongation qui allongent les acides gras de deux carbones à chaque tour de cycle d'élongation (flèches bleues).

Certains acides gras peuvent être pris en charge par des enzymes de désaturation, notamment les delta désaturases (flèches oranges), qui permettent d'ajouter une double liaison à la chaîne aliphatique du côté de l'extrémité carboxylique, générant des acides gras mono-insaturés à partir d'acides gras saturé ou amplifiant le nombre d'insaturation des acides gras polyinsaturés (d'après Sawai et al., 2017).

les deux acides linoléique (C18:2n-6) et α -linoléique (C18:3n-3), qualifiés d'indispensables ou parfois, d'essentiels. Le bilan des acides gras majeurs à très longue chaîne produits chez les mammifères par l'action combinée des complexes d'élongation et de désaturation au sein du réticulum endoplasmique est présenté sur la (Figure 3).

A l'instar des acides gras à longue chaîne, les AGTLC sont catabolisés via la β -oxydation au bénéfice d'une production d'ATP, mais contrairement aux AGLC, la dégradation des AGTLC se déroule dans le péroxysome plutôt que dans la mitochondrie qui prendra néanmoins le relais une fois la longueur de la chaîne réduite.

1.2. Le cycle d'élongation des AGTLC

1.2.1. Un cycle en quatre étapes

L'élongation des AGTLC est réalisée au cours d'un cycle composé de quatre étapes (Figure 4). Chez les mammifères, la première étape du cycle est assurée par les protéines ELOVL, codées par sept gènes différents, qui présentent des profils d'expression variés, partiellement chevauchants (Ohno et al.*et al.*, 2010) (Figure 5). Les sept protéines ELOVL possèdent de plus des spécificités de substrats, en fonction de la longueur de chaîne et du degré d'insaturation des acides gras. La combinaison de protéines ELOVL présentes dans un tissu est ainsi à l'origine de grandes différences dans le contenu en AGTLC dans les différents tissus (Agbaga et al.*et al.*, 2008; Ohno et al.*et al.*, 2010).

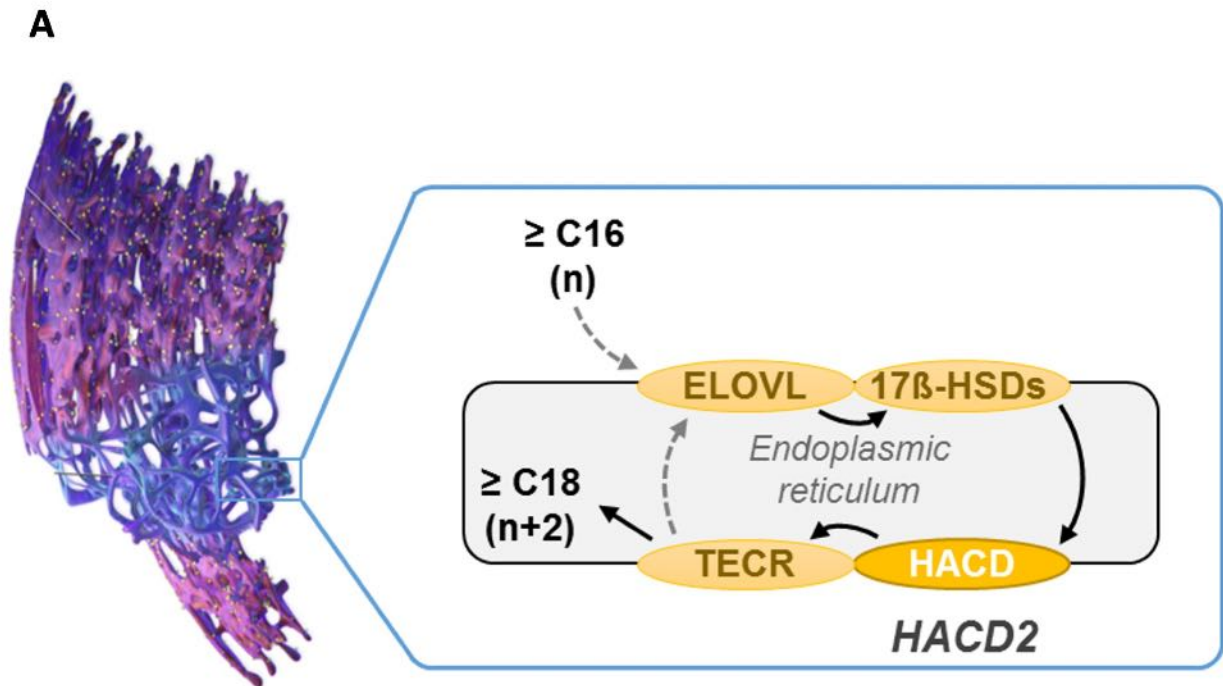
La deuxième et la quatrième réaction de réduction sont catalysées respectivement par des protéines codées par des gènes uniques nommés respectivement *HSD17B12* et *TECR* (Kihara, 2012).

La troisième réaction est assurée par les protéines HACD, au nombre de quatre chez les mammifères. Les gènes *HACD2* et *HACD3* présentent un profil d'expression large (Blondelle et al.*et al.*, 2015; Ikeda et al.*et al.*, 2008; Wang et al.*et al.*, 2004). L'expression du transcrit *HACD1-FL* est restreinte aux muscles striés, squelettiques et cardiaques (Blondelle et al.*et al.*, 2015). Le gène *HACD4* présente un profil d'expression quasiment restreint aux leucocytes (Ikeda et al.*et al.*, 2008).

1.2.2. Découverte du gène *PHS1* chez la levure et orthologue de la plante

Phs1p, une protéine transmembranaire à activité HACD essentielle à la survie cellulaire.

Une étude d'interaction génétique à grande échelle des voies de sécrétion vésiculaires a permis d'identifier que *PHS1*, l'orthologue chez *Saccharomyces cerevisiae* des gènes *HACD*



B

	Homme	Souris	Levure
Étape 1	<i>ELOVL1-7</i>	<i>Elov1-7</i>	<i>ELO1-3</i>
Étape 2	<i>HSD17B12</i>	<i>Hsd17b12</i>	<i>IFA38</i>
Étape 3	<i>HACD1-4</i>	<i>Hacd1-4</i>	<i>PHS1</i>
Étape 4	<i>TECR</i>	<i>Tecr</i>	<i>TSC13</i>

Figure 4 : Protéine HACD, membre du complexe d'élongation des AGTLC

(A) Au-delà de 16 carbones, les acides gras, dits "à très longue chaîne" sont allongés dans le réticulum endoplasmique au cours d'un cycle composé de quatre étapes. La première étape de condensation du cycle est assurée par les protéines ELOVL codant des élongases. Les deuxième et la quatrième étapes de réduction sont catalysées respectivement par la fonction 3-kétoacyl-CoA réductase de la 17βhydroxystéroïde déshydrogénase (HSD17B12) et *trans*-2-énoyl-CoA réductase (TECR). Les 3-hydroxyacyl-CoA déshydratases (HACD) sont des protéines à six domaines transmembranaires, enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elles catalysent la troisième étape de déshydratation (*adapté de Haslam and Kunst et al., 2013*). (B) Tableau récapitulatif de la nomenclature des gènes impliqués dans les quatre étapes successives du cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne dans l'espèce humaine, chez la souris et la levure.

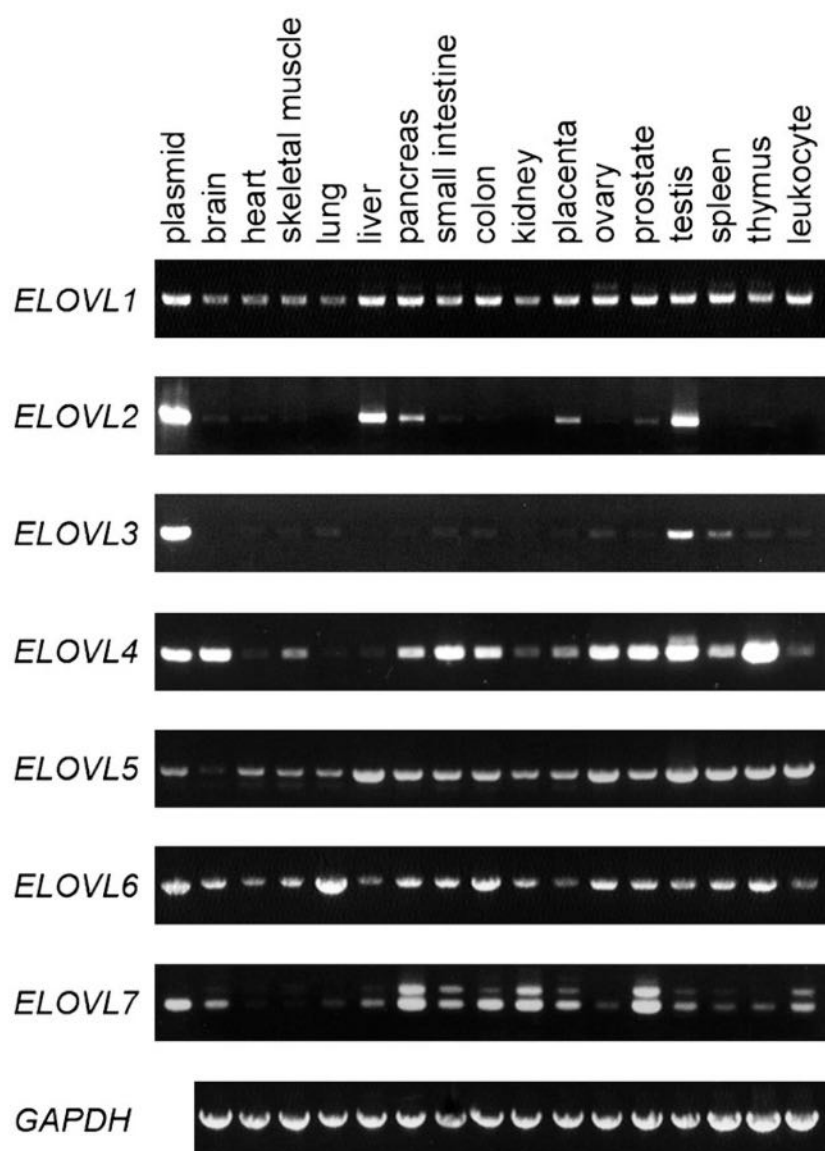


Figure 5 : Profil d'expression chez l'homme des gènes *ELOVL*

Les ARNm *ELOVL1*, *ELOVL5* et *ELOVL6* sont ubiquitaires. L'expression d'*ELOVL2* et d'*ELOVL3* est plus limitée, avec une expression commune dans le testicule et une expression dans le foie et le pancréas pour *ELOVL2*. Les ARNm d'*ELOVL4* sont détectés dans de nombreux organes, mais avec un niveau variable d'expression, des plus élevés dans le thymus, les testicules, l'intestin grêle, les ovaires et la prostate aux plus faibles dans le cœur, les poumons, le foie ou les leucocytes. L'ARNm *ELOVL7* s'exprime dans la plupart des tissus testés, sauf le cœur et les muscles squelettiques. L'expression est élevée dans le pancréas, les reins, la prostate et le côlon, tandis qu'elle est faible dans les poumons, les ovaires, la rate et le thymus (D'après Ohno et al., 2010).

chez *Saccharomyces cerevisiae*, code une protéine enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique via six domaines transmembranaires (Ikeda et al. *et al.*, 2008; Schuldiner et al. *et al.*, 2005).

Un élément clé dans l'investigation de la fonction moléculaire d'*HACD1* est venue de la découverte de son orthologue chez la levure (Denic and Weissman, 2007). C'est à cette époque qu'il a été identifié que ce gène code en effet une enzyme qui catalyse la troisième étape du cycle d'élongation des AGTLC. Sa perte de fonction, létale pour la levure, conduit à une accumulation des acides gras à longue chaîne (AGLC) ainsi qu'à une diminution des lipides complexes, incluant des AGTLC tels que les sphingolipides (Denic and Weissman, 2007; Ikeda et al. *et al.*, 2008).

Cette étude a pu montrer également que *PHS1* possédait une activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase (*HACD*) correspondant à la troisième étape du cycle d'élongation des AGTLC (Denic and Weissman, 2007) (Figure 4).

Conservation de l'activité enzymatique chez la plante

Des études effectuées chez *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence que la mutation du gène *PASTICCINO2* (*PAS2*), orthologue de *PHS1*, provoque un développement embryonnaire anormal et une réduction du contenu en AGTLC. La protéine *PAS2* codée par ce gène est également située dans le réticulum endoplasmique et présente 33% de similarité avec Phs1p (Bach, 2008). L'introduction du gène *PHS1* permet de contrer le développement défectueux et l'accumulation de bases sphingoïdes chez les plantes mutantes pour *PAS2*. Réciproquement, l'introduction du gène *PAS2* chez les levures mutantes pour *PHS1* rétablit leur croissance, ce qui permet d'affirmer que les protéines *PAS2* et Phs1p ont le même rôle d'élongation des acides gras (Bach et al. *et al.*, 2008). De fait, il a été mis en évidence une accumulation de 3-hydroxyacyl-CoA chez les plantes mutées pour *PAS2*. Sachant que cette molécule est le précurseur de la troisième étape dans le cycle d'élongation des acides gras, cela confirme que *PAS2*, tout comme Phs1p, est une *HACD* (Bach et al. *et al.*, 2008).

1.2.3. Les gènes *Hacd*

Chez les mammifères, il a été démontré que les protéines initialement nommées PTPLA, PTPLB, PTPLAD1 et PTPLAD2 sont des *HACD*, présentes au niveau du réticulum endoplasmique (Ikeda et al. *et al.*, 2008). Leur nom officiel a donc été modifié pour, respectivement, *HACD1*, *HACD2*, *HACD3*, *HACD4* (Ikeda et al. *et al.*, 2008).

Les séquences de *HACD1* et *HACD2* sont assez proches de celle de Phs1p avec des pourcentages respectivement de 24.1% ou 26.9% d'identité et 39.5% ou 45.8% de similarité.

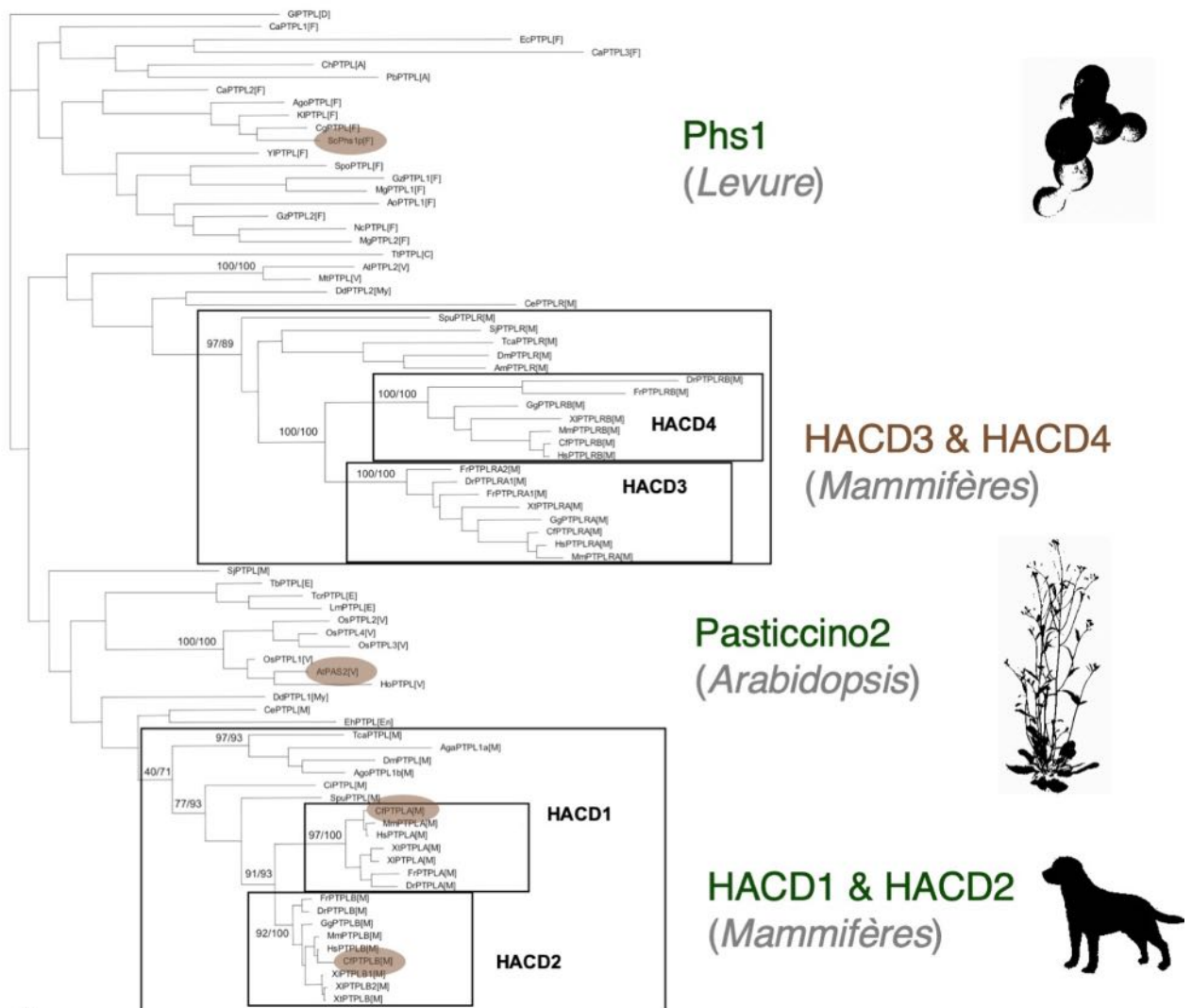


Figure 6 : Dendogramme chez les eucaryotes des protéines apparentées à HACD2

Analyse des séquences apparentées aux gènes *HADC* de mammifères, constituant une famille conservée dont l'unique orthologue de levure s'appelle *PHS1* et celui de la plante *Pasticcino2*. Chez les métazoaires, on distingue deux groupes monophylétiques distincts, avec à l'intérieur deux sous-groupes clairement définis à partir des séquences de vertébrés. Chaque sous-groupe contient un paralogue de mammifère, numérotés *HACD1* à *HACD4*. Les sous-groupes contenant *HACD1* et *HACD2* sont très proches, séparés du couple *HACD3* et *HACD4* également proches entre eux. (données non publiées du laboratoire ; collaboration avec Jean-Louis Plouhinec et Sylvie Mazan).

Cependant, celles de HACD3 et HACD4 sont plus éloignées avec des pourcentages respectivement de 15.3% ou 19.2% d'identité et 29.2% et 39.3% de similarité (Ikeda et al. *et al.*, 2008) (Figure 6).

Les quatre protéines présentent une activité HACD *in vitro* et comme Phs1p, elles sont enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cependant seules HACD1 et HACD2 sont capables de restaurer la croissance des levures déficientes pour Phs1p (Ikeda et al. *et al.*, 2008) (Figure 7).

1.3. Rôle des AGTLC

1.3.1 Au niveau moléculaire

Les AGTLC sont présents en faible quantité dans les organismes en comparaison avec l'abondance des autres acides gras.

Les AGTLC sont rarement présents en tant qu'acides gras libres. Ils entrent le plus souvent dans la formation des céramides, des sphingolipides ou des glycérolipides (Agbaga *et al.*, 2008). D'une manière générale, les sphingolipides interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la réponse de stress, la migration cellulaire, la sénescence, l'apoptose, l'inflammation et l'angiogenèse (Hannun and Obeid, 2008) (Figure 8).

1.3.2 Au niveau cellulaire

Les acides gras à très longue chaîne remplissent des fonctions particulières et très variées, comme par exemple dans la formation de la barrière cutanée, dans la fonction rétinienne, le maintien de la myéline, la spermatogenèse, l'homéostasie hépatique ou encore l'équilibre inflammatoire.

Cependant, leur rôle ne dépend pas de leur présence en soi mais ils agissent le plus souvent en tant que composants des membranes, au sein des sphingolipides et des glycérophospholipides ou en tant que précurseurs de médiateurs lipidiques cellulaires (Kihara, 2012).

La spécificité la plus souvent évoquée des AGTLC correspond à leur capacité à stabiliser de fortes courbures membranaires. En raison de leur longueur, ils donnent en effet une forme asymétrique aux phospholipides qui les contiennent, si bien que l'un des feuillet de la bicouche peut présenter une surface réduite, propice à une forte courbure membranaire (Figure 9) (Schneiter *et al.*, 2004). De plus, les AGTLC participent à la formation des sphingolipides, des lipides complexes intervenant dans de nombreuses voies de signalisation ou de trafic membranaire.

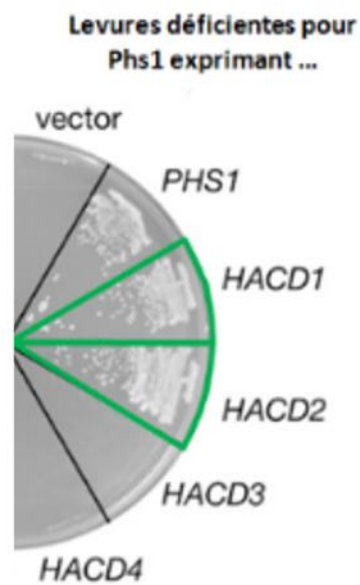


Figure 7 : Activité HACD des protéines paralogues
HACD1-4

L'inactivation du gène *PHS1* est létale chez la levure. Parmi les quatre orthologues de mammifère (*HACD1-4*), seuls *HACD1* et *HACD2* sont capables de sauver in vivo la mutation perte de fonction de *PHS1* chez la levure, létale (d'après Ikeda et al., 2008).

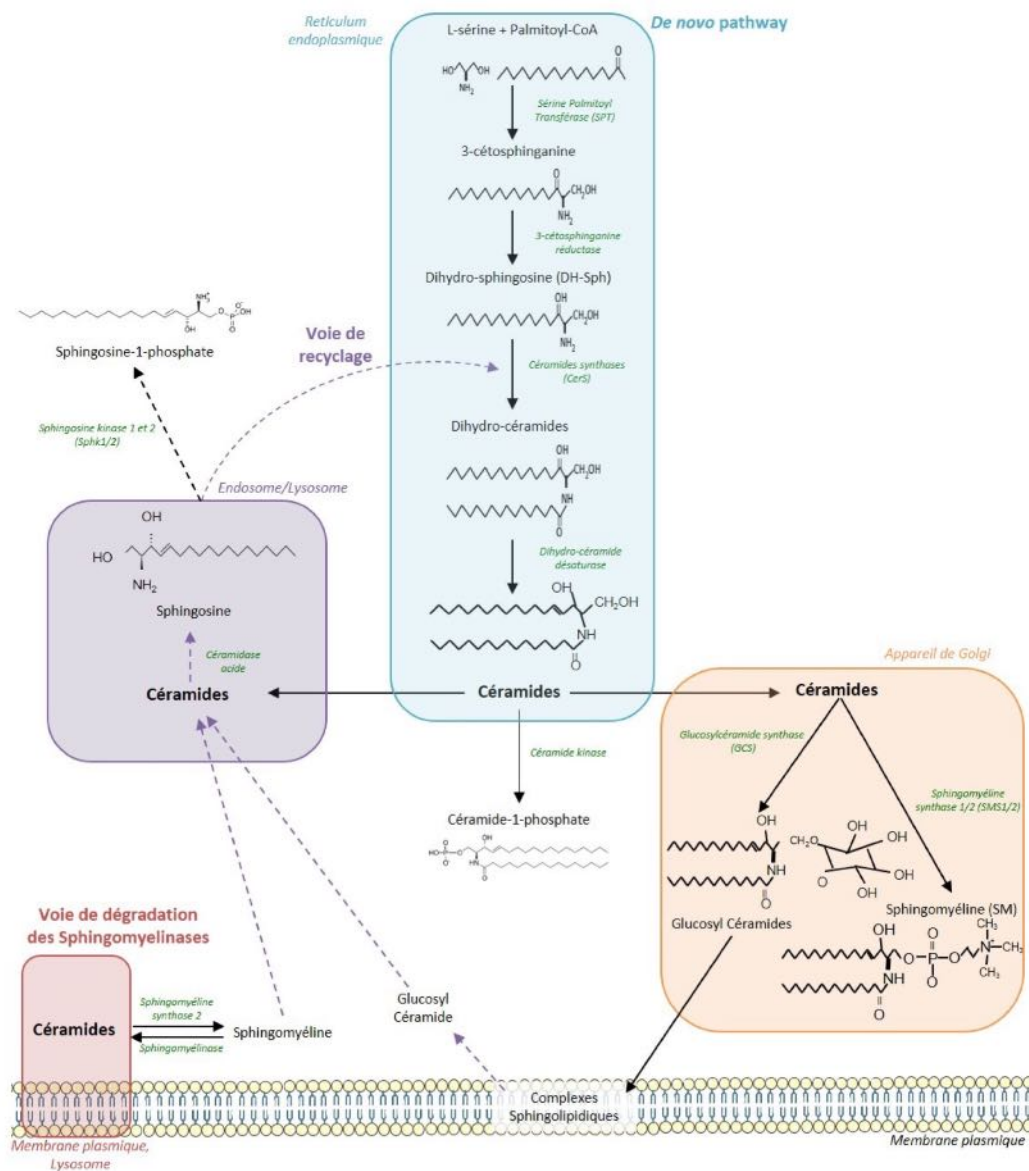


Figure 8 : Biosynthèse des sphingolipides

La voie de synthèse des céramides débute à la surface du réticulum endoplasmique par la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA, grâce à l'action de la sérine palmitoyl transférase (SPT). Par plusieurs étapes intermédiaires, la 3-cétosphinganine est transformée en céramides. Une fois formées, celle-ci sont transportées dans l'appareil de Golgi où elles sont transformées en glucosyl-céramides et en sphingomyéline.

Dans la membrane plasmique, la sphingomyéline et les glucosyl-céramides peuvent être recyclées ou dégradées par l'intermédiaire de la voie de recyclage. La sphingosine, obtenue à partir de la voie de recyclage, peut être utilisée par les céramides synthases pour produire de nouvelles céramides (d'après Yusuf et al., 2008).

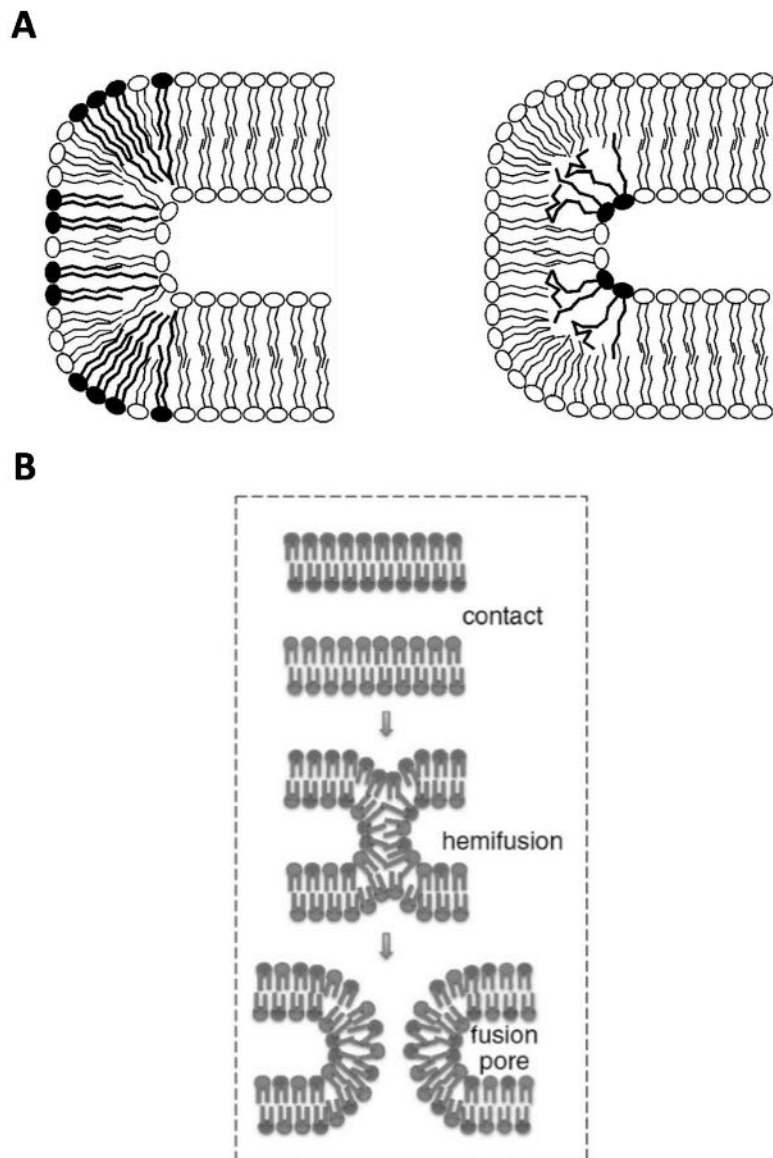


Figure 9 : Acides gras à très longue chaîne et propriétés membranaires

(A) Les acides gras à très longue chaîne participent notamment à la stabilisation des fortes courbures membranaires, qu'elles soient positives (gauche) ou négatives (droite) (d'après *Schneider et al., 2004*). (B) En permettant la forte courbure des membranes lors de l'étape de posthémifusion, les acides gras à très longue chaîne pourraient également intervenir dans les étapes de fusion membranaire, cette courbure permettant d'induire la tension latérale essentielle à la formation du pore de fusion. Sans cette tension, le retour en arrière à partir de l'étape intermédiaire instable de la tige d'hémifusion est privilégié (d'après *Kozlov and Chernomordik, 2015*).

1.3.3. Au niveau de l'organisme

Les premières protéines du cycle d'élongation des AGTLC sont les sept isoenzymes ELOVL. Compte tenu de leur profil d'expression (Figure 5) et de leur spécificité de substrats, la mutation des gènes *Elovl* donne lieu à des phénotypes dans différents organes (Jakobsson *et al.*, 2006; Kihara, 2012) (Figure 10).

Dans la formation de la barrière cutanée

L'inactivation des gènes *Elovl1* et *Elovl4* chez la souris entraîne une mort prématurée, quelques heures après la naissance, suite à une déshydratation importante due à un défaut de la barrière cutanée et un déficit dans les céramides comportant au moins 26 carbones (Figure 8) et en particulier les ω -O-acylcéramides (Sassa and Kihara, 2014; Vasireddy *et al.*, 2007).

Les souris mutantes pour *Elovl3* présentent des défauts de pilosité et de barrière épidermique dus à des anomalies dans la composition des triglycérides, des esters de cire des poils et du sébum.

Dans la spermatogénèse

Les souris mutantes pour *Elovl2* présentent une infertilité mâle : en effet, les spermatides ne sont pas transformées en spermatozoïdes, associé à un défaut en acides gras polyinsaturés à très longue chaîne (Zadravec *et al.*, 2011).

Dans le métabolisme

Les mutations observées pour les gènes *Elovl3*, *Elovl5* et *Elovl6* ainsi que *Hacd1* ont des conséquences sur le métabolisme glucidique et lipidique. En effet, les souris mutées pour les gènes *Elovl3* et *Elovl6* présentent une diminution de la capacité à accumuler de la graisse brune et une meilleure tolérance au glucose en cas d'alimentation hypercalorique, alors qu'une mutation du gène *Elovl6* entraîne une stéatose hépatique secondaire à l'augmentation de la lipogénèse (Matsuzaka *et al.*, 2012; Zadravec *et al.*, 2011).

Finalement, notre laboratoire a mis en évidence un rôle du gène *Hacd1* dans le métabolisme glucidique et lipidique puisque les souris mutantes présentent une plus forte tolérance au glucose associée à une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses (Prola *et al.*, *in press*).

Dans le système nerveux central

Chez l'homme, une mutation du gène *ELOVL5* entraîne l'apparition d'une ataxie spinocérébelleuse (Di Gregorio *et al.*, 2014). Une mutation certainement hypomorphe du gène

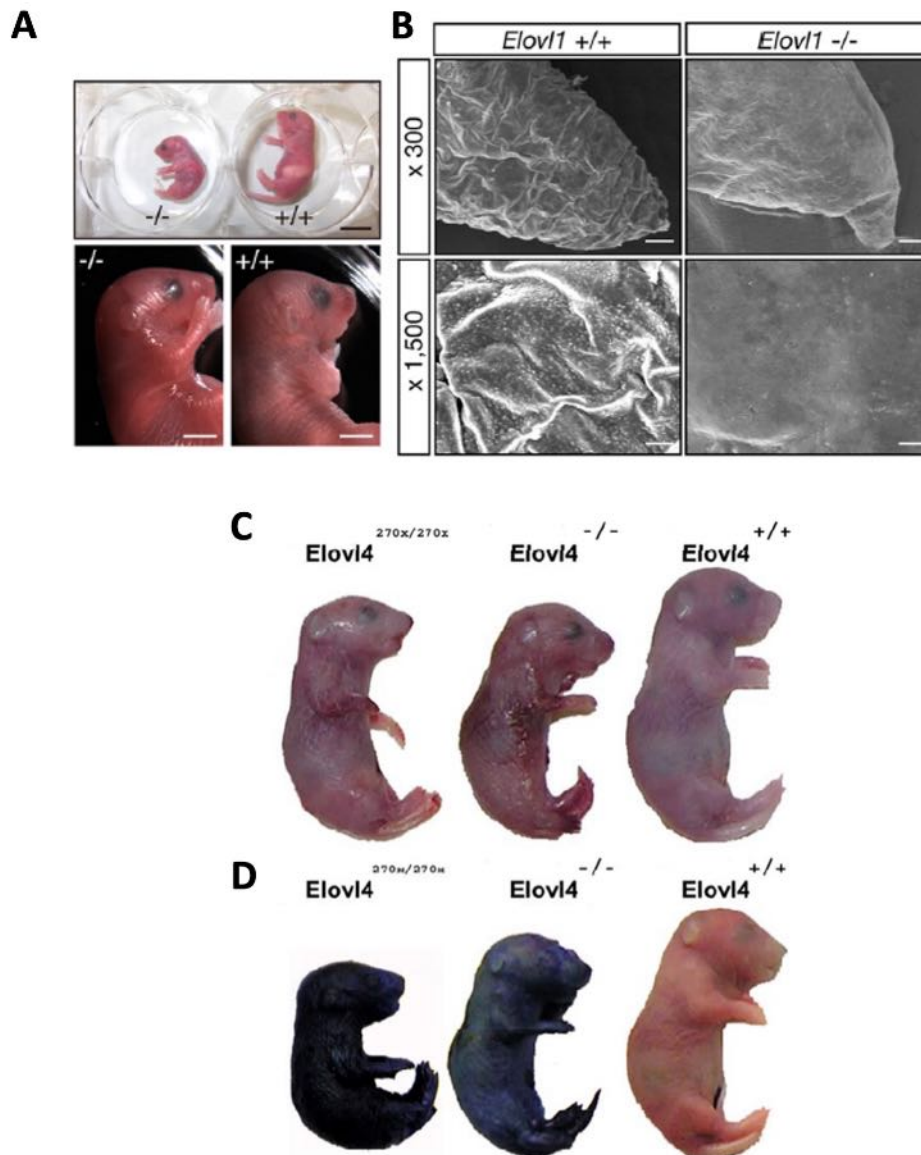


Figure 10 : Phénotype résultant de l'inactivation chez la souris des gènes *Elov1* ou *Elov4*

(A) Morphologie des nouveaux nés sauvages (+/+) versus *Elov1*-KO (-/-). Les souriceaux déficients en *Elov1* présentent un gros retard de croissance par rapport à leurs frères et sœurs de la même portée (d'après Sassa et al., 2013). (B) Les images de microscopie électronique faites sur les bouts de queue des nouveaux nés montrent que les souriceaux *Elov1*-KO présentent des anomalies morphologiques de l'épiderme, avec notamment une surface lisse et non plissée, associée à une mauvaise desquamation de la couche cornée (d'après Sassa et al., 2013). (C) Les embryons *Elov4*-KO au stade E19 présentent une peau fine et brillante, des défauts cutanés ainsi que des signes de dessèchement et de déshydratation. (D) Les essais de perméabilité de la barrière cutanée avec du bleu de méthylène montrent que les *Elov4*-KO absorbent le colorant, au regard de leur couleur bleue. Ceci suggère que la couche cornée n'est pas complètement développée (d'après Cameron et al., 2007).

TECR, qui code l'unique enzyme de la dernière étape du cycle d'élongation des AGTLC, est associée à un retard mental (Kihara, 2012).

Dans l'œil

ELOVL4 est essentielle à la production des PUFA à très ultra-longue chaîne C32-36 dans la rétine et à une fonction visuelle rétinienne normale. Une mutation gain-de-fonction de ce gène entraîne le développement d'une dégénérescence maculaire, nommée maladie de Stargardt 3 (*STGD3*) (Vasireddy *et al.*, 2007).

Notre laboratoire a pu mettre en évidence un rôle du gène *Hacd1* dans le fonctionnement rétinien puisque les souris *Hacd1-KO* présentent une plus faible réponse électrorétinographique à la lumière (données non publiées).

Déficiences en *Hacd1* : myopathie par défaut de fusion et dysfonctionnement mitochondrial

1.4. Une myopathie modérée chez le chien, l'humain et la souris

Dans les années 1990, le Pr Stéphane Blot a identifié des Labradors atteints d'une CNM et établi à l'EnvA une colonie expérimentale de Labradors retrievers atteints ou porteurs de cette myopathie (Blot *et al.*, 2002). Les premiers signes cliniques apparaissent chez les animaux atteints entre l'âge de 2 et 6 mois puis évoluent jusqu'à l'âge d'un an pour se stabiliser ensuite (Blot *et al.*, 2002). Ces animaux présentent une réduction précoce de la masse musculaire et une faiblesse musculaire généralisée (Figure 11A) conduisant à une posture et une démarche anormales, un port de tête tombante et des mouvements latéraux de queue ralentis.

L'analyse histologique de biopsies musculaires a permis de montrer une hétérogénéité dès le plus jeune âge dans le calibre des fibres musculaires, la présence de petites fibres et à partir de l'âge d'un an, la présence croissante de fibres avec des noyaux internalisés ou centralisés (Figure 11B), alors qu'ils sont normalement situés en périphérie (Jungbluth *et al.*, 2008). Cette particularité histologique a conduit à classer la myopathie observée comme une myopathie centronucléaire (CNM) dont la caractéristique histologique est la présence de noyaux internalisés ou centralisés dans les fibres musculaires (Blot *et al.*, 2002; Tiret *et al.*, 2003).

La mutation chez le chien est une insertion d'un élément rétrotransposable dans l'exon 2 du gène *HACD1*, produisant des anomalies d'épissage et une quasi disparition des transcrits sauvages dans les muscles des chiens atteints (Pelé *et al.*, 2005). Pour confirmer que la perte de fonction du gène *HACD1* était bien causale de la myopathie et que cette insertion n'affectait pas en fait l'expression d'un autre gène plus important pour l'homéostasie musculaire à

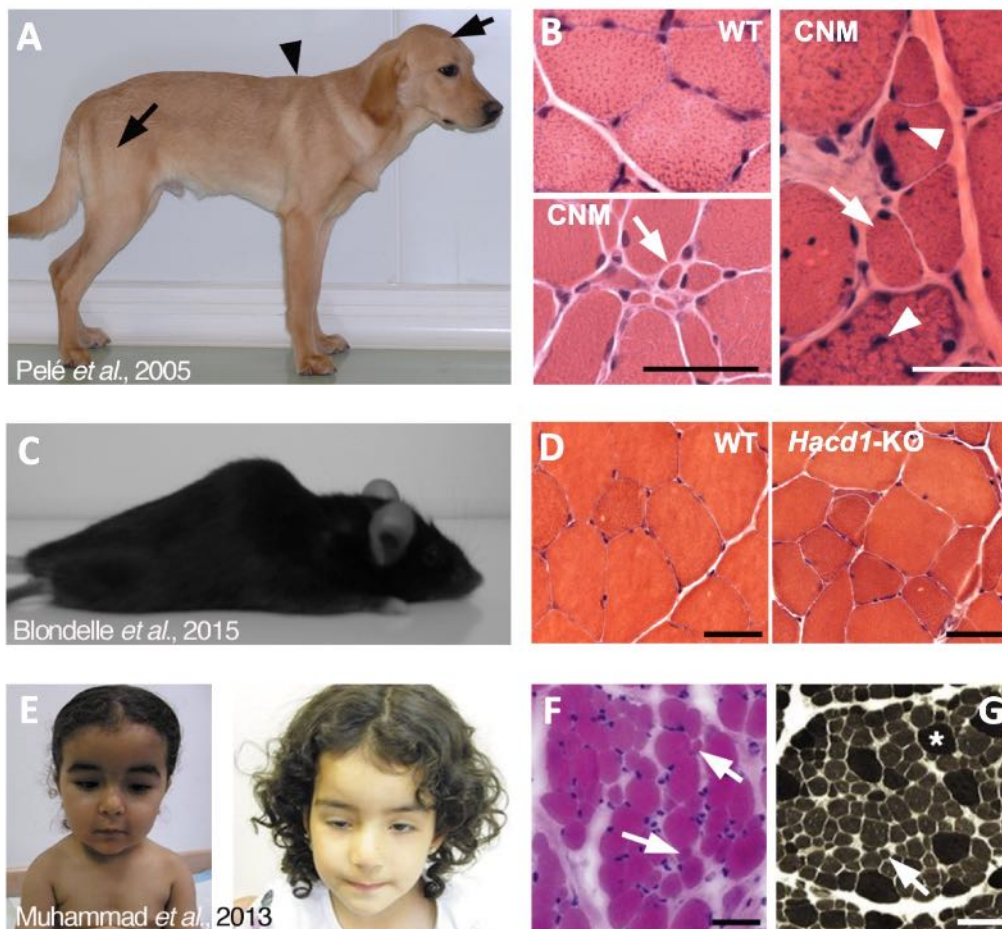


Figure 11 : Myopathie chez les mammifères victimes d'une perte de fonction du gène *HADC1*

(A) Les labradors atteints montrent une perte de masse musculaire, ici visible en région des muscles temporaux et de la cuisse (flèches). La perte de fonction musculaire en région des épaules induit un affaissement du corps et en conséquence, une saillie des scapula (pointe de flèche) (B) À l'histologie, on observe sur coupe transverse une réduction de la taille moyenne des fibres musculaires et une centralisation des noyaux (d'après Pelé et al., 2005). (C) Les souris *Hacd1*-KO présentent une cyphose avec l'âge, marque d'une atrophie musculaire. (D) Elles présentent aussi une réduction de la taille des fibres (d'après Blondelle et al., 2015). (E) Chez l'humain, la perte de fonction d'*HADC1* induit une myopathie congénitale avec en particulier une faiblesse musculaire de la face et des muscles releveurs des paupières, ce qui induit une ptose palpébrale (à droite). (F) Sur une biopsie de patient âgé d'un an, la coloration H&E montre une disproportion de la taille des fibres et des noyaux centralisés. (G) En coloration ATPase, les fibres les plus touchées par la réduction de taille sont les fibres de type 1, claires avec cette coloration (d'après Muhammad et al., 2013).

distance, nous avons généré une lignée de souris spécifiquement invalidée pour le gène *Hacd1* (homozygotes pour l'allèle *KnockOut* au locus *Hacd1*, notées *Hacd1-KO*). Nous avons observé que les souris homozygotes pour l'allèle *Hacd1-KO* présentent une réduction de leur masse et de leur force musculaire et une réduction de leur activité locomotrice par rapport aux individus contrôles. Cliniquement, les souris *Hacd1-KO* présentent une faiblesse musculaire associée à une cyphose (Blondelle *et al.*, 2015) (Figure 11C & D). Cette lignée a donc permis de confirmer l'hypothèse initiale d'une causalité de la perte de fonction d'HACD1 dans le développement de la myopathie chez le chien. Elle a aussi permis de montrer que la fonction d'HACD1 est conservée entre le chien et la souris.

Pendant le temps de l'analyse de nos souris, des généticiens humains guidés par ces données ont caractérisé dans des familles différentes des variants homozygotes du gène *HACD1* associés au développement chez l'enfant d'une myopathie congénitale faiblement progressive et caractérisée à chaque fois par une faiblesse musculaire et, à l'histologie, par une hétérogénéité dans le calibre des fibres musculaires (Al Amrani *et al.*, 2020; Muhammad *et al.*, 2013; Toscano *et al.*, 2017). (Figure 11E & F). Pour cette raison et parce que la centralisation nucléaire n'a pas été identifiée comme un paramètre marquant, probablement en raison du jeune âge des patients prélevés, la myopathie chez l'homme est plutôt classée dans le groupe des myopathies congénitales à disproportion de fibres.

1.5. Une hypotrophie musculaire par défaut de fusion des myoblastes

La formation des longues fibres musculaires syncytiales repose sur le mécanisme de fusion des myoblastes en myotubes, puis sur leur croissance. L'étude de la différenciation des myoblastes, menée sur cellules primaires issus de souris *Hacd1-KO* ou dans une lignée C2C12 après ARN interférence sur les transcrits *Hacd1* (*knockdown*, noté *sh-Hacd1*), a montré que le processus de différenciation des myoblastes n'était pas affecté par la déficience en HACD1 mais que la fusion des myoblastes était moins efficace, avec un plus grand nombre de myotubes contenant peu de noyaux en comparaison avec les contrôles (Blondelle *et al.*, 2015).

Une analyse lipidomique a permis de montrer que la protéine HACD1 permet au cours de la différenciation d'ajuster la composition membranaire des AGTLC. Dans les C2C12 *sh-Hacd1*, on a ainsi quantifié une diminution des AG mono-insaturés au bénéfice des AG saturés et un maintien lors de la différenciation d'une quantité de lysophosphatidylcholine, puissant inhibiteur de la fusion des myoblastes et retrouvé diminué dans les cellules contrôles en comparaison avec leur valeur avant la différenciation (Blondelle *et al.*, 2015).

L'étude *in vivo* a confirmé un défaut de fusion chez les souris *Hacd1*-KO dont les muscles ont été soumis à une épreuve expérimentale de régénération. Les fibres musculaires reconstituées évaluées à 2 semaines post-lésion, à l'issue de processus de fusion, étaient plus petites et incluaient moins de noyaux (Blondelle *et al.*, 2015).

Cell fusion

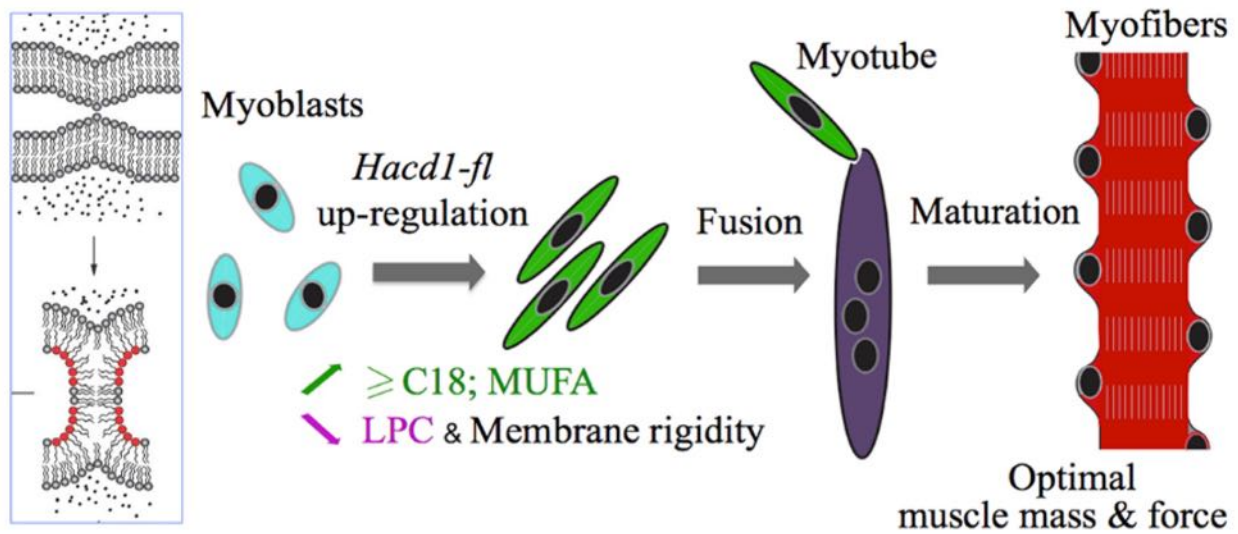


Figure 12 : Bilan schématique sur la contribution d'HACD1 dans la fusion des myoblastes

En l'absence d'*Hacd1*, on observe une diminution de l'index de fusion des myoblastes, associé à un défaut du remodelage moléculaire de la membrane plasmique des myoblastes, en particulier un défaut de production de MUFA et un excès de production de la lysophosphatidylcholine (LPC), puissant inhibiteur de la fusion (d'après Blondelle *et al.*, 2015).

En conclusion, le gène *Hacd1* est fortement induit lors du développement musculaire. Ceci provoque en particulier une augmentation des AG mono-insaturés et une baisse de LPC avec pour conséquence une augmentation de la fluidité membranaire au service d'une fusion plus efficace des myoblastes. En l'absence d'*Hacd1*, la fusion réduite demeure néanmoins possible, les fibres sont plus petites et le muscle est hypotrophié (Figure 12).

1.6. Un phénotype métabolique par dysfonctionnement mitochondrial

Toutes classes d'âge confondues, le tissu musculaire représente en moyenne 30 à 40 % de la masse corporelle totale d'un être humain (Janssen *et al.*, 2000), il est un site privilégié de stockage énergétique. Le muscle est l'un des organes demandant le plus d'énergie et il est en étroite relation avec le métabolisme glucidique d'une part et le métabolisme d'oxydation des acides gras d'autre part. Ces deux voies de métabolisme constituent les deux voies d'approvisionnement en énergie.

Normalement, une atrophie musculaire est associée à une faible tolérance au glucose, prédisposant au diabète sucré (Kandarian and Jackman, 2006). Les souris *Hacd1*-KO avaient des muscles hypotrophiques (Blondelle *et al.*, 2015) associés à une réduction de 50% de leur locomotion spontanée (Prola *et al.*, *in press*) mais de façon surprenante, elles présentaient une meilleure tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline plus élevées, à la fois en régime alimentaire normal et en régime riche en graisse. Nous avons voulu comprendre l'origine de ce paradoxe chez les souris *Hacd1*-KO. L'analyse comparée de la bêta-oxydation des lipides chez les souris contrôles et *Hacd1*-KO a montré une bêta-oxydation plus élevée des lipides chez les *Hacd1*-KO, associée à l'identification d'une activité oxydative plus élevée sur les coupes histologiques de muscles (Prola *et al.*, *in press*).

Nous nous sommes donc intéressés aux mitochondries des muscles des souris *Hacd1*-KO et avons montré une diminution de l'efficacité du couplage entre l'oxydation des substrats et la phosphorylation de l'ADP (OXPHOS *coupling*), avec pour conséquence une moindre production d'ATP musculaire lorsque les souris sont à l'exercice, qu'elles tentent de compenser par une biogenèse mitochondriale qui demeure inefficace et insuffisante pour restaurer une production normale d'ATP (Prola *et al.*, *in press*).

Nous avons pu montrer que les défauts respiratoires sont associés à une dilatation des crêtes mitochondriales, où se concentre un grand nombre des protéines membranaires telles que les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Or la structure de ces crêtes dépend fortement de la composition lipidique, en particulier de la cardiolipine très enrichie dans la membrane interne mitochondriale (Ikon and Ryan, 2017). Dans les mitochondries isolées des muscles des souris *Hacd1*-KO, nous avons quantifié une chute de 50% de la quantité en

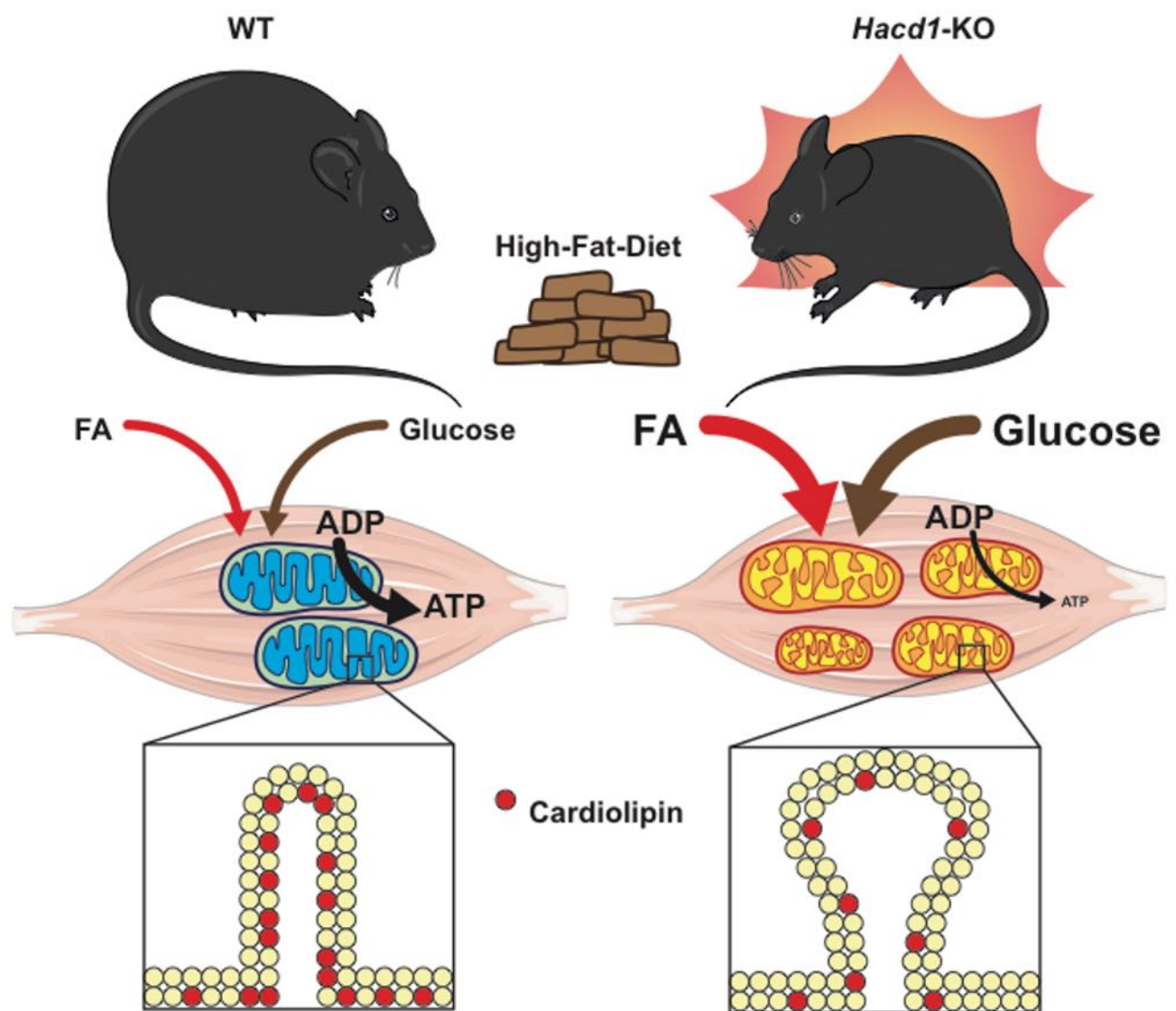


Figure 13 : Bilan schématique sur les conséquences de la perte de fonction d'HACD1 sur la fonction mitochondriale et le métabolisme

Chez les souris déficientes en *Hacd1*, la teneur réduite en cardiolipine (points rouges) est associée à une dilatation des crêtes et une respiration phosphorylante déficiente. Le défaut de couplage mitochondrial dans le muscle squelettique produit une dépense énergétique basale élevée à l'échelle de l'organisme alimentée par une augmentation du catabolisme des glucides et des lipides. La hausse de dépense énergétique protège les souris contre l'obésité induite par une alimentation riche en graisse (d'après Prola et al., 2020).

cardiolipine. Lorsque les membranes des mitochondries *Hacd1*-KO ont été à nouveau enrichies en cardiolipine, l'anomalie de couplage mitochondrial a été corrigée (Prola *et al.*, *in press*).

Pour conclure, en absence d'*Hacd1* les mitochondries des muscles ont une composition lipidique de leur membrane modifiée, avec en particulier une réduction du contenu en cardiolipine. Il en résulte un découplage fonctionnel avec production réduite d'ATP que les souris compensent par une élévation de la quantité de substrats oxydés, inefficace en termes de production d'énergie disponible pour la contraction musculaire (Figure 13). Elles ont une capacité locomotrice réduite, par ailleurs amplifiée par l'hypotrophie de leurs muscles en raison du défaut de fusion des myoblastes mais par ailleurs sont protégées d'une obésité induite par une alimentation riche en graisse (Figure 13). L'enjeu sera d'identifier la contribution spécifique du défaut de fusion et de l'anomalie métabolique dans le phénotype de faiblesse musculaire. L'équipe travaille actuellement à induire une perte de fonction d'*Hacd1* après la période développementale de croissance musculaire par fusion pour vérifier si le défaut mitochondrial exerce une répercussion négative sur le fonctionnement musculaire au repos. Dans le cas contraire, la réduction de l'activité d'*Hacd1* chez l'adulte pourrait constituer une stratégie de prévention ou de traitement des formes d'obésité accompagnées de contre-indication à l'exercice physique (Prola *et al.*, *in press*). L'autre enseignement de cette analyse est qu'une protéine du complexe d'élongation des AGTLC perturbe la composition lipidique des membranes au-delà de la seule synthèse des AGTLC et que la protéine HACD1 joue un rôle important dans la structure et le fonctionnement des mitochondries. Cette conclusion a permis d'éclairer mon travail de thèse pendant qu'il se déroulait.

2. Prérequis pour l'analyse phénotypique des mutants *Hacd2*

2.1. Données de la littérature sur *Hacd2*

2.1.1. Rappels sur la fonction et l'expression de la protéine

Nous avons vu qu'HACD2 est une protéine du réticulum, enzyme du complexe d'élongation des AGTLC (Ikeda *et al.*, 2008), capable avec HACD1 de restaurer la croissance des levures mutantes pour *PHS1*. Une expression quasi ubiquitaire du gène *Hacd2* a été rapportée, avec notamment une expression forte dans le cœur, les muscles squelettiques et les testicules (Figure 14A) (Wang *et al.*, 2004).

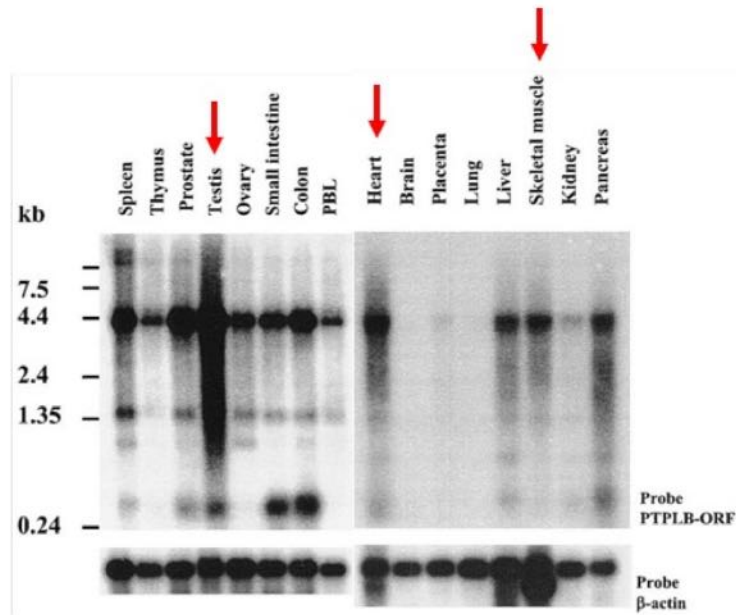
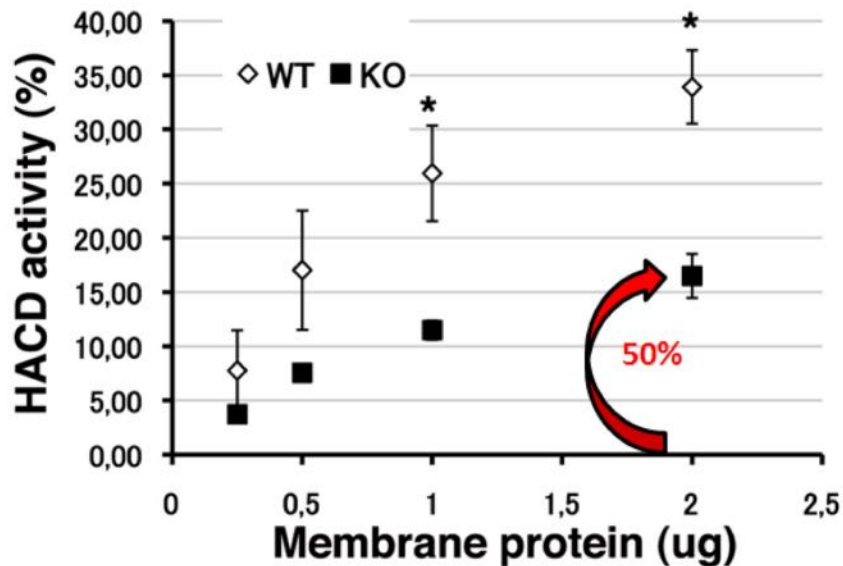
A**B**

Figure 14 : Données préliminaires sur l'expression décrite du gène *HACD2* et sa contribution à l'activité HACD du muscle squelettique

(A) Détection dans la quasi totalité des organes humains des ARN messagers du gène *HACD2* (anciennement nommé *PTPLB*) via une sonde contenant la séquence codante du gène (ORF). Un contrôle a été effectué avec une sonde spécifique du gène codant la bêta-actine. L'expression est particulièrement élevée dans la rate, la prostate, le testicule, le cœur et un peu moins élevée dans le tube digestif, le foie et le muscle squelettique (*d'après Wang et al., 2004*). (B) La quantification de l'activité HACD dans le muscle squelettique de la souris *Hacd1-KO* montre une activité HACD résiduelle équivalente à la moitié de l'activité HACD totale chez la souris sauvage (WT), augurant d'une contribution équivalente des gènes paralogues (*donnée non publiée du laboratoire, obtenue en collaboration avec le Pr Akio Kihara*).

La mesure de l'activité HACD totale des muscles squelettiques des souris *Hacd1*-KO a révélé une activité résiduelle de 50% (Figure 14B), suggérant qu'une partie de cette activité pourrait être portée par *Hacd2*. Son inactivation pourrait ainsi conduire à un phénotype musculaire, seule ou en combinaison avec l'inactivation de son paralogue *Hacd1*.

2.1.2. *Hacd2* et mécanismes pathologiques en santé humaine

Il existe peu de données mais deux études ont néanmoins retenu notre attention.

La première étude concerne un suivi longitudinal d'une cohorte de femmes initialement atteintes d'obésité et dont le profil transcriptomique du tissu adipeux blanc a été suivi sur 13 années selon qu'elles aient gagné, maintenu ou perdu du poids pendant cette période. Dans cette étude, la réduction significative de l'expression d'*HACD2* a été pointée comme l'un des marqueurs associés au groupe des femmes qui ont perdu du poids pendant cette période (Kwok *et al.*, 2019), une donnée très indirecte mais qui associe une diminution d'expression d'*HACD2* à réduction de l'obésité. Le mécanisme est peut-être très éloigné de celui identifié dans le muscle des souris déficientes en *Hacd1*, nous gardons néanmoins cette donnée en tête.

La seconde étude a porté sur le cancer du sein, en utilisant comme modèle des mammosphères réalisées à partir de lignées de cellules cancéreuses, en particulier la lignée MCF-7 (Kang *et al.*, 2019). Cultivées sur support très peu adhérent en présence de bFGF et EGF, une suspension monocellulaire s'organise en sphères, modèle de transition épithélio-mésenchymateuse et donc, d'initiation métastatique. Les auteurs ont montré que cette transition s'accompagnait d'une signature transcriptomique caractéristique, avec en particulier une diminution très significative de l'expression des gènes *HACD2*, *ELOVL2* et *ELOVL3*. Cette signature était accompagnée entre autres modifications d'une réduction des AG polyinsaturés (Kang *et al.*, 2019). Ils ont ensuite élargi l'étude en analysant les données de transcriptomes disponibles, réalisés à partir d'une cinquantaine de tumeurs du sein. Ils ont trouvé qu'une faible expression d'*ELOVL2* était significativement associée à une tumeur gradée en tumeur basale, c'est-à-dire plus grave. Cette baisse d'expression a également été associée chez des patientes à un pronostic sombre (Kang *et al.*, 2019). Au bilan, la baisse d'expression d'*ELOVL2* qui accompagne la transition épithélio-mésenchymateuse de modèles cellulaires de tumeurs mammaires semble un bon biomarqueur d'un pronostic sombre associé à un processus métastatique favorisé. Cette étude montre aussi que trois membres du complexe d'élongation des AGTLC, incluant *HACD2*, sont impliqués dans le contrôle de la composition lipidique des membranes cellulaires dont la perturbation conduit ici à un mécanisme morbide. Cela met en lumière l'importance du contrôle génétique du lipidome dans des mécanismes cellulaires

essentiels. La transition épithélio-mésenchymateuse, ici vue du côté morbide, est également essentielle au développement embryonnaire des muscles, pour ne citer qu'un exemple.

2.2. Initiation du développement embryonnaire du système cardiovasculaire chez la souris

Nous montrerons dans la partie « Résultats » que l'inactivation du gène *Hacd2* induit un défaut de développement embryonnaire qui survient avant le milieu de la gestation, avec notamment une interruption de la mise en place du système cardiovasculaire. Nous rappelons donc ici les étapes clés du développement de l'embryon de souris autour des stades sur lesquels nous avons porté notre attention pour préciser le phénotype des embryons mutants. Nous nous focaliserons particulièrement sur les étapes qui concernent le développement vasculaire et cardiaque.

Nous rappelons qu'en raison de leur activité pendant la phase nocturne du rythme circadien, il est admis que les souris se reproduisent autour de minuit. Ainsi, dans une animalerie dont l'alternance entre le jour et la nuit reproduit notre propre rythme circadien, on considère que l'embryon récupéré en journée est âgé du nombre de jours depuis la fécondation, auxquels on ajoute la demi-journée qui sépare le coït nocturne du moment de la récupération de l'embryon. Pour cette raison, les jours embryonnaires « post-coïtus » sont notés de E0.5 à E19.5 (p.c.). Nous utiliserons cette nomenclature officielle.

2.2.1. Étapes clés du développement de l'embryon en période pré-implantatoire

De la vie libre à l'implantation

Après fécondation de l'ovocyte ovulé dans l'ampoule de l'oviducte, le zygote activé entame une période de trois jours dite "de vie libre", au cours de laquelle il subit plusieurs cycles de divisions mitotiques en même temps qu'il est transféré vers la corne utérine. Il y parvient à E3.5, au stade du blastocyste dont le volume, imposé par la zone pellucide, est identique à celui du zygote. À ce stade, le blastocyste contient en moyenne 52 cellules (Wigger *et al.*, 2017), réparties en cellules externes du trophoctoderme et en une masse cellulaire interne dont la localisation définit le pôle de l'embryon (Figure 15A). La couche cellulaire de l'endoderme primitif recouvre alors peu à peu la masse cellulaire interne à partir de laquelle elle mature (Frum and Ralston, 2015). L'endoderme sépare alors la masse cellulaire dont la partie interne devient l'épiblaste de la cavité blastocœlique remplie d'un liquide accumulé par l'action des cellules du trophoctoderme (Figure 15A). À E4.5, le blastocyste éclot de sa zone pellucide et débute son implantation au sein de la muqueuse endométriale.

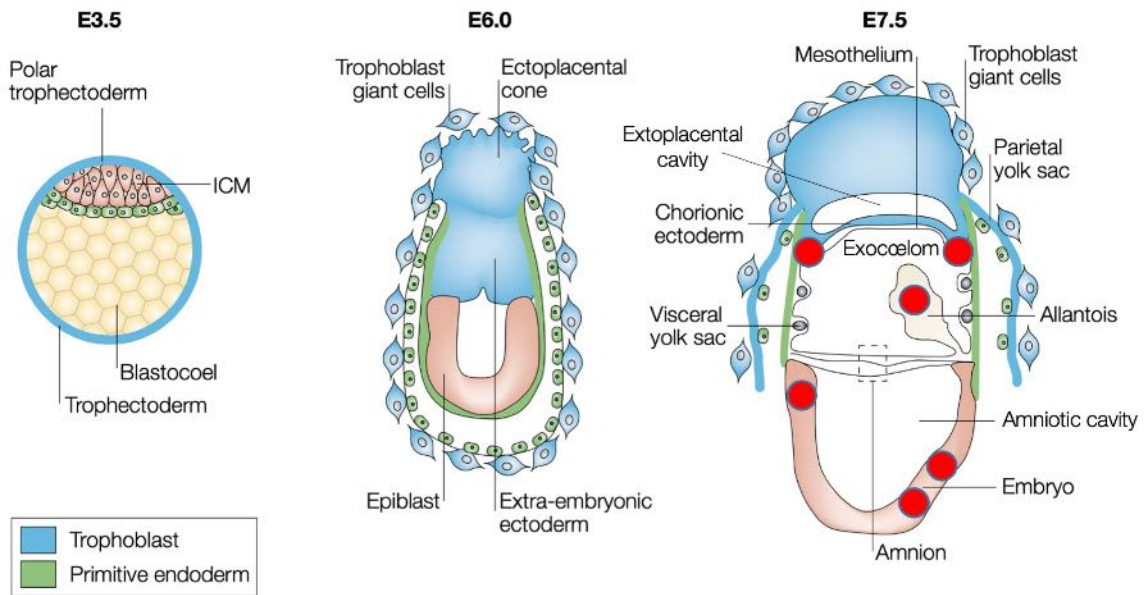
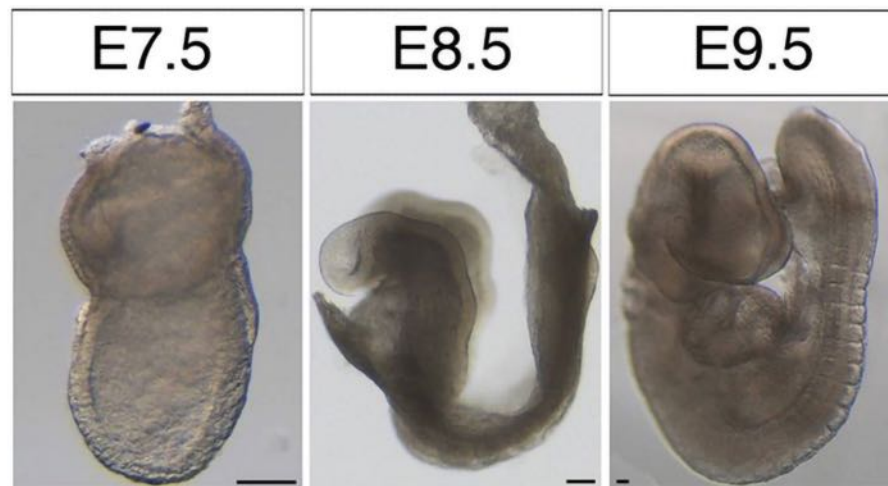
A**B**

Figure 15 : Développement initial de l'embryon de souris

(A) Au stade E3.5, l'embryon est un blastocyste composé d'une masse cellulaire interne (ICM), de l'endoderme primitif et du trophoctoderme délimitant la cavité blastocoelique. Les cellules du trophoctoderme polaire prolifèrent et forment le cône ectoplacentaire ainsi que les cellules géantes du trophoblaste qui, associées avec les cellules de l'endoderme, forment le feuillet pariétal du sac vitellin. Au stade E7.5, l'allantoïde s'étend dans l'exocoelome et contribuera à la vasculogenèse ombilicale. Les points rouges désignent les sites d'où émergent les précurseurs hématopoïétiques (d'après Rossant et Cross, 2011 ; Dzierzack et Bigas, 2018). (B) À E7.5, la morphologie de l'embryon et de ses annexes est un cylindre à trois cavités, la partie postérieure est à droite. À E8.5, les bourrelets neuraux antérieurs de l'embryon se développent du côté opposé à l'allantoïde, visible ici au dessus de la queue de l'embryon. En région ventrale et postérieurement à la tête, le tube cardiaque s'individualise. À E9.5, l'embryon s'est retourné, son futur dos fait face à l'extérieur, le tube cardiaque devient un cœur multicavitaire, les somites sont bien visibles et le neuropore antérieur est fermé. Barre d'échelle : 100 µm (d'après Souilhol et al., 2016).

Formation des précurseurs cellulaires du placenta et du sac vitellin

Les cellules de l'épiblaste prolifèrent et s'étendent au sein du blastocœle, bordées d'une couche de cellules de l'endoderme primitif et préfigurant le futur embryon organisé autour de la cavité proamniotique creusée entre l'épiblaste et le trophoctoderme polaire. À partir du stade E6.0, les cellules de ce trophoctoderme polaire prolifèrent et commencent à former le cône ectoplacentaire qui envahit le tissu maternel avec lequel il s'interface via la couche de cellules géantes du trophoblaste pariétal (Figure 15B). Chez la souris, ces cellules sont mononucléées mais polyploïdes du fait d'un mécanisme d'endoréduplication consistant en une série de cycles de réplication de l'ADN sans mitose. L'endoréduplication permettrait d'optimiser la production de protéines tout en limitant la dépense énergétique du mécanisme de division cellulaire, une hypothèse soutenue par la richesse en réticulum granuleux du cytoplasme abondant des cellules géantes du trophoblaste, connues pour sécréter de nombreuses protéines de matrice extracellulaire, des protéases, des cytokines et des hormones (Hu and Cross, 2010). De plus, ce mécanisme d'endoréduplication permet une expansion tissulaire très rapide à partir de cellules postmitotiques, limitant ainsi le risque de formation tumorale. Ces cellules géantes formées à partir du cône migrent vers le pôle embryonnaire et entraînent avec elles des cellules de l'endoderme primitif qui prolifèrent à partir de la jonction entre le cône ectoplacentaire et l'ectoderme extraembryonnaire, l'ensemble des deux couches formant le feuillet pariétal du sac vitellin (Figure 15B).

La demi-journée suivante est marquée par l'envahissement du cône ectoplacentaire par le sang maternel et par la distinction morphologique qui peut être faite entre les couches embryonnaires et extraembryonnaires de l'ectoderme ou de l'endoderme (Kaufman, 1992). Le conceptus, terme qui désigne l'ensemble de l'embryon et du sac vitellin, compte alors environ 1300 cellules (Palis *et al.*, 1999).

L'embryon à trois feuillets et trois cavités au jour E7.5

À partir du stade E6.5, apparaissent les premières cellules du mésoderme lors du mécanisme morphogénétique de gastrulation au cours de laquelle les cellules pluripotentes de l'épiblaste embryonnaire acquièrent des caractéristiques diversifiées de précurseurs des trois lignages fondateurs du plan d'organisation définitif de l'embryon (Pijuan-Sala *et al.*, 2019; Tam and Behringer, 1997). En région médiane du conceptus, les cellules mésodermiques s'associent avec des cellules de l'ectoderme extraembryonnaire et ensemble, elles prolifèrent pour donner naissance aux bourrelets amniotiques antérieur et postérieur bientôt fusionnés pour donner naissance à l'amnios, qui constituent à E7.5 une séparation physique entre la cavité amniotique du côté embryonnaire et l'exocœlome du côté extraembryonnaire (Figure 15A). Dans le même temps, le cône ectoplacentaire est animé d'un mécanisme de cavitation interne qui aboutit à la formation de la cavité ectoplacentaire, séparée de l'exocœlome par le chorion

(Figure 15A et 15B). Au stade E7.5, le conceptus mesure environ 700-900 µm dans sa plus grande longueur (Figure 15B) et s'organise donc autour de trois cavités visibles. Il contient 16 000 cellules dont 4 000 (25%) forment le sac vitellin (Palis *et al.*, 1999). Au sein de l'exocœlome, le bourgeon mésodermique postérieur de l'allantoïde émerge et croît en direction du chorion (Figure 15A) avec lequel il entrera en contact à E8.5.

L'organogenèse débutante entre E7.5 et E9.5

À la fin de ce stade E7.5, en avant de la ligne primitive dessinée par les mouvements cellulaires d'invagination de l'épiblaste embryonnaire lors de la gastrulation, apparaît un épaissement de l'ectoderme qui forme les plaques neurales antérieures visibles du côté de la cavité amniotique, future région dorsale de l'embryon. À ce même niveau rostrocaudal de l'embryon mais du côté ventral, apparaît la plaque cardiaque, bordée par un mésothélium à l'origine de l'épicarde et qui définit entre lui et le futur cœur une cavité coelomique intraembryonnaire, future cavité péricardique (Kaufman, 1992). Les ébauches du cerveau et du cœur initient donc la phase d'organogenèse embryonnaire.

Le stade E8.0 est marqué par l'apparition des premières paires de somites en région centrale de forte courbure de l'embryon (Kaufman, 1992), produites par condensation du mésoderme présomitique en région postérieure. L'ajout d'une paire de somites est continu et rythmé par une horloge de segmentation qui sonne toutes les deux heures (Dequéant *et al.*, 2006) et qui conduira à dénombrer environ sept paires de somites au stade E8.5 et une vingtaine au stade E9.5 (Figure 15B). Les somites donneront naissance au squelette axial, à la musculature qui s'y rattache, au tissu adipeux et à une partie de la peau en région cervicale et du tronc.

La région céphalique est particulièrement animée entre les stades E8.0 et E9.5. À partir de E8.0, la première paire d'arcs branchiaux est visible. La seconde paire apparaît au stade E8.5 et la troisième en fin de stade E9.5. Les dérivés des arcs branchiaux formeront la mandibule, les cartilages laryngés, les muscles de la mastication, de la déglutition, de l'expression faciale, les paires V, VII, IX et X des nerfs crâniens ainsi qu'une partie du réseau artériel cardiocéphalique (Frisdal and Trainor, 2014). Les précurseurs de l'oreille interne et de la partie nerveuse de l'œil apparaissent également dès ces stades embryonnaires, en fin de stade E8.5 pour la paire de placodes otiques et en fin de stade E9.0 pour la paire de placodes optiques, au même moment que la fermeture du neuropore antérieur qui constitue une frontière temporelle dans le développement du cerveau embryonnaire. En effet, à partir de cette fermeture qui fait disparaître les bourrelets neuraux au profit des ventricules cérébraux, on observe une croissance importante de la région céphalique qui se segmente et fait en particulier apparaître en région la plus rostrale les vésicules télencéphaliques du cerveau

antérieur, particulièrement visibles au stade E9.5, au point de masquer en partie les placodes optiques refoulées vers l'arrière (Figure 15B).

Enfin, cette période initiale d'organogenèse se déroule pendant une réorganisation morphologique spectaculaire de l'embryon qui est animé d'un mouvement de rotation sur lui-même autour de son axe rostrocaudal, initié au stade E8.5 lorsque l'embryon compte 6-8 paires de somites et achevé entre les stades E9.0 et E9.5 lorsque l'embryon compte 14-16 paires de somites (Figure 15B). L'accomplissement de la rotation est concomitant de l'apparition au stade 15-18 paires de somites des bourgeons des membres antérieurs, mieux dessinés à E9.5 au stade 25-30 paires de somites. À la toute fin du stade E9.5, la queue est déplacée latéralement à l'embryon et se recourbe sur elle-même (Kaufman, 1992).

L'ensemble de ces événements très précisément orchestrés est utile pour identifier avec précision le niveau de développement d'un embryon. Pour ces stades, on retient le comptage des paires de somites, le retournement complet, partiel ou non initié de l'embryon, la présence de l'allantoïde, la fermeture du neuropore antérieur, le développement des vésicules céphaliques et du cœur, qui sera particulièrement détaillé dans une prochaine partie.

2.2.2. Formation des vaisseaux sanguins du sac vitellin et de l'embryon

À partir du stade E6.5, la croissance du conceptus est spectaculaire et chez la souris, chaque jour de développement est caractérisé par un nombre total de cellules multiplié par huit par rapport au jour précédent (Palis *et al.*, 1999). Entre E6.5 et E8.5, la complexité organogénétique croissante de l'embryon est avérée par une diversification des types cellulaires, sept au stade E6.5 et 37 à E8.5, identifiés chacun par une signature transcriptomique (Pijuan-Sala *et al.*, 2019). Cet accroissement a pour conséquence physique d'éloigner du liquide extracellulaire dans lequel baigne les cellules du conceptus celles en position la plus interne, en particulier au sein de l'embryon. Dès cette période embryonnaire, il est donc crucial qu'un système de perfusion soit déployé en parallèle de sa croissance. Chez la souris, l'absence d'établissement d'un système vasculaire fonctionnel conduit à la mort de l'embryon entre les jours E8.5 et E10.5 (Fish and Wythe, 2015; Patan, 2004). Chronologiquement, la perfusion de l'embryon est d'abord assurée par la circulation vitelline puis par le développement au sein de l'embryon même du système cardiovasculaire secondairement connecté au placenta. Nous allons donc décrire les étapes majeures de la mise en place de ces deux systèmes circulatoires.

Mise en place du sac vitellin et fonction d'absorption

Le sac vitellin est une structure qui accompagne le développement de l'embryon des vertébrés, il lui apporte une protection mécanique et il a conservé chez les mammifères sa fonction

ancestrale nourricière, essentielle pour les espèces ovipares chez lesquelles le développement de l'embryon dépend exclusivement de l'utilisation des ressources du vitellus (Jollie, 1990). Chez la souris, le développement du sac vitellin débute avec l'élongation du blastocyste et au stade E7.5, il est composé de deux feuillets qui délimitent la cavité vitelline (Figure 15A). Le feuillet le plus externe nommé feuillet pariétal est bilamellaire, associant les cellules du trophoctoderme et celles de l'endoderme primitif. C'est un feuillet transitoire qui disparaîtra au jour E15 (Jollie, 1990). Le feuillet le plus interne, au contact de l'embryon, est trilamellaire associant en plus à partir du jour E6.5 une couche de cellules du mésoderme. Ce feuillet viscéral sera maintenu pendant toute la durée de la gestation, assurant en particulier une fonction de nutrition pour l'embryon et plus particulièrement, de transfert vers l'embryon de protéines maternelles telles que l'albumine, l'angiotensinogène, la transferrine (Ekblom and Thesleff, 1985) ou les immunoglobulines, mais aussi des vitamines B12 et D, de lipides et d'hormones stéroïdes (revue dans Jollie, 1990). Dans la partie extraembryonnaire du feuillet viscéral, l'observation en microscopie électronique des cellules de l'endoderme, au contact direct de la cavité vitelline (Figure 15A), a montré qu'elles sont bordées de microvillosités apicales et qu'elles renferment de nombreuses vésicules de pinocytose et de granules lysosomiaux, l'ensemble de ces éléments ultrastructuraux attestant d'une fonction d'absorption (Batten and Haar, 1979).

Le sac vitellin constitue ainsi l'unique tissu d'échange entre l'embryon et la circulation maternelle jusqu'au stade E9.0. Au-delà, il poursuivra cette fonction mais de façon secondaire au placenta chorioallantoïde qui se met alors en place après que l'allantoïde a contacté le chorion, prémices à la circulation ombilicale (Carter and Enders, 2016; Hu and Cross, 2010).

Hématopoïèse et vasculogénèse dans le sac vitellin et l'embryon

Nous allons maintenant comprendre l'importance de la structure cellulaire du feuillet viscéral du sac vitellin qui associe, rappelons-le, les cellules de l'endoderme capables d'absorber les molécules nutritives d'origine maternelle et les cellules du mésoderme. Dans un conceptus en constante croissance, l'apposition des deux couches cellulaires va permettre le développement de vaisseaux drainants à proximité immédiate du site de l'absorption et garantissant ainsi une distribution des molécules absorbées à l'ensemble du sac vitellin. Cette angiogénèse précoce sera rapidement suivie par un phénomène similaire au sein de l'embryon, à l'origine de la vascularisation embryonnaire.

Au stade E7.5, on voit en effet apparaître dans l'épaisseur du feuillet viscéral du sac vitellin de multiples îlots caractérisés par un épaissement de la couche cellulaire du mésoderme extraembryonnaire (Figure 15A et 16A). Un jour plus tard, à E8.5, l'intérieur de cet épaissement est rempli d'érythrocytes embryonnaires, de forme arrondie et nucléés, bordés

d'une couche de cellules qui ont adopté une morphologie fusiforme et forment les cellules endothéliales, première ébauche vasculaire (Figure 16A). La présence au sein de ces îlots d'érythrocytes exprimant la forme embryonnaire de l'hémoglobine et de cellules endothéliales a permis d'identifier une cellule progénitrice commune appelée "hémangioblaste" ou "angioblaste hémogénique", d'origine mésodermique et détectée dès le stade E7.0, exclusivement en région extraembryonnaire (Palis *et al.*, 1999). Le développement de ce progéniteur dans les deux lignages forme la première vague hématopoïétique (Palis and Yoder, 2001), appelée vague primitive (Figure 16B). Quelques heures après, à partir du stade E8.0, les cellules endothéliales des îlots, jusque-là séparés, commencent à fusionner et de cette coalescence globale à l'échelle du sac vitellin, naîtra la première ébauche d'un réseau vasculaire du conceptus dont la structure à E8.5 fait penser aux alvéoles d'un nid d'abeilles et appelé le plexus capillaire primaire (Figure 17). La formation *de novo* de vaisseaux à partir d'hémangioblastes est appelée vasculogénèse.

Indépendamment mais dans le même temps, apparaissent en région ventrale de l'embryon au stade E7.75, juste en dessous du croissant cardiaque, les premiers angioblastes embryonnaires identifiés par l'expression de la protéine KDR à activité tyrosine kinase. Ce marqueur très précoce du lignage endothélial (Yamaguchi *et al.*, 1993) est un des récepteurs du *vascular endothelial growth factor* (Terman *et al.*, 1992), majoritairement impliqué dans la fonction qu'exerce le VEGF sur la stimulation de la prolifération des cellules endothéliales (Fish and Wythe, 2015). Entre les stades E8.0 et E8.5, on observe une prolifération des angioblastes KDR+ qui migrent en région crâniale et caudale du croissant cardiaque, selon deux lignes parasagittales préfigurant la paire d'aortes dorsales, poursuivies en région antérieure par la paire d'artères du premier arc branchial (Chong *et al.*, 2011). Au stade de 2-3 paires de somites, les angioblastes préaortiques fusionnent et forment peu à peu, selon un sens rostrocaudal, une paire de vaisseaux avec une lumière (Figure 18A). En léger décalage mais selon la même séquence, les deux veines vitellines sont formées et établissent au stade six paires de somites une connexion avec le cœur en formation, mettant en communication l'endocarde, le myocarde et les deux cornes gauche et droite du sinus veineux, à ce stade la portion la plus caudale du cœur. Au moment où l'embryon initie son retournement, pour mémoire à 6-8 paires de somites, les veines vitellines sont organisées autour d'une lumière et les premiers érythrocytes embryonnaires sont visibles à l'intérieur, produits à partir de certaines cellules endothéliales des quatre vaisseaux formés, à l'issue d'une transition endothélio-hématopoïétique (Figure 16B). Au stade E9.0, les veines cardinales postérieure, antérieure et les veines ombilicales développées à partir du plexus vasculaire issu de l'allantoïde se développent et se connectent à leur tour au sinus veineux cardiaque (Figure 18A). Dans la région du tronc, les angioblastes forment un plexus vasculaire périneural

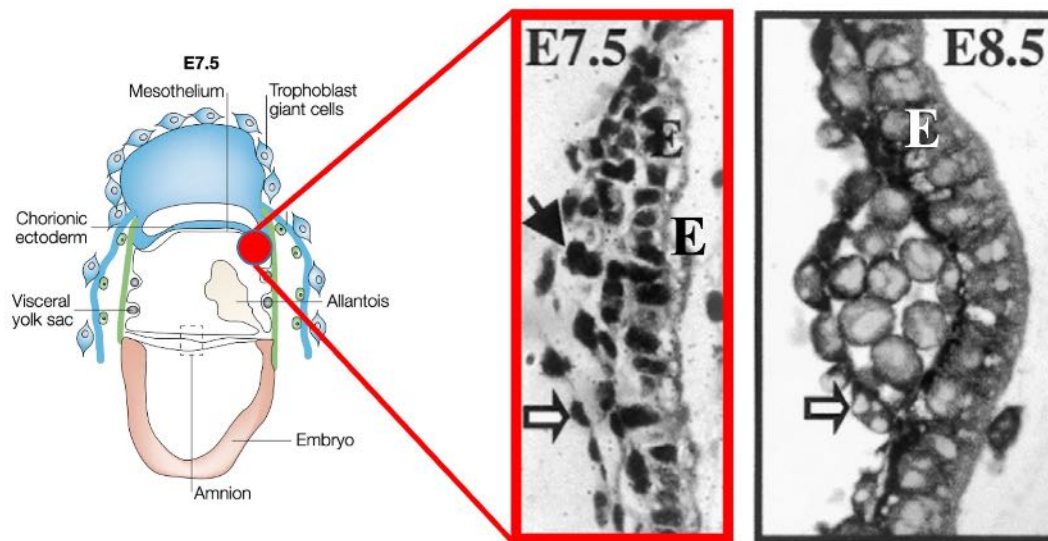
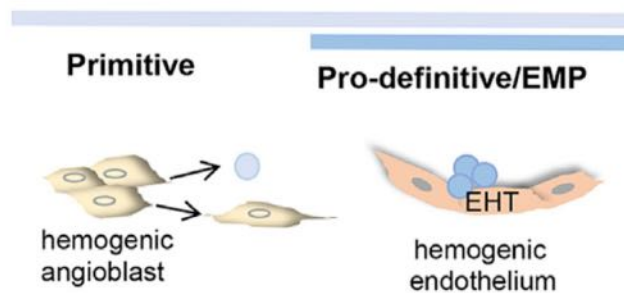
A**B**

Figure 16 : Vagues hématopoïétiques dans le conceptus de souris

(A) Ilots sanguins au stade E7.5 et en rouge, dérivés de cellules du mésoderme extraembryonnaire (flèche noire). Ces cellules sont constitutives du feuillet viscéral du sac vitellin, bordées par les cellules de l'endoderme (E) et du mésoderme (mésothéliales, flèches ouvertes). Chaque îlot est formé de précurseurs des premiers érythrocytes embryonnaires au centre, entourés d'une couche de cellules endothéliales (d'après Rossant et Cross, 2001 ; Palis et Yoder, 2001). (B) Cette hématopoïèse primitive schématisée à gauche sera suivie à partir du stade E8.25 par une seconde vague d'hématopoïèse, appelée Pro-définitive. Initiée dans deux des premiers vaisseaux formés à partir du mésoderme embryonnaire, l'aorte dorsale et la veine cardinale, cette production de précurseurs sanguins (EMP) se fera par transition endothélio-hématopoïétique (EHT) de certaines cellules pariétales (d'après Dzierzak et Bigas, 2018).

(Figure 18B). En région caudale, chacune des deux paires d'aortes dorsales et de veines vitellines latérales fusionnent en une unique aorte dorsale et une unique veine vitelline, toutes deux en position médiane (Chong *et al.*, 2011).

Angiogenèse et remodelage vasculaire

Dans les heures et jours qui suivent, on assiste à une densification de ce réseau vasculaire initial dont la surface s'étend par le mécanisme d'angiogenèse, consistant en une formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux préexistants, accompagnée du remodelage continu de ce réseau formé avec en particulier une spécialisation des territoires artériel, capillaire et veineux (Fish and Wythe, 2015; Patan, 2004). À l'issue de ces étapes reposant sur la croissance, l'émergence latérale vers des territoires avasculaires, la fusion ou l'élagage de vaisseaux, se constitue un véritable arbre vasculaire polarisé (Figure 17A), couvrant à partir du stade E9.0 la surface du sac vitellin (Figure 17B) et ultérieurement, l'ensemble du volume de l'embryon. En particulier, les rameaux vasculaires intersomitiques permettront à ce stade de connecter les vaisseaux issus du plexus neural à la veine cardinale postérieure (Figure 18B).

Au niveau cellulaire, ces mécanismes sont permis par la prolifération, l'apoptose ou l'intussusception des cellules endothéliales (Fish and Wythe, 2015; Patan, 2004; Udan *et al.*, 2013). L'ensemble de ces mécanismes est sous le contrôle majeur des voies de signalisation activées par les facteurs de croissance des familles VEGFs, angiopoïétines et éphrines (Yancopoulos *et al.*, 2000). On peut ici citer la protéine TEK, un des récepteurs de l'angiopoïétine, dont nous parlerons dans notre étude. TEK est exprimée un peu plus tardivement que KDR, dans des cellules endothéliales du sac vitellin et l'ensemble des cellules endothéliales de l'embryon (Kisanuki *et al.*, 2001). Le remodelage est accompagné du recrutement progressif par les cellules endothéliales des cellules environnantes, péricytes, cellules musculaires lisses et fibroblastes.

À E9.5, un flux sanguin est observé dans le réseau vasculaire ainsi constitué dans le sac vitellin et l'embryon, entretenu par des battements cardiaques initiés à E8.0 et devenus de plus en plus rythmés et puissants à partir du stade E9.0. Le moment exact de la connexion entre réseaux artériel et veineux n'est pas encore bien défini (Fish and Wythe, 2015).

2.2.3. Morphogenèse cardiaque entre E7.5 et E9.5

Le cœur est le premier organe fonctionnel de l'embryon et son ébauche débute en même temps que le réseau vasculaire dont nous venons de décrire le développement.

Croissant cardiogénique, champs cardiaques et dérivés

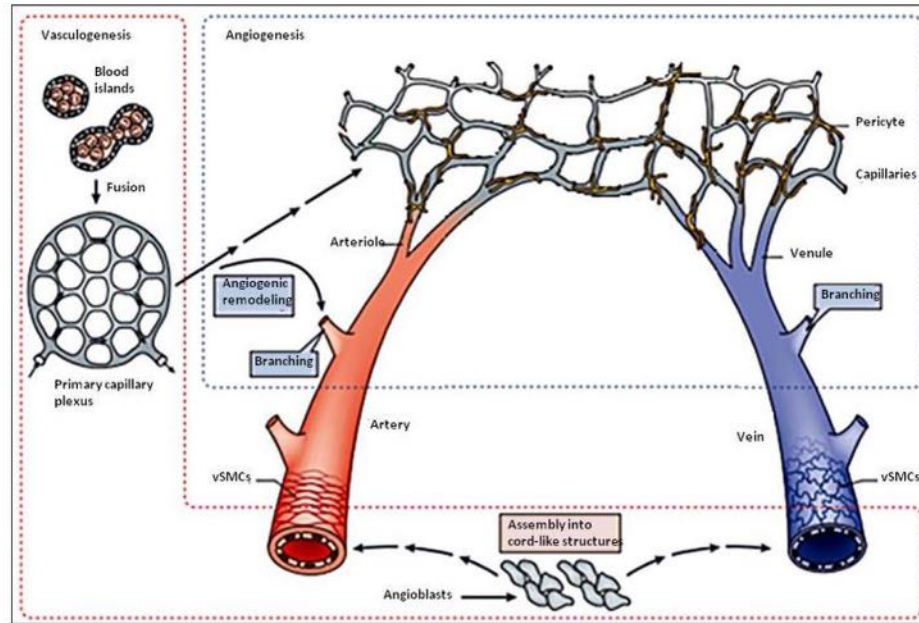
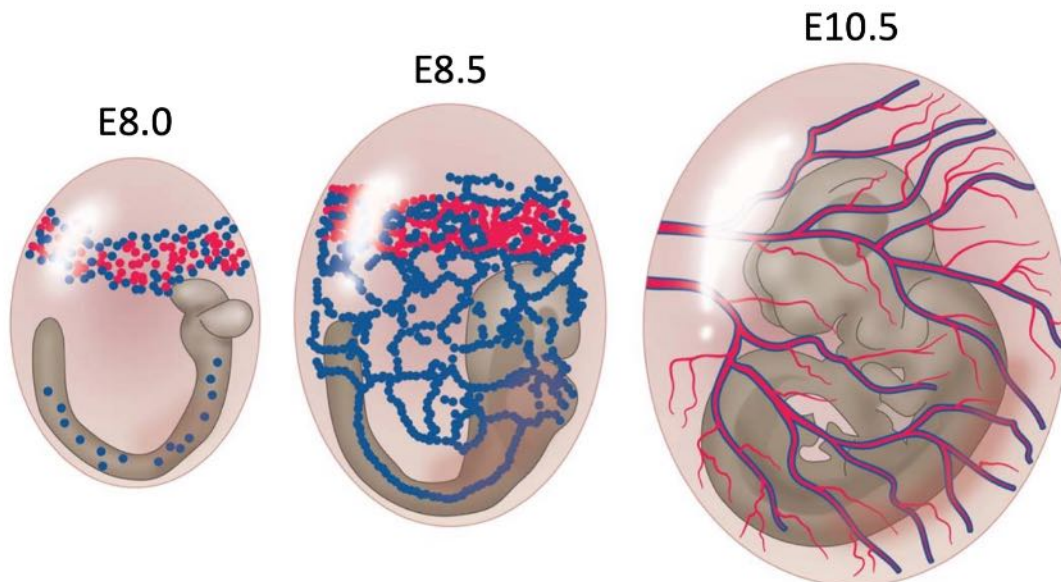
A**B**

Figure 17 : Vasculogénèse et angiogénèse vitelline

(A) Le modèle général de mise en place du réseau vasculaire débute par la fusion des cellules endothéliales qui conduit à la formation de plexus primaires de capillaires de forme alvéolaire (vasculogénèse). Une fois la circulation sanguine établie, les plexus primaires fusionnent, se ramifient (angiogénèse) et se remodelent pour devenir un réseau vasculaire organisé, constitué d'artérioles et artères (rouge), de capillaires (gris) et de veinules et veines (bleu) (d'après Adams & Alitalo 2007). (B) Chronologiquement, on observe ici l'expansion des cellules endothéliales vitellines à partir de E8.0 et leur interconnexion à partir de E8.5, conduisant à la formation du plexus capillaire à l'origine, après fusion et remodelage, des vaisseaux du sac vitellin qu'on peut observer dès le stade E9.0 et contenant des globules rouges (d'après Jones et al., 2006).

Le cœur est au départ une structure mésodermique qui apparaît en région antéroventrale à l'issue du processus de gastrulation. À partir du stade E7.5, des précurseurs issus du mésoderme splanchnique définissent les cornes d'un croissant cardiogénique, appelé premier champ cardiaque, dont le corps central est obtenu après migration convergente vers l'axe médian de l'embryon des précurseurs en prolifération. Ce croissant initial se loge juste en dessous de la plaque neurale céphalique et il est doublé d'un croissant de précurseurs issus du mésoderme pharyngé, appelé second champ cardiaque (Figure 19). Ces deux champs cardiaques sont à l'origine du myocarde primitif. Nous avons vu plus haut qu'à E7.75, une ligne d'angioblastes, toujours d'origine mésodermique, apparaît sous ce double croissant. Nous avons décrit que ces angioblastes migraient en région crâniale et caudale du croissant pour devenir les précurseurs vasculaires. Nous ajoutons maintenant qu'une partie de ces cellules pénètre dans le croissant cardiogénique pour y former l'endocarde, couche cellulaire la plus interne du futur cœur. L'endocarde établira ultérieurement une connexion directe avec l'endothélium des vaisseaux attachés au cœur. À E8.0, les lignes latérales ont fusionné, le cœur est une masse tubulaire médiane et symétrique attachée à l'embryon par un mésentère dorsal. La région caudale échappe à la fusion médiane et demeure sous forme de deux cornes du sinus veineux. À ce stade, on peut observer les premières contractions des cardiomyocytes, lentes, irrégulières et non synchronisées.

À l'issue du développement cardiaque, les deux champs cardiaques auront contribué chacun aux différentes portions anatomiques du cœur. La contribution majeure en nombre de structures est celle du second champ qui donne naissance au quasi ensemble du cœur et d'une partie des vaisseaux qui s'y attachent, à l'exception du ventricule gauche dérivé du premier champ cardiaque. De la tête vers la queue de l'embryon, les différentes parties du cœur telles qu'on peut les observer à E9.5 sont l'*outflow tract* qui deviendra une partie des artères aortes et pulmonaires, le *bulbus cordis* qui deviendra le ventricule droit, la chambre ventriculaire qui deviendra le ventricule gauche, la chambre atriale commune qui deviendra les atriums gauche et droit (Figure 19), enfin les sinus veineux droit et gauche dans lesquels aboutissent les veines vitellines, ombilicales et cardinales. Le sinus droit deviendra ultérieurement la veine cave caudale.

Du tube cardiaque au cœur à quatre cavités

En une journée, autour du stade E8.5 et plus précisément entre les stades 2-3 paires de somites (E8.5 précoce) et ≥ 11 paires de somites (E8.5 tardif), la morphologie externe cardiaque est profondément modifiée (Figure 20). L'ébauche cardiaque, initialement un tube à 3-5 paires de somites puis une structure globulaire symétrique à 6-8 paires de somites, est le lieu d'une forte croissance du ventricule gauche alimentée en particulier par une prolifération très active des cellules du second champ cardiaque qui se déplacent également très

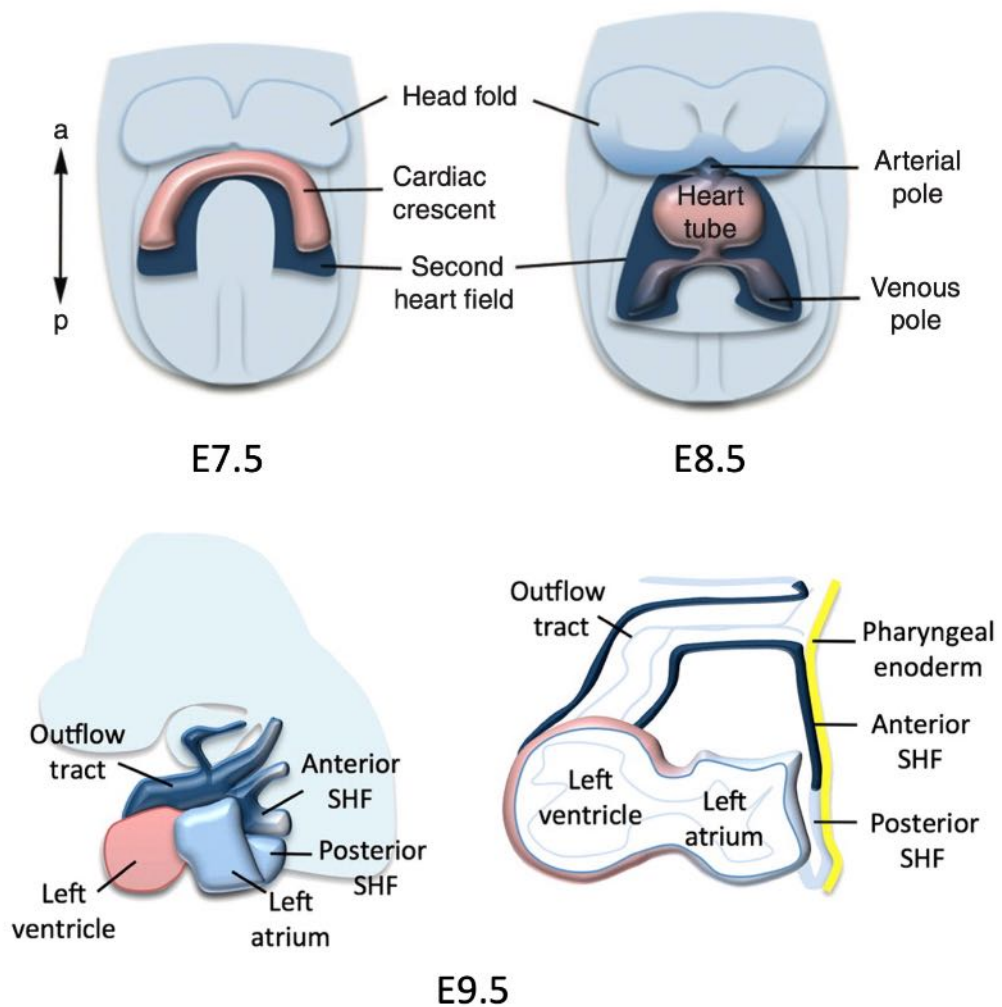


Figure 19 : Contribution des champs cardiaques embryonnaires au cœur à quatre cavités

Dessins montrant les étapes du développement cardiaque de la souris. Stade E7.5 (croissant cardiaque), E8.5 (tube cardiaque précoce), E9.5 (cœur retourné). Les cellules progénitrices du croissant cardiaque représenté en rose donne naissance au ventricule gauche, celles du second champ cardiaque, représenté en bleu foncé, les oreillettes droite et gauche, le ventricule droit ainsi que les voies d'éjection. (d'après Kelly et al., 2014 et Francou et al., 2013). SHF, second champ cardiaque.

rapidement en même temps qu'elles initient leur programme de différenciation myocardique (Kelly *et al.*, 2014). Le pôle caudal du tube cardiaque est le plus actif dans cet ajout de cellules qui exerce une poussée avec pour conséquence un déplacement vers la droite du ventricule droit. Cette asymétrie induite est concomitante du démarrage du retournement de l'embryon et de la fermeture en cours du tube neural, à 7-8 paires de somites. La poursuite de la croissance du ventricule gauche conduit dans un second temps à déplacer la chambre atriale commune vers la gauche et en région dorsale, imprimant au cœur une asymétrie et une forme en "S" à la fin du stade E8.5, avec les ventricules en région caudale et ventrale, tandis que la chambre atriale et l'*outflow tract* sont en région rostrale et en position plus dorsale (Figure 20). Cette séquence de mouvements morphogénétiques est nommée le looping cardiaque (Kelly, 2012; Le Garrec *et al.*, 2017).

Dans la continuité et à partir de E9.0, on observe un phénomène de ballonnement du cœur, caractérisé par une forte augmentation de l'épaisseur des parois musculaires ventriculaires et dans une moindre mesure du *bulbus cordis* et de la chambre atriale commune, qui sera à son tour touchée par cette augmentation d'épaisseur et de volume quelques heures plus tard, au stade E9.5. Parallèlement, on observe une réduction du diamètre de la lumière du *bulbus cordis* et de l'*outflow tract* ainsi qu'une striction du canal atrioventriculaire par croissance des coussins bulbaires à l'origine des futures valves atrioventriculaires. Côté droit, un sillon se creuse entre le ventricule gauche et le *bulbus cordis*, préfigurant le septum interventriculaire (Figure 19). À E11.5, les quatre cavités seront bien individualisées et la septation sera complète à E14.5 (Andrés-Delgado and Mercader, 2016).

Au plan fonctionnel, les contractions s'amplifient à partir de E9.0, la fréquence cardiaque est de 100 battements par minute. Logiquement, l'analyse ultrastructurale du myocarde révèle à partir de ce stade une amplification de la myofibrillogénèse (Kaufman, 1992). À E14.5, la fréquence du cœur dépasse 190 battements par minute et la combinaison du débit cardiaque augmenté et de la résistance vasculaire croissante permet d'atteindre dans l'embryon une valeur de pression systolique dépassant 10 mmHg (Andrés-Delgado and Mercader, 2016).

Contrôle de la spécification des lignages cardiaques et gelée cardiaque

La spécification des cellules du mésoderme splanchnique latéral en cellules cardiogéniques résulte d'une interaction localisée de signaux moléculaires inducteurs, en provenance de l'endoderme et de l'ectoderme adjacent, et inhibiteurs en provenance de la ligne médiane et de la partie postérieure de l'embryon (Kelly *et al.*, 2014). Les facteurs de croissance FGF, WNT et BMP interviennent et leur combinaison induira l'expression précoce dans les cellules cardiogéniques du facteur de transcription MESP1 (Liang *et al.*, 2015), exprimé dans une

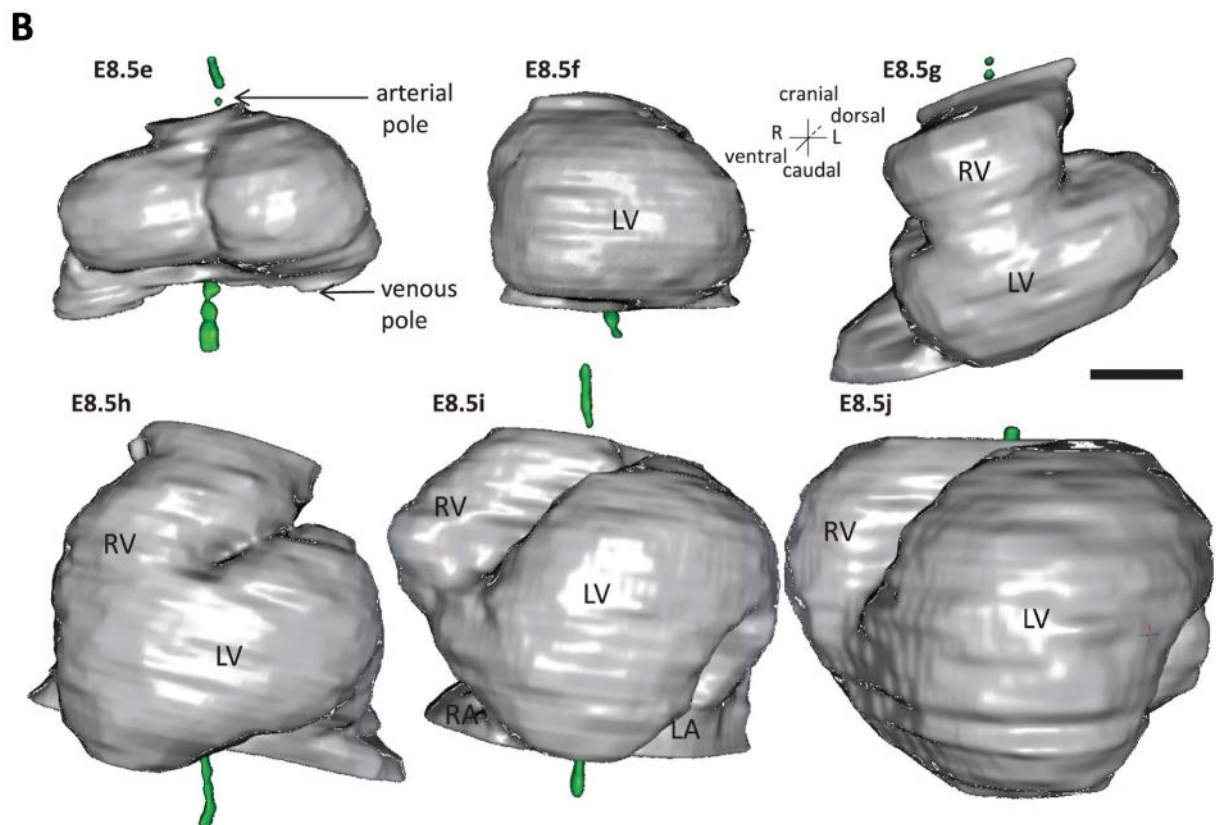
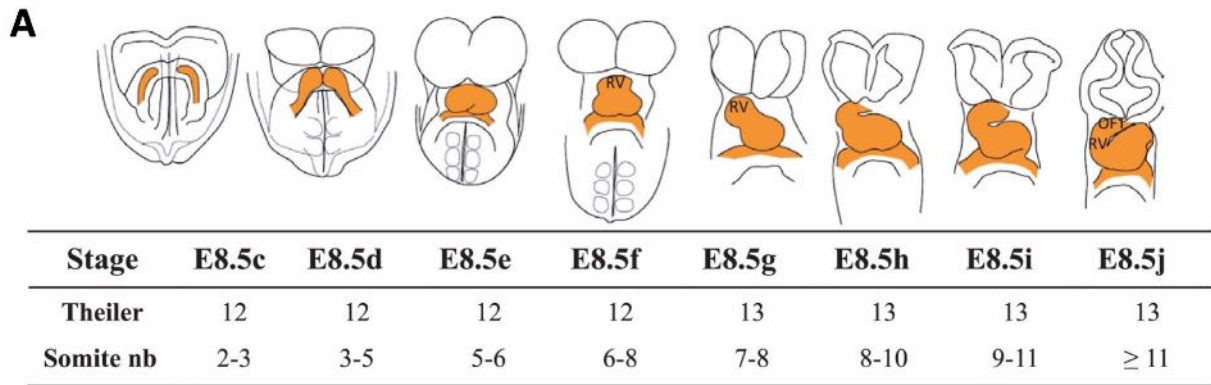


Figure 20 : Évolution morphologique du cœur de l'embryon de souris entre les stades E7.5 et E9.5

(A) Représentation schématique des changements de forme pendant la formation du cœur (orange) dans l'embryon de souris. De E8.5c jusqu'à E8.5f, l'embryon est symétrique et le tube cardiaque est droit. Le cœur exécute ensuite un mouvement de looping qui accompagne la formation des cavités cardiaques (d'après *Le Garrec et al., 2017*). (B) Reconstruction 3D du cœur à partir d'images obtenues en microscopie épiscopopie à haute résolution, à chacune des étapes autour de la phase de looping. L, gauche ; LA, oreillette gauche ; LV, ventricule gauche ; OFT, *outflow tract* ; R, droite ; RA, oreillette droite ; RV, ventricule droit (d'après *Le Garrec et al., 2017*).

grande majorité des cellules cardiaques comme nous le verrons. La poussée proliférative du second champ cardiaque est également soutenue par l'activation de la signalisation FGF (Kelly *et al.*, 2014).

Dès la formation du tube cardiaque, une matrice extracellulaire sépare l'endocarde du myocarde. À partir du stade E8.0, cette matrice est imprégnée d'une trentaine de protéines dont des collagènes (Krug *et al.*, 1985), de glycoprotéines incluant la fibronectine et la laminine et de glycosaminoglycanes telles que l'acide hyaluronique ou l'héparine (Zucker, 2011). Ces molécules sont sécrétées par les cellules du myocarde et forment ce qu'on appelle la gelée cardiaque, colorable sur coupe histologique au bleu alcian, un marqueur des glycosaminoglycanes. L'épaisseur de la gelée cardiaque n'est pas homogène, on la trouve ainsi en plus grande quantité dans la chambre ventriculaire commune que dans la chambre atriale. La gelée jouerait plusieurs rôles successifs. À E8.5, la production importante de la gelée serait responsable de l'initiation du pliage du tube cardiaque, soumis à une forte pression du fait de son volume très augmenté et bloqué en région dorsale du fait de la rigidité du mésocardium (Zucker, 2011). Un peu plus tard, elle jouerait dans la chambre ventriculaire d'une part un rôle de valve moléculaire transitoire à la jonction atrioventriculaire, d'autre part un rôle physique facilitateur de l'activité de pompage du sang à sens unique. Il a ainsi été estimé que pour induire une circulation sanguine, un cœur à activité contractile péristaltique, ce qui est le cas du cœur avant son looping, l'épaisseur de la gelée cardiaque doit dépasser la valeur de 45% de la valeur du rayon de la lumière cardiaque en diastole (Barry, 1948). En dessous de cette valeur, les globules rouges refluent et le sang ne progressent pas. Encore un peu plus tard, la gelée cardiaque serait l'élément chimique inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules endocardiques ainsi que le support physique de leur migration en direction du myocarde, au sein de la matrice. Cette transition est responsable de la formation des coussins endocardiques du canal atrioventriculaire et de la jonction entre les ventricules et l'*outflow tract*, à l'origine de la formation des valves atrioventriculaires et artérielles définitives (Zucker, 2011).

2.3. Fonction et dysfonction mitochondriale

2.3.1. Structure et fonction respiratoire de la mitochondrie

Origine et structure des mitochondries

Selon la théorie endosymbiotique, la mitochondrie est issue de l'intégration d'un endosymbiote procaryote par une cellule eucaryote, il y a 1.5 milliards d'années lorsque l'atmosphère terrestre s'est enrichie en oxygène (Gray and Burger, 2001).

Ce phénomène évolutif de symbiose a permis à la cellule hôte d'utiliser l'oxygène pour produire de l'énergie et ainsi de survivre en condition aérobie. Aujourd'hui, cette théorie est largement acceptée et a été corroborée par certaines caractéristiques bactériennes maintenues chez les mitochondries (Wang and Wu, 2015).

La mitochondrie dispose de son propre matériel génétique et contient 37 gènes dont 13 codent pour les sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire (Calvo and Mootha, 2010). Cependant, la mitochondrie n'est pas autonome et le génome nucléaire porte l'information de la majorité des protéines mitochondriales qui sont importées dans la mitochondrie par les complexes de translocation TIM/TOM (Voisine *et al.*, 1999).

Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant ainsi deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice (Figure 21A).

La membrane externe est une membrane classique, lisse composée de 40% de lipides et de 60% de protéines. Les protéines sont majoritairement impliquées dans le transport de métabolites ou de protéines. Par exemple, les porines permettent le transport des molécules de moins de 30kDa, le complexe TOM (Transport Outer Membrane) reconnaît les protéines adressées à la mitochondrie et permet leur import dans l'espace intermembranaire (Wiedemann *et al.*, 2004).

La membrane interne présente des similitudes de composition lipidique avec les membranes bactériennes. Elle est composée de 75% de protéines et seulement 25% de lipides avec un faible taux de cholestérol et une forte concentration en cardiolipine (20%) (Zinser *et al.*, 1991). La cardiolipine (ou glycérol bisphosphatidyle) est un phospholipide double, particulier qui du fait de sa composition (il renferme 4 acides gras) rend la membrane imperméable aux ions (surtout aux protons). Ce lipide est indispensable au bon fonctionnement de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale).

Les protéines de la phosphorylation oxydative sont majoritairement localisées dans les crêtes mitochondriales. Des protéines assurant d'autres fonctions sont également présentes dans la membrane interne mitochondriale : des transporteurs ADP/ATP, des canaux ioniques, le

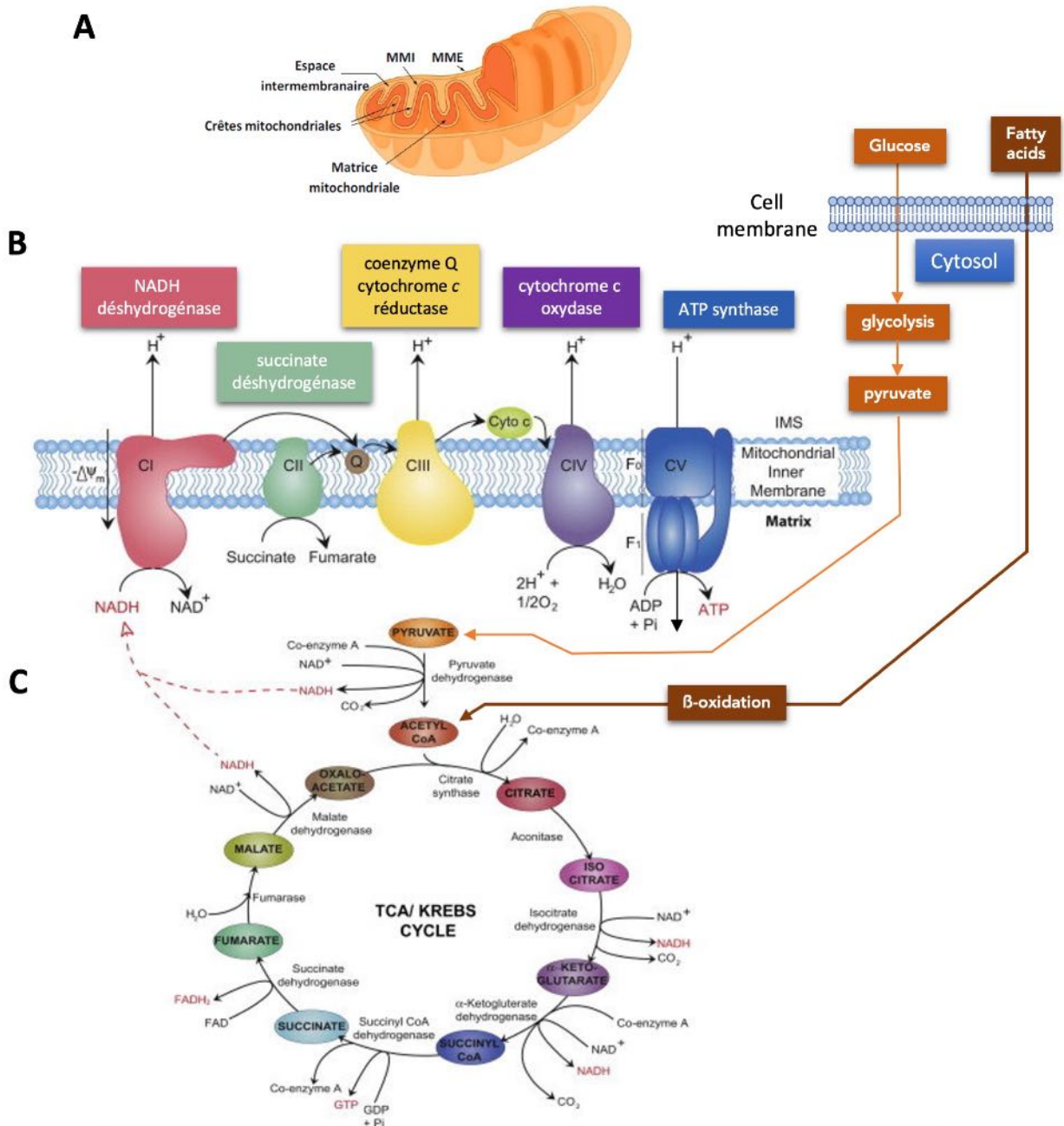


Figure 21 : Mitochondrie, crêtes de la membrane interne et complexes de la phosphorylation oxydative

(A) Vision tridimensionnelle d'une mitochondrie et de ses crêtes : la mitochondrie est un organelle délimité par deux membranes, une membrane externe (MME) et une interne (MMI) de part et d'autre de l'espace intermembranaire. La membrane interne s'invagine pour former des crêtes, délimitant ainsi la matrice. (B) Au niveau des crêtes, la chaîne respiratoire composée des complexes I à IV (CI, CII, CIII, CIV ; leur nom développé est indiqué au dessus de chacun des complexes) permet le transfert des électrons fournis par le NADH, le succinate et les flavoprotéines jusqu'à la coenzyme Q qui formera l'ubiquinol (CoQH₂). Le complexe III transfère les électrons au cytochrome c dans l'espace intermembranaire qui libèrera ses électrons transférés sur l'oxygène par le complexe IV, pour former de l'eau. Ce transfert est accompagné du pompage de protons par les complexes I, III et IV, générant un gradient électrochimique qui fournira l'énergie nécessaire pour actionner le rotor moléculaire de l'ATP synthase (complexe V) et la production d'ATP (d'après Zeviani et al., 2004). (C) Schéma général du cycle de l'acide citrique [cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)] au cours duquel l'acétyl-coenzyme A résultant de la dégradation des acides gras ou des glucides est oxydé avec production d'électrons transférés à la chaîne respiratoire via le NADH ou le CoQH₂, permettant à leur tour la production d'ATP via la phosphorylation oxydative de l'ADP décrite en B.

complexe TIM (Transport Inner Membrane) qui permet l'insertion des protéines dans la membrane interne ou leur import dans la matrice mitochondriale.

L'espace intermembranaire (IMS) est un compartiment où transitent les molécules de taille inférieure à 10 kDa qui ont traversé la membrane externe. Il est fortement concentré en protons et contient de nombreuses protéines qui peuvent avoir un rôle dans la physiologie cellulaire, en particulier le cytochrome c et des pro-caspases impliquées dans l'apoptose et un important groupe d'enzymes qui métabolisent l'ATP : la créatine kinase, la myokinase et la nucléoside diphosphate kinase (cytidine diphosphate kinase) (Logan, 2006).

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

Complexes de la chaîne respiratoire

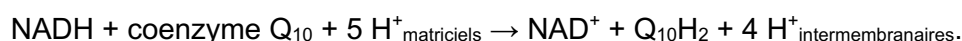
Les mitochondries jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire, elles sont considérées comme de véritables usines énergétiques, en effet, elles produisent la majorité de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules eucaryotes.

La chaîne respiratoire correspond à une association de 5 complexes enzymatiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Les 4 premiers complexes de CI-CIV permettent le transport d'électrons et sont couplés à un dernier complexe enzymatique CV appelé aussi l'ATP synthase qui catalyse la production de l'ATP (Figure 21).

Le complexe I (CI) = NADH déshydrogénase ou bien NADH coenzyme Q réductase

Le complexe I bovin est constitué de 45 sous-unités dont 7 sont codées par le génome mitochondrial (Carroll *et al.*, 2006). Ces 45 sous-unités s'assemblent en trois domaines distincts : un domaine matriciel (22 sous-unités) et deux domaines membranaires localisés dans la membrane mitochondriale interne (13 et 8 sous-unités respectivement).

Ce complexe a une action NADH coenzyme Q réductase récupérant les électrons de NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire.

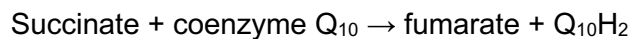


Le complexe II (CII) = succinate déshydrogénase (ou succinate –Coenzyme réductase)

Elle est le deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire (Cecchini, 2003). Cette enzyme présente la particularité d'appartenir à la fois au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire.

Elle est constituée de quatre sous unités et de plusieurs cofacteurs : FAD, centre fer-souffre et un groupement héminique qui ne participe pas au transfert des électrons à la coenzyme Q10 mais jouerait un rôle important en limitant la production des dérivés réactifs de l'oxygène.

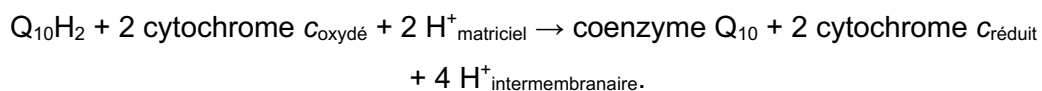
Elle catalyse l'oxydation de succinate en fumarate et la réduction de la coenzyme Q10. Cette réaction libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH, ce qui fait que le complexe II ne contribue pas à la génération du gradient de concentration de protons.



Le complexe III (CIII) = cytochrome c réductase ou complexe cytochrome bc1

Chez les mammifères, il s'agit d'un dimère de deux complexes formés chacun de 11 sous unités, un cluster (2Fe-2S) et trois cytochromes : un cytochrome c1 et deux cytochromes b (Iwata *et al.*, 1998).

Le complexe III catalyse l'oxydation d'une molécule d'ubiquinol Q10H2 et la réduction de deux molécules de cytochrome c. contrairement à la coenzyme Q10 qui transporte deux électrons par molécule, le cytochrome c ne transporte qu'un électron par molécule.

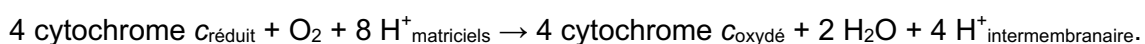


Le complexe IV (CIV) = cytochrome c oxydase

Chez les mammifères, la structure de cette enzyme est extrêmement compliquée : elle est formée de 13 sous unités, deux groupes hémériques et plusieurs cofacteurs renfermant des ions métalliques, trois cuivre un magnésium et un zinc.

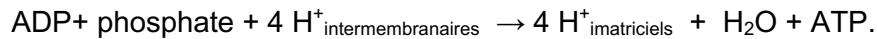
Cette enzyme catalyse le transfert d'électrons à une molécule d'oxygène O2 tout en pompant des protons à travers la membrane mitochondriale interne (Yoshikawa *et al.*, 2006).

Deux molécules d'eau sont formées par molécule d'oxygène réduit, tandis que quatre protons sont expulsés vers l'espace intermembranaire mitochondrial, ce qui contribue à la génération du gradient de concentration de protons à travers la membrane interne :



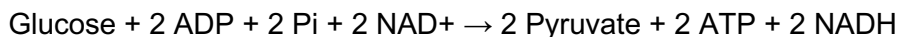
Le complexe V (CV) = l'ATP synthase

Elle est composée de deux sous-unités principales : F0 une protéine polaire intégrale de la MI et F1 une sous-unité globulaire associée à F0 du côté de la matrice mitochondriale. Le complexe F0 F1 ATP synthase utilise l'énergie stockée sous forme de gradient de concentration de protons à travers une membrane pour actionner la phosphorylation de l'ADP en ATP. Le nombre estimé de protons requis par molécule d'ATP synthétisée varie selon les sources entre trois et quatre (Yoshida *et al.*, 2001).

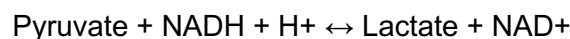


Phosphorylation oxydative ou couplage OXPHOS

La phosphorylation oxydative (ou OXPHOS) est la voie métabolique dans laquelle les cellules utilisent des enzymes pour catalyser l'oxydation des substances nutritives, libérant ainsi l'énergie nécessaire pour reformer l'ATP. Dans la plupart des eucaryotes, la phosphorylation oxydative se déroule à l'intérieur des mitochondries chez presque tous les organismes aérobies. Cette voie est nécessaire car c'est un moyen très efficace pour générer de l'énergie selon la réaction suivante :



En mode anaérobie, la glycolyse est dite incomplète et le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) selon la réaction :



Pour son oxydation complète, le pyruvate est importé dans la mitochondrie et subit une décarboxylation par la pyruvate déshydrogénase, ce qui aboutit à la formation d'acétyl-coA.

Les acides gras sont, dans un premier temps, transformés en acyl-coA par l'acyl-coA synthétase dans le cytoplasme.

Les acyl-CoA produits sont importés dans la mitochondrie où ils vont être dégradés lors de plusieurs cycles successifs de β -oxydation en acétyl-coenzyme A. Chaque cycle de β -oxydation retire deux carbones à l'acyl-coA et permet la production d'une molécule d'acétyl-coA et des équivalents réduits NADH et FADH₂.

La dégradation de l'acétyl-CoA est associée à la production de quatre équivalents réduits (3 NADH et 1 FADH₂) qui vont être oxydés par la chaîne respiratoire (par le complexe I pour le NADH et par le complexe II pour le FADH₂). Ces oxydations vont permettre le transfert d'électrons au sein des différents complexes on parle ainsi de réactions couplées d'oxydoréduction.

L'énergie libérée par les électrons circulant à travers cette chaîne de transport est utilisée pour le transport des protons à travers la membrane mitochondriale interne, ce processus est appelé le transport des électrons. Ceci génère une énergie potentielle sous forme d'un gradient de pH et d'un potentiel électrique à travers cette membrane.

Cette réserve d'énergie est exploitée pour permettre aux protons de refluer à travers la membrane contre le gradient à travers une grande enzyme appelée ATP synthase ; ce processus est connu sous le nom chimiosmose. Cette enzyme utilise de l'énergie pour produire de l'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) par la réaction de phosphorylation. Cette réaction est entraînée par le flux de protons, ce qui force la rotation d'une partie de l'enzyme ; l'ATP synthase est un moteur mécanique rotatif (Figure 21) (Science, 2017).

Au niveau de la graisse brune on trouve beaucoup de mitochondries, qui possèdent une protéine que l'on appelle thermogénine (UCP1 pour UnCoupling Protein). C'est un canal ionique qui permet la dissipation d'énergie, qui est alors convertie en chaleur par oxydation mitochondriale des acides gras. Cette oxydation entraîne une consommation élevée d'oxygène et fait intervenir les cytochrome oxydases (CIV de la chaîne de transport des électrons, abondants et responsables de la couleur brune). La chaleur est alors transmise au sang, les tissus adipeux bruns multiloculaires ayant une riche vascularisation. On parle d'effet découplant ou de découplage de la phosphorylation oxydative, car le transport des électrons et la création d'un gradient de protons sont découplés de la synthèse d'ATP. Les enzymes de phosphorylation, notamment les ATP synthases sont en effet absentes de ce processus (Chechi *et al.*, 2013).

2.3.2. Quantification du couplage mitochondrial avec un Seahorse

Le taux de consommation d'oxygène (OCR) est mesuré avant et après l'ajout d'inhibiteurs de divers complexes de la respiration mitochondriale.

Initialement, l'OCR cellulaire de base est mesuré en mettant dans le milieu les substrats de complexe I (pyruvate, malate, glutamate et ADP). À partir de cette OCR la respiration basale peut être dérivée en soustrayant la respiration non mitochondriale. Ensuite, on ajoute le succinate qui stimule le complexe II (on mesure donc toujours la respiration couplée à une production d'ATP).

Puis l'oligomycine, un inhibiteur de ATP synthase (complexe V), est ajoutée et l'OCR résultant est utilisé pour dériver la respiration liée à l'ATP (en soustrayant le taux d'oligomycine de l'OCR

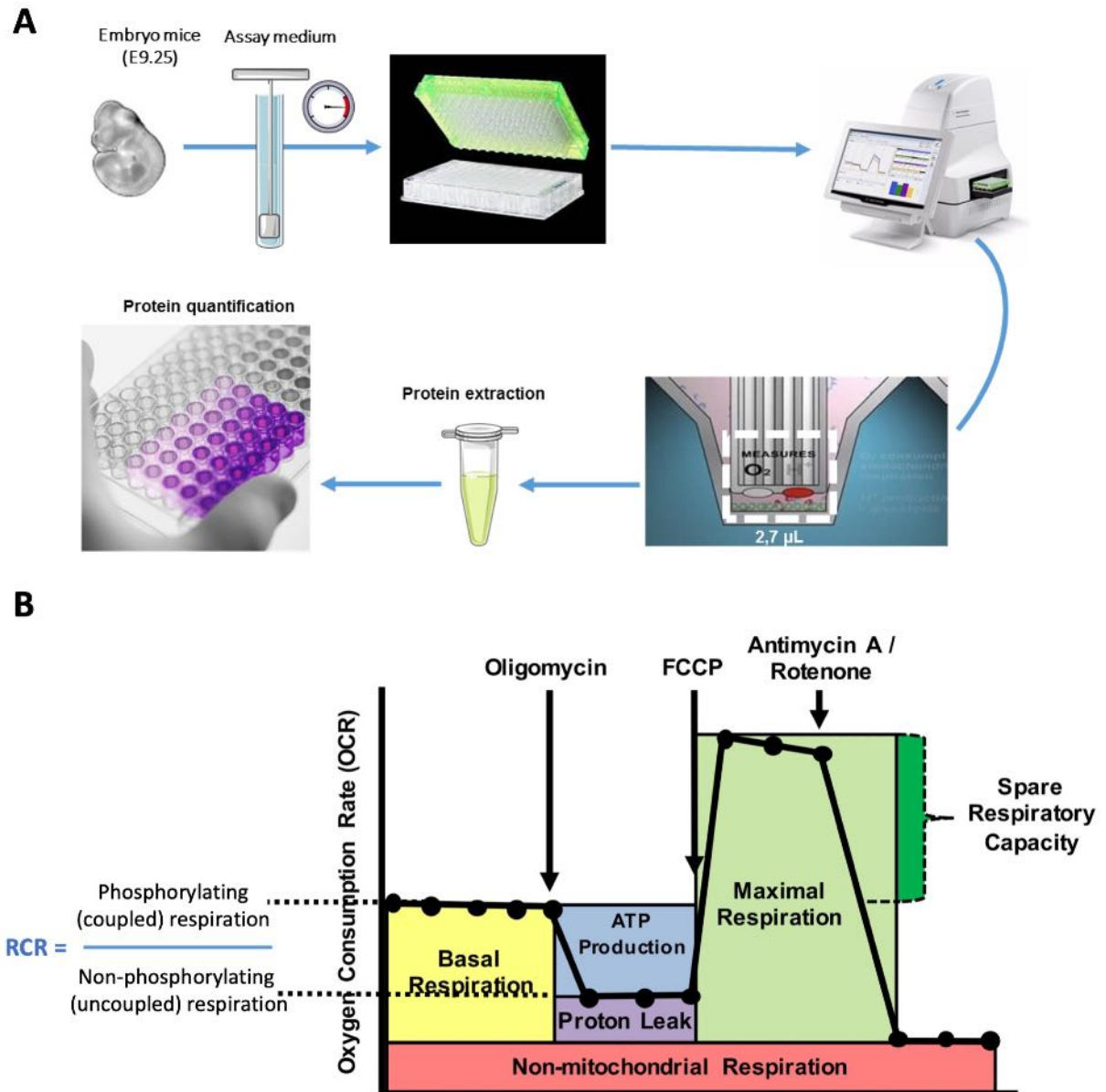


Figure 22 : Quantification normalisée du couplage mitochondrial

(A) Le broyat d'embryons de souris est réalisé dans un *medium assay* contenant ainsi de l'ADP et des substrats énergétiques activant les complexes I et II, puis il est transféré dans une plaque centrifugée pendant 20 minutes. La mesure du couplage mitochondrial est réalisée, puis le lysat récupéré pour quantification des protéines mitochondriales en vue de la normalisation des paramètres respiratoires (B) Courbe de la consommation d'oxygène à partir de l'analyse de flux extracellulaire : on mesure la respiration couplée graduelle en ajoutant les substrats activant le fonctionnement du complexe I (pyruvate, malate, glutamate et ADP) puis le succinate qui stimule le complexe II. L'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthase, l'oligomycine, permet la mesure de la respiration non couplée. Le *respiratory control ratio* (RCR) est calculé en divisant la valeur de la respiration couplée par la valeur de la respiration non couplée. L'ajout d'une molécule de découplage (FCCP) qui permet de mesurer la respiration maximale de la chaîne respiratoire. La roténone et l'antimycine A inhibent respectivement les complexes I et III, annulant tout fonctionnement de la chaîne respiratoire (d'après Rose et al., 2014).

cellulaire de base) et la respiration par fuite de protons (en soustrayant la respiration non mitochondriale du taux d'oligomycine).

Ensuite, le cyanure de carbonyle-p-trifluorométhox-yphényl-hydrazon (FCCP), un protonophore, est ajouté pour réduire le gradient de membrane interne, permettant la chaîne respiratoire de fonctionner à son taux maximal, et la capacité respiratoire maximale est dérivée en soustrayant la respiration non mitochondriale du FCCP taux. Enfin, de l'antimycine A et roténone, des inhibiteurs des complexes III et I, sont ajoutés et révèlent la respiration non mitochondriale. La capacité de réserve mitochondriale est calculée en soustrayant la respiration basale de la capacité respiratoire maximale (Rose *et al.*, 2014) (Figure 22 B).

2.3.3. Les syndromes mitochondriaux : une dysfonction multi-organes

Définition d'un syndrome mitochondrial et causes génétiques

Le syndrome mitochondrial englobe un ensemble de pathologies en rapport avec le dysfonctionnement de la mitochondrie. Elle se traduit par un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc une production insuffisante d'ATP. Ce trouble est la conséquence de mutations ou délétions dans des gènes codant des protéines mitochondriales, ces dernières étant codées en grande partie dans l'ADN nucléaire puis le reste dans ADN mitochondrial (Loublier *et al.*, 2009).

Les maladies mitochondriales sont de plus en plus diagnostiquées en raison des progrès technologiques réalisés avec les techniques de séquençage à haut débit (NGS).

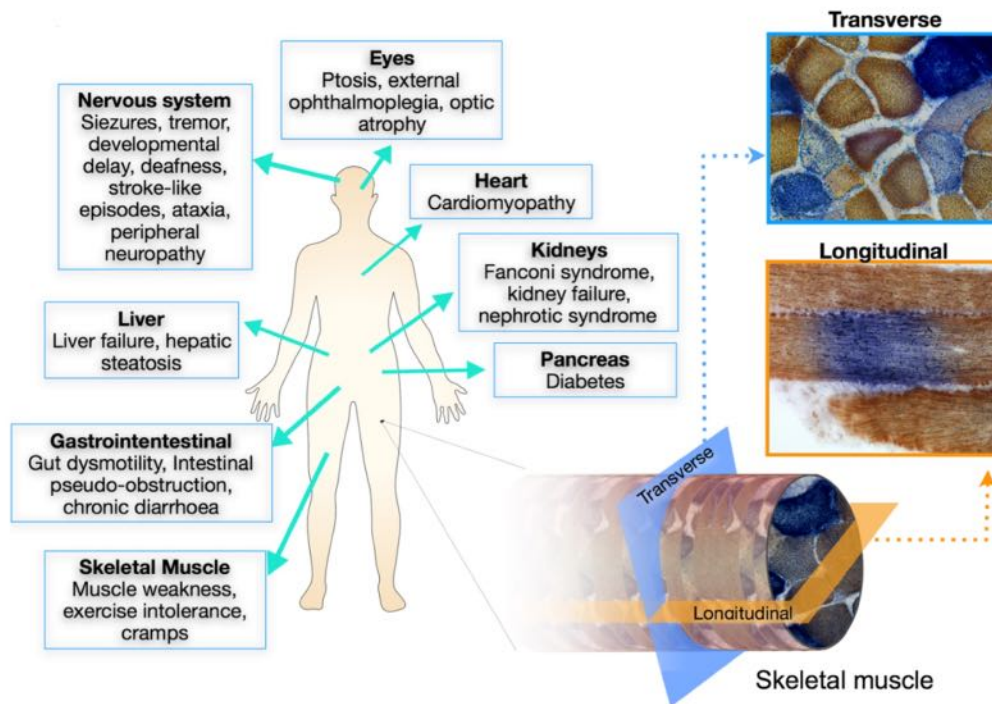
Les mutations provoquant une myopathie mitochondriale peuvent être trouvées dans soit l'ADNmt ou l'ADNn vu leurs origines génétiques doubles. Aujourd'hui, 37 gènes de l'ADNmt et plus de 254 gènes codés par l'ADNn ont été rapportés comme responsables dans les syndromes mitochondriaux (Frazier *et al.*, 2019).

Présentation clinique et biomarqueurs utilisables

Les syndromes mitochondriaux sont des troubles multi-systémiques qui présentent une grande variété de troubles. Elles peuvent toucher tous les tissus mais les organes les plus touchés sont ceux qui ont une forte demande énergétique comme le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur, le foie et le rein (Figure 23A).

On observe ainsi une multitude de symptômes, les plus fréquents étant : une encéphalopathie, une cardiomyopathie, une myopathie, une atrophie optique, un retard mental, une épilepsie, un diabète, une surdité, une cécité, une insuffisance hépatique, des paragangliomes - tumeurs neuroendocrines rares qui se développent le plus souvent au niveau du corps de la carotide ou du glomus jugulaire – à, des syndromes multi viscéraux (par exemple, ataxie de Friedrich, MELAS, MERRF, NARP, MNGIE). Ces maladies peuvent se manifester à tout âge, allant de

A



B

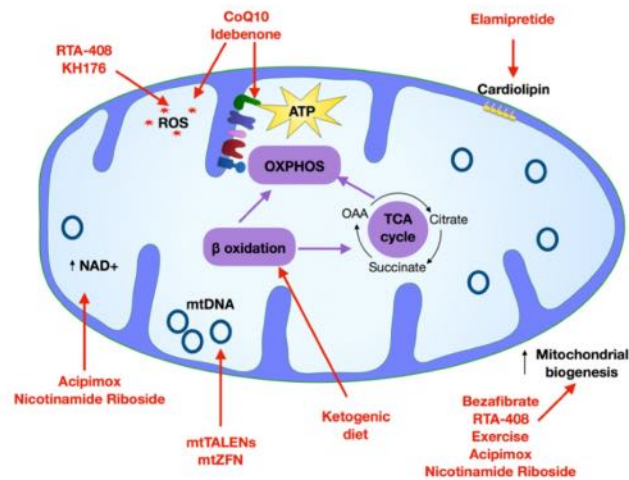


Figure 23 : Atteintes mitochondriales syndromiques

(A) Les maladies mitochondriales sont des troubles systémiques (multi-organes ou atteintes syndromiques) qui induisent une grande variété de signes neurologiques, musculaires, hépatiques et gastro-intestinaux, entre autres (à gauche). La coloration de coupes histologiques réalisées à partir de biopsies musculaires montrent une mosaïque de fibres musculaires normales, COX-positives (orange) et de fibres atteintes, déficientes en COX et de couleur bleue (SDH+). Ce double marquage réalisé sur une coupe longitudinale permet de révéler une déficience en COX parfois limitée à un segment restreint, entouré de régions COX positives (orange) (d'après Ahmed et al., 2018). (B) Schéma présentant certaines molécules actuellement testées pour le traitement des myopathies mitochondriales. Ces molécules ciblent la biogenèse mitochondriale (bézafibrate, RTA-408, acipimox et nicotinamide riboside), la phosphorylation oxydative (CoQ10, idébénone), les espèces réactives de l'oxygène (RTA-498, KH176, CoQ10, idébénone). Elles peuvent aussi viser à augmenter le NAD⁺ (acipimox et nicotinamide riboside), sont des lipides alimentaires (régime cétogène) ou des peptides stabilisateurs des cardiolipides (élamipréptide) (d'après Ahmed et al., 2018).

formes létales en période néonatale jusqu'à des formes modérées chez l'adulte. De manière générale, plus elles apparaissent tôt plus leur phénotype est sévère et ce phénotype s'aggrave généralement avec le temps avec une évolution des symptômes déjà présents et/ou l'apparition de nouveaux symptômes (Bénil *et al.*, 2009).

La difficulté du diagnostic est liée au double contrôle génomique avec notamment la notion d'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial et un nombre élevé des gènes nucléaires impliqués. En cas de suspicion de syndrome mitochondrial, le diagnostic repose en grande partie sur l'identification enzymatique du ou des complexe(s) déficitaire(s) dans la chaîne respiratoire. C'est à partir de ce diagnostic enzymatique qu'on recherche ensuite le défaut sous-jacent à partir des biopsies tissulaires (muscle, rein, foie, cœur). Il faut noter que ce diagnostic enzymatique est difficile, notamment, à cause de la spécificité tissulaire des maladies mitochondriales, de la difficulté de connaître la fourchette des valeurs enzymatiques normales, de l'impossibilité de détecter certains défauts par un test enzymatique. Pour cela il vaut mieux commencer par la recherche d'accumulation de l'acide lactique dans l'organisme.

Finalement, le recours à l'imagerie comme IRM et scanner est utilisé aussi pour diagnostiquer ces maladies (Ahmed *et al.*, 2018).

Stratégies thérapeutiques en cours

Malgré les progrès récents dans la caractérisation des bases moléculaires des maladies mitochondriales, ces affections sont encore considérées comme non traitables, à l'exception de certaines formes de déficit en coenzyme Q10, (Horvath, 2012). En l'absence de traitement curatif, diverses stratégies symptomatiques sont en général mises en place. Le traitement des syndromes mitochondriaux est essentiellement symptomatique, tels que les bicarbonates ou le dichloro-acétate, prescrits pour corriger les acidoses lactiques. Le régime cétogène est également utilisé dans certains déficits en complexe I ou en cas d'épilepsies pharmaco-résistantes (Chausseot and Paquis-Flucklinger, 2012).

Quelques molécules ont néanmoins apporté la preuve de leur efficacité dans les syndromes mitochondriaux. On peut citer la CoQ10, un composant de la chaîne de transport d'électrons impliqué dans le transfert d'électrons des complexe I et II au complexe III. Cette molécule a montré son efficacité chez les patients présentant une rare déficience congénitale en CoQ10 (Horvath, 2012).

Une autre molécule très intéressante pour l'étude que je mène est l'élamiprétide, une molécule qui cible la cardiolipine et vise ainsi à stabiliser la membrane mitochondriale interne. Les résultats prometteurs des essais précliniques ont montré que le composé induit une augmentation de l'efficacité du couplage OXPHOS grâce à une réduction de la génération des

ROS et une augmentation de la production d'ATP (Ahmed *et al.*, 2018; Siegel *et al.*, 2013) (Figure 23B).

Le médicament a été évalué chez des patients atteints de myopathie mitochondriale et des données récemment publiées de l'essai ont montré que les patients présentent une amélioration de l'intolérance à l'effort et une augmentation de la distance de marche après l'administration du médicament à la dose la plus élevée (Karaa *et al.*, 2018).

2.4. AGTLC et homéostasie cutanée

2.4.1. Structure histologique de la peau

Subdivision générale des couches de la peau

La peau est composée de 3 couches différentes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 24A).

L'hypoderme

C'est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Il est essentiellement composé de lobes adipeux séparés par des cloisons conjonctives, ces lobes sont divisés en lobules qui sont constitués d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides.

Il joue le rôle d'isolant thermique ainsi que dans la protection des structures sous-jacentes. Il constitue également une réserve d'énergie et de nutriments grâce au stockage des triglycérides. Cette énergie peut être restituée aux tissus par le phénomène de lipolyse.

Le derme

C'est un tissu conjonctif situé en dessus de l'hypoderme, c'est un tissu innervé et vascularisé, constitué principalement de collagène et de fibres élastiques.

Il joue un rôle majeur dans la nutrition, le soutien et la protection de l'épiderme et des annexes cutanées, mais est aussi impliqué dans la thermorégulation, la cicatrisation et la défense contre les pathogènes grâce à la présence de cellules immunitaires.

Il est composé de 2 parties :

Le derme superficiel ou derme papillaire qui renferme des fibres de collagène mais également des cellules du système immunitaire, des fibroblastes qui vont synthétiser deux types de fibres protéiques : les fibres de collagène et les fibres d'élastine, constituant la matrice extracellulaire.

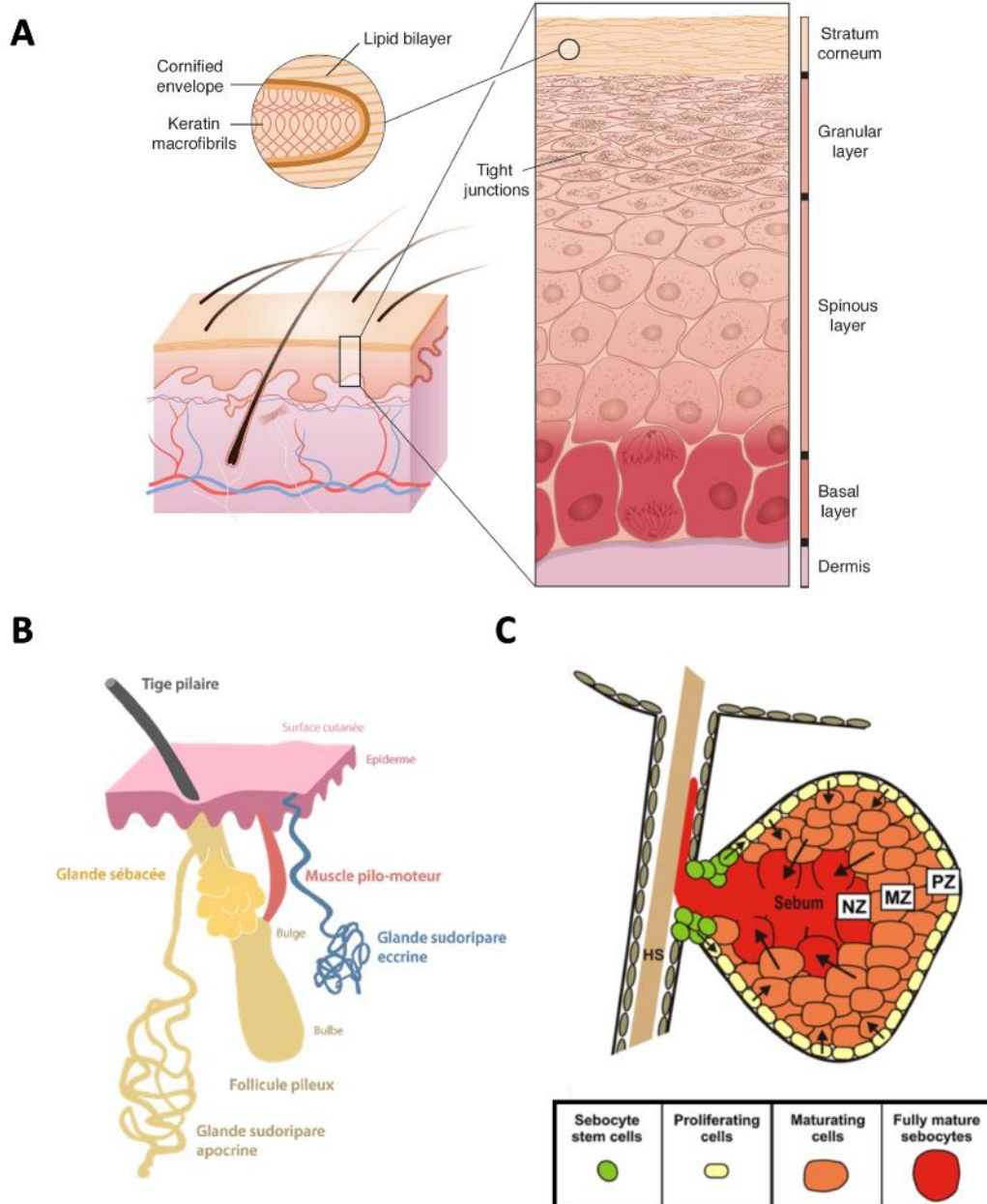


Figure 24 : Structure générale de l'épiderme et des annexes cutanées

(A) Schéma des principales étapes de différenciation épidermique. Les kératinocytes épidermiques subissent un programme de différenciation des cellules basales à activité mitotique en cellules épineuses puis en cellules granulaires énucléées, aboutissant finalement à des squames différenciées dans la couche cornée. Les squames se composent de macrofibrilles de kératine et d'enveloppes cornées réticulées enfermées dans des bicouches lipidiques (d'après Segre et al., 2006). (B) Représentation schématique des glandes annexes de la peau. (C) Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation des sébocytes chez la souris, les flèches indiquent la voie de différenciation et de maturation cellulaire jusqu'à ce que le contenu cellulaire se libère par sécrétion holocrine. HS, tige capillaire ; MZ, zone de maturation ; NZ, zone de nécrose ; PZ, zone périphérique (d'après Schneider et al., 2010).

Le derme profond ou derme réticulaire : les fibres de la matrice extracellulaire vont s'organiser parallèlement à la surface de la peau. On retrouve également à ce niveau des corpuscules nerveux, récepteurs des variations de pression, mais aussi des vaisseaux sanguins et les annexes cutanées : les follicules pileux, associés étroitement aux glandes sébacées et aux glandes sudoripares.

L'épiderme

C'est un tissu épithélial pluristratifié d'origine ectodermique correspondant à la couche la plus externe de la peau. Une de ses principales fonctions est celle de barrière entre l'organisme et son environnement extérieur.

L'épiderme est constitué de quatre couches successives superposées les unes sur les autres (Figure 24). De la plus interne à la plus externe sont retrouvées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée.

La couche basale

La couche basale est une monocouche des cellules prolifératives. Elle est composée des cellules cubiques appelées les kératinocytes. Ces kératinocytes sont indifférenciés et présentent une importante activité mitotique. Une fois divisées, ces cellules vont migrer vers les couches supérieures de l'épiderme. Durant leur migration et leur division, elles vont perdre leur noyau pour donner des cornéocytes, principales cellules de la couche cornée.

La couche épineuse

La couche épineuse est composée de 5 à 10 assises cellulaires chez l'homme. Elle doit son nom à la présence de nombreuses « épines » visibles en microscopie optique qui sont en fait des desmosomes, à partir desquels convergent de nombreux faisceaux de filaments intermédiaires, assurant la cohésion mécanique intercellulaire.

Les kératinocytes qui migrent dans la couche épineuse vont cesser leur division et commencent à se différencier en changeant ainsi leur morphologie pour devenir polygonaux. Leur cytoplasme se rétracte et leur noyau s'arrondit.

La couche granuleuse

La couche granuleuse est composée de 2-3 couches de cellules chez l'homme. Elle est appelée ainsi à cause de la présence de nombreuses granulations basophiles appelées les grains de kératohyaline, visibles en microscopie optique et présents dans le cytoplasme des kératinocytes.

Ces granules contiennent chez les rongeurs deux types de protéines insolubles qui s'associent aux filaments intermédiaires : les granules de type F contiennent la profilaggrine et ceux de type L, la loricine. Chez l'homme seule la filaggrine est présente dans les granules, la loricine étant dispersée dans le cytoplasme.

Des structures tubulo-vésiculaires appelées corps lamellaires ou kératinosomes sont également présentes dans le cytoplasme des kératinocytes granuleux. Elles jouent un rôle majeur dans l'établissement de la fonction de barrière épidermique et dans la synthèse des lipides complexes tels que les céramides et les sphingolipides.

Ces kératinosomes déversent leur contenu protéique et lipidique par exocytose à l'interface couche granuleuse et couche cornée conduisant à la formation d'un ciment intercornéocytaire.

La couche cornée

La couche cornée est la couche la plus externe, elle est constituée de 25 à 30 couches de cellules mortes et anucléées qui s'appellent les cornéocytes.

La formation des cornéocytes se fait par un processus appelé cornification durant laquelle les kératinocytes granuleux vont subir plusieurs modifications tels que la dégradation du noyau, le cytoplasme faisant place à une matrice fibreuse de kératine et de filaggrine et finalement la membrane cytoplasmique est remplacée par une coque rigide et insoluble, l'enveloppe cornée.

L'ultime étape de la différenciation épidermique correspond à l'élimination des cornéocytes les plus superficiels par le processus de desquamation. Ces dernières cellules, continuellement éliminées, sont alors remplacées par les cellules provenant des couches inférieures.

Son importance cruciale dans le maintien hydrique, chimique, immunologique et mécanique de l'épiderme a été démontrée. Elle constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes ou toute autre substance appliquée sur la peau.

Les granulations produites dans la couche granuleuse vont devenir matures : la profilaggrine va être clivée par différentes enzymes et va former les facteurs naturels d'hydratation (NMFs). La loricrine et l'involucrine ne vont pas participer à la synthèse de NMF mais vont venir se déposer autour de la membrane plasmique du cornéocyte pour former une enveloppe cornée qui va renforcer la structure du cornéocyte.

Les corps d'Odland sont spécialisés dans la synthèse de lipides. Ils vont fusionner avec la membrane plasmique des cornéocytes et libérer les lipides dans l'espace intracellulaire ce qui va créer le ciment intercornéocytaire, va lier les cornéocytes entre eux et limiter la perte d'eau. De cette manière, ils constituent une barrière lipidique.

Annexes cutanées

Le follicule pileux

Un follicule pileux ou follicule pilo-sébacé est la cavité dans laquelle le poil prend naissance (Figure 24B)

Chaque follicule pileux est accompagné d'une glande sébacée qui sécrète le sébum, et d'un muscle arrecteur de poil (ou muscle horripilateur) dont la contraction permet de redresser le poil et d'expulser le sébum.

Le follicule pileux a la capacité de se renouveler de manière cyclique et asynchrone à partir de cellules présentes à sa base. Dans une vie, chaque follicule pileux engendre 15 cheveux environ et subit autant de cycles pilaires (Aberdam, 2007).

Cette structure complexe comporte une vingtaine de types cellulaires répartis en six grands compartiments : les uns d'origine dermique (la gaine conjonctive, la papille dermique) et les autres de nature épithéliale (la gaine externe, la gaine interne, la tige pileuse et la glande sébacée). Ces compartiments sont organisés de manière concentrique autour d'un axe de symétrie qui correspond à celui de la tige pileuse.

La glande sébacée

La glande sébacée est une invagination de l'épiderme dans le derme. Le canal des glandes sébacées ne s'ouvre pas directement à la surface de la peau mais au niveau du follicule pileux, L'ensemble d'un follicule pileux et d'une glande sébacée est appelé l'unité pilo-sébacée (Schneider and Paus, 2010).

Les sébocytes sont les principales cellules des glandes sébacées (SG), des glandes acineuses présentes dans la plupart des zones de la surface du corps. Bien qu'elles varient considérablement en taille et en forme, toutes les glandes sébacées ont le même objectif, la production et la sécrétion du sébum via la différenciation et la désintégration de sébocytes pleinement matures, un processus unique appelé sécrétion holocrine (Downie and Kealey, 2004; Thody and Shuster, 1989).

Contrairement à la croissance cyclique du follicule pileux, les SG semblent se développer continuellement, comme l'épiderme. Cependant, au moins chez la souris, le SG montre des fluctuations fonctionnelles importantes dépendant du cycle capillaire, y compris des changements dans l'apoptose des sébocytes et le volume de SG (Lindner *et al.*, 1997).

Les cellules SG matures ont été classiquement divisées en trois populations distinctes reflétant différents stades de maturation des sébocytes.

Il y a une zone périphérique étroite (Figure 24C) composée des cellules mitotiquement actives, comprenant environ 40% de la glande (Jenkinson *et al.*, 1985; Thody and Shuster, 1989).

Ces cellules, de forme aplatie ou cuboïdale et de rapport nucléocytoplasmatique élevé, sont en contact avec la lame basale via des hémidesmosomes. La zone de maturation

(Figure. 24C), représentant également environ 40% de la glande, contient des cellules hypertrophiées portant des gouttelettes lipidiques (Jenkinson *et al.*, 1985; Thody and Shuster, 1989).

Au fur et à mesure de la différenciation, les cellules accumulent progressivement des lipides, subissant une extraordinaire augmentation de volume. Les cellules de la zone de nécrose (Figure 24C), représentant environ 20% de la glande, sont déformées en raison de la charge lipidique, elles ont des noyaux pycnotiques, les organites sont généralement méconnaissables et sont sur le point de dégénérer et de libérer leur contenu cellulaire (Jenkinson *et al.*, 1985; Thody and Shuster, 1989).

2.4.2. Les mutants *Elovl* impliqués dans la physiologie cutanée

Les gènes *ELOVL* codent pour les élongases des AGTLC (Janssens *et al.*, 2012), acides gras importants dans le maintien de la barrière cutanée. Ainsi, la structure lamellaire des tissus cutanés humains sains est altérée lorsque les acides gras extracellulaires à longue chaîne sont remplacés dans la couche cornée par des acides gras à chaîne courte, causant un dysfonctionnement de la barrière cutanée (Ansari *et al.*, 1970).

Les sept membres de la famille ELOVL identifiés chez des mammifères, ELOVL1–7, sont exprimés dans différents territoires (Figure 6) et impliqués dans l'élongation spécifique de certains acides gras (Ohno *et al.*, 2010), affectant ainsi différents processus biologiques.

En 2004, Westerberg et ses collaborateurs ont montré que le maintien de l'équilibre métabolique des lipides sébacés reposait sur des AGTLC synthétisés par ELOVL3. L'inactivation d'*Elovl3* chez des souris par recombinaison homologue a montré que son déficit empêchait un allongement supplémentaire de C20:1, bloquant ainsi la production d'acides gras plus longs et entraînant une accumulation de lipides cutanés, un déséquilibre de la composition lipidique et une incapacité de la couche cornée à fonctionner comme barrière cutanée (Westerberg *et al.*, 2004). De même, les souriceaux déficients en ELOVL1 ou ELOVL4 meurent peu après la naissance d'un dysfonctionnement de la barrière cutanée (Cameron *et al.*, 2007; Sassa *et al.*, 2013).

2.4.3. ω -acylcéramides et fonction de la barrière épidermique

Anomalies génétiques de la production des acylcéramides et ichtyose

La barrière cutanée est principalement formée dans la couche cellulaire la plus externe de l'épiderme, la couche cornée, où les espaces intercellulaires sont remplis de lipides multicouches (lamelles lipidiques) très hydrophobes permettant ainsi d'empêcher la perte hydrique (Proksch *et al.*, 2008; van Smeden *et al.*, 2014).

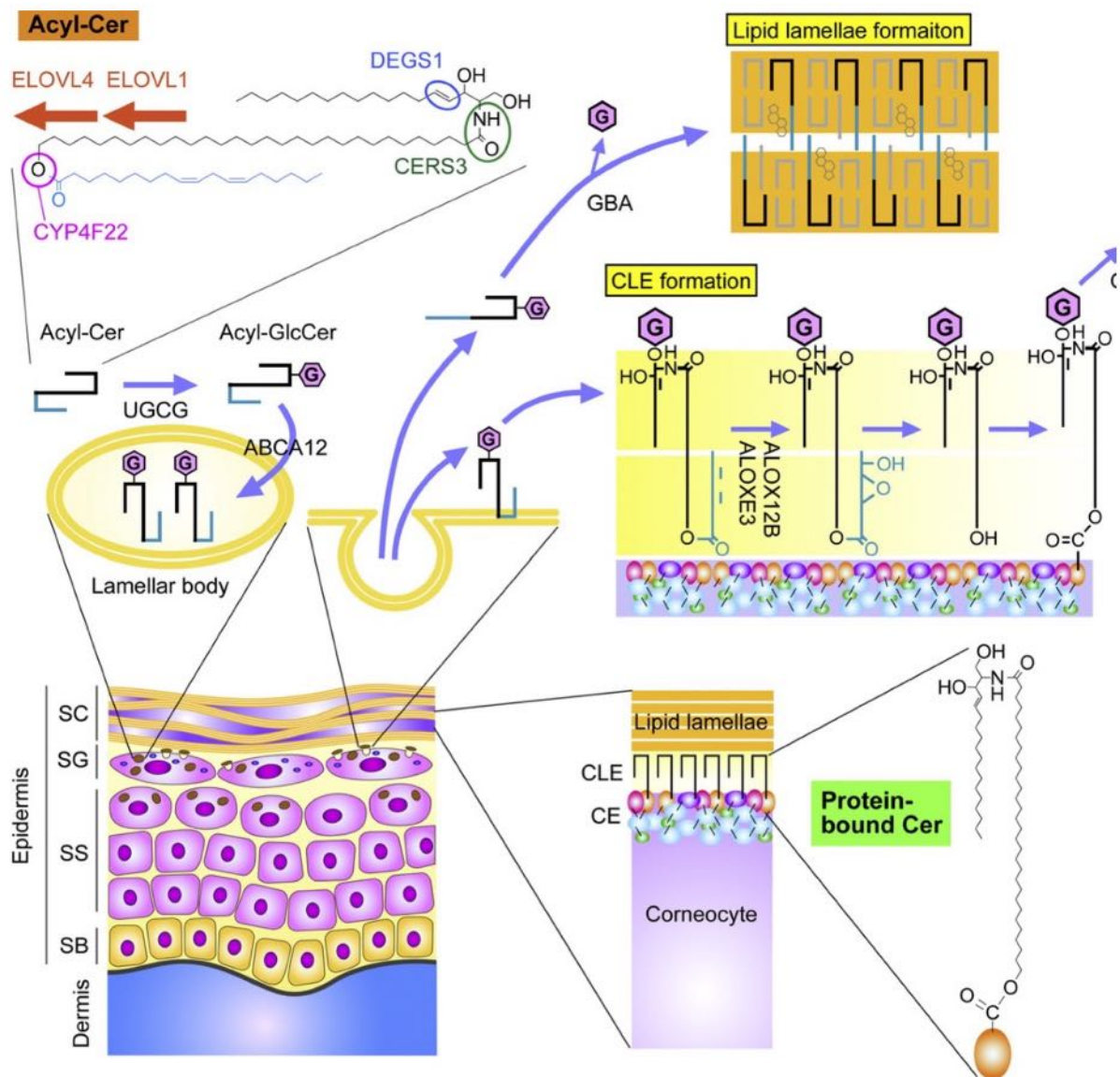


Figure 25 : Synthèse épidermique d'acyl-céramides et de céramides liées aux protéines

L'épiderme se compose de quatre couches, de l'intérieur vers l'extérieur : la couche basale, la couche spinieuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Au niveau de la couche cornée, l'enveloppe cornée se met progressivement en place en deux phases. La phase d'initiation consiste en un assemblage de protéines sous l'action de transglutaminases, sous la membrane plasmique des kératinocytes épineux. Dans un deuxième temps se met en place au niveau de la face externe une monocouche lipidique constituée d'acylcéramides, liés de façon covalente avec les protéines déjà existant et remplaçant ainsi progressivement les phospholipides de la membrane plasmique. SB, stratum basale ; SS, stratum spinosum ; SG, stratum granulosum ; SC, stratum corneum ; G, glucose (d'après Kihara et al., 2016).

Dans les couches supérieures de l'épiderme, une enveloppe cornée (CE) se forme sur la périphérie des kératinocytes et a un rôle important pour assurer la fonction de la barrière cutanée (Figure 25). Cette enveloppe cornée est produite par liaison des protéines telles que l'involucrine, l'envoplakine, la périplakine, la loricrine et les petites protéines riches en proline par les transglutaminases sous la membrane plasmique (Candi *et al.*, 2005).

Pendant le processus de cornification, la bicouche lipidique de la membrane est remplacée par une monocouche de céramides liés aux protéines citées précédemment pour former l'enveloppe lipidique des cornéocytes (CLE). Ce dernier fonctionne pour relier les cornéocytes aux lamelles lipidiques (Elias and Wakefield, 2014) (Figure 25).

Les lipides précurseurs des lamelles lipidiques sont stockés dans des corps lamellaires intracellulaires, qui se trouvent dans la couche épineuse et la couche granuleuse puis au niveau de l'interface de la couche granuleuse et la couche cornée. Les corps lamellaires ont fusionnés avec la membrane plasmique (Proksch *et al.*, 2008), leur contenu est libéré pour former les lamelles lipidiques. Les lamelles lipidiques sont principalement composées de Cers (~ 50%), de cholestérol (~ 25%) et les AG libres (~ 15%) (Feingold and Elias, 2014).

Les céramides de l'épiderme sont abondantes et se composent de nombreuses espèces. Il existe quatre classes d'acylcéramides dans l'épiderme : EOS, EOH, EOP et EODS. Principalement, la classe EOS des céramides (CerEOS) avec des acides gras à chaîne ultra-longue (ULC) est le composant essentiel des structures de la barrière de la couche cornée (Kihara, 2016).

La plupart des ichtyoses sont des processus pathogènes liés au défaut de la barrière de la couche cornée en raison de la synthèse, du métabolisme et du transport aberrant des lipides fonctionnels (Akiyama, 2017; Kihara, 2016).

De nombreux variants génétiques responsables d'ichtyose ont été identifiés dans les gènes *ABCA12*, *CYP4F22*, *CERS3*, *ABHD5*, *PNPLA1* et *ELOVL4*, connus pour être impliqués dans la synthèse, le transport et le métabolisme de l'acyl-céramide et dans la formation du CLE (Figures 26 et 27).

Cinq enzymes d'élongation (ELOVL1, ELOVL3, ELOVL4, ELOVL6 et, ELOVL7) sont connues pour catalyser l'élongation des acides gras et pour produire des acides gras ULC (Kihara, 2016). Les déficits en *Elovl1* et *Elovl4* sont connus pour provoquer une ichtyose chez la souris (Cameron *et al.*, 2007; Sassa *et al.*, 2013).

Les mutations du *CYP4F22* codant pour le cytochrome P450 4F22, une α -hydroxylase d'acide gras, sont une cause d'ichtyose lamellaire (LI) (Lefèvre *et al.*, 2006).

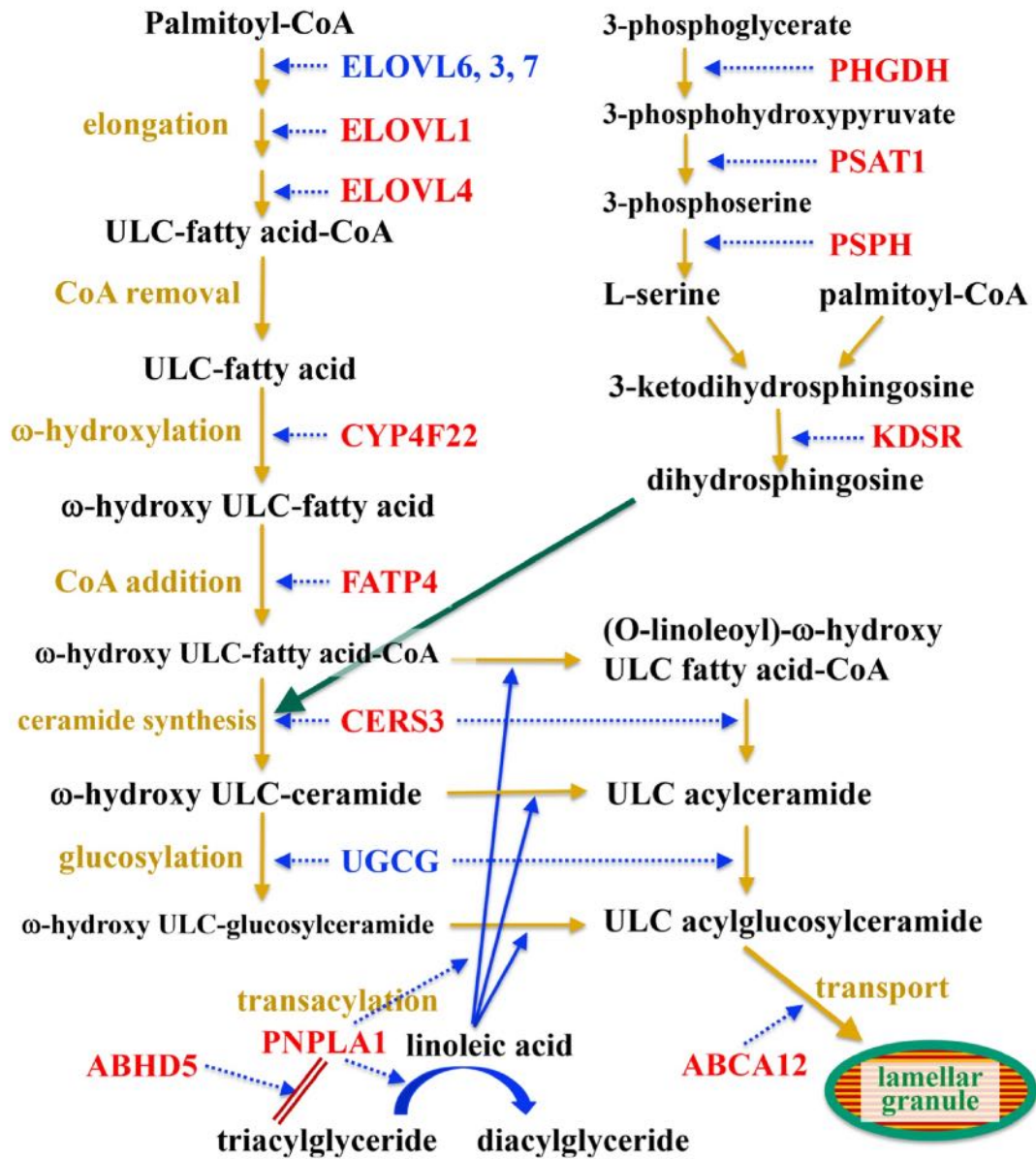


Figure 26 : Voies de biosynthèse des acylglucosylcéramides dans la peau

Principaux gènes dont les variants sont responsables d'ichtyose. Les activités des enzymes clés des étapes importantes sont indiquées par des flèches bleues pointillées. Les flèches bleues indiquent l'apport d'acide linoléique par Trans acylation pour la x-O-estérification. La flèche verte indique l'approvisionnement en base à longue chaîne pour la synthèse des céramides. Le rouge indique des enzymes dont le défaut fonctionnel entraîne une ichthyose (d'après Akiyama et al., 2020).

Step in acylceramide synthesis and CLE formation	Involved gene (molecule)	Related disease
Step in ω -OH ULC fatty acid synthesis		
Elongation of fatty acids	<i>ELOVL6</i> , 3, 7 (<i>ELOVL6</i> , 3, 7) <i>ELOVL1</i> (<i>ELOVL1</i>) <i>ELOVL4</i> (<i>ELOVL4</i>)	– Ichthyotic keratoderma, spasticity, mild hypomyelination, and dysmorphic features Ichthyosis, intellectual impairment, spastic quadriplegia
ω -hydroxylation of ULCFA (ω -OH ULC fatty acid synthesis)	<i>CYP4F22</i> (<i>CYP4F22</i>)	LI
CoA addition to ULC fatty acid (ω -OH ULC acyl-CoA synthesis)	<i>FATP4</i> = <i>ACSVL4</i> = <i>SLC27A4</i> (<i>FATP4</i> = <i>ACSVL4</i> =long-chain fatty acid transport protein 4)	Ichthyosis prematurity syndrome
Step in long-chain base formation for ceramide synthesis		
3-phosphohydroxypyruvate synthesis from 3-phosphoglycerate	<i>PHGDH</i> (phosphoglycerate dehydrogenase)	NLS
3-phosphoserine synthesis	<i>PSAT1</i> (phosphoserine aminotransferase 1)	NLS
L-serine synthesis	<i>PSPH</i> (phosphoserine phosphatase)	NLS
3-keto DHS synthesis from L-serine and palmitoyl-CoA	<i>SPTLC1</i> , <i>SPTLC2</i> , <i>SPTLC3</i> , <i>SPTSSA</i> , <i>SPTSSB</i> (serine palmitoyltransferases)	(Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1)
DHS synthesis	<i>KDSR</i> (3-keto DHS reductase)	Recessive progressive symmetric erythrokeratoderma; keratinization disorders with thrombocytopenia
Step in acylceramide synthesis		
Ceramide synthesis (amide bond formation with long-chain base)	<i>CERS3</i> (<i>CERS3</i>)	LI
Transacylation (synthesis of ω -O-acylceramide with linoleic acid)	<i>ABHD5</i> (<i>ABHD5</i>) +	Dorfman–Chanarin syndrome
Glucosylation of acylceramide (acylglucosylceramide synthesis)	<i>PNPLA1</i> (<i>PNPLA1</i>) <i>UGCG</i> (<i>UGCG</i>)	LI –
Step in CLE formation		
Transport of acylglucosylceramide via LGs	<i>ABCA12</i> (<i>ABCA12</i>)	HI, LI, congenital ichthyosiform erythroderma (CIE)
Oxidation of linoleic acid in acylceramide	<i>ALOX12B</i> (<i>ALOX12B</i>) and <i>ALOXE3</i> (<i>ALOXE3</i>)	LI, CIE, pleomorphic; ichthyosis
Dehydrogenation of oxidized linoleic acid in acylceramide (epoxy-enone formation)	<i>SDR9C7</i> (<i>SDR9C7</i>)	LI
Covalent binding of epoxy-enone in acylceramide to CCE protein (CLE formation)	– (Nonenzymatic reactions; Michael addition reactions, Schiff base, and pyrrole formation)	–
Deglucosylation of acylglucosylceramide	<i>GBA</i> (glucosylceramidase β)	Gaucher disease

Figure 27 : Gènes impliqués dans les étapes de synthèse des acylcéramides de l'enveloppe lipidique des kératinocytes et maladies causées par leur dysfonction

d'après Akiyama et al., 2020.

En 2015, Ohno (Ohno *et al.*, 2015) ont révélé qu'un patient atteint de LI en raison de mutations *CYP4F22* a montré une synthèse de l'acylcéramide considérablement diminuée dans l'épiderme.

La synthèse de l'acyl-CoA par l'ajout de CoA aux acides gras ULC est une étape essentielle de la synthèse épidermique de l'acylcéramide. En effet, le syndrome d'ichtyose-prématurité est causé par des mutations de la *FATP4*, une acyl-CoA synthétase, qui produit de l'acyl-CoA à partir d'un acide gras et du CoA (Ohkuni *et al.*, 2013). En 2020 Yamamoto (Yamamoto *et al.*, 2020) ont rapporté que la quantité d'acylcéramides était significativement diminuée dans l'épiderme des souris *Fatp4-KO*.

Les mutations de *PHGDH*, *PSAT1* et *PSPH* provoquent le syndrome de Neu-Laxova (NLS), qui produit des anomalies congénitales sévères dans le système nerveux central et des lésions cutanées érythémateuses diffuses avec desquamation sur tout le corps. Un patient NLS présentant un déficit en *PHGDH* a montré une réduction significative de 11 classes majeures de céramides, dont CerEOS, dans la couche cornée (Takeichi *et al.*, 2018).

Deux céramides synthases (CERS) majeures exprimées dans l'épiderme sont le CERS3 et le CERS4. CERS3 assure la formation de liaisons amides entre la sphingosine et l'acyl-CoA (\geq C18), conduisant à la synthèse de céramides ULC (Mizutani *et al.*, 2009). Une carence en *CERS3* entraîne une diminution des céramides ULC dans la couche cornée, entraînant une ichtyose congénitale autosomique récessive chez l'homme (Radner *et al.*, 2013).

Les acylcéramides contenant de l'acide linoléique x-O-estérifié sont cruciaux pour la création de CLE, car seuls les acylcéramides estérifiés avec des acides linoléiques peuvent être convertis en acylcéramides liés aux protéines qui forment le CLE. Les acylcéramides ont diminué de manière significative dans la couche cornée des souris *Pnpla1-KO* (Hirabayashi *et al.*, 2017).

Les granules lamellaires (LG), granules sécrétoires de kératinocytes dans l'épiderme, renferment et transportent diverses molécules avec principalement des lipides fonctionnels épidermiques dont les céramides. Le transport de ces lipides se fait entre autres par l'ABCA12, ayant ainsi un rôle crucial dans le développement des couches lipidiques intercellulaires de la couche cornée. Chez les patients atteints d'ichtyose présentant des mutations *ABCA12*, des couches lipidiques intercellulaires mal formées et des gouttelettes lipidiques anormales sont observées dans la couche cornée. On pense que des mutations dans *ABCA12* entraînent un transport défectueux des lipides dans les LG, conduisant à une sécrétion défectueuse de lipides épidermiques, y compris les céramides, dans l'espace extracellulaire (Akiyama, 2014; Akiyama *et al.*, 2005).

2.4.4. Composition lipidique du sébum

Le sébum est principalement composé de débris cellulaires et de lipides non polaires (neutres), à savoir les triglycérides, les esters de cire, le squalène, le cholestérol et les acides gras libres (Picardo *et al.*, 2009).

La composition de sébum est spécifique à l'espèce, le sébum humain est principalement composé de triglycérides et les acides gras représentant jusqu'à 57,5% des lipides totaux, suivis des esters de cire (26%), du squalène (12%) et cholestérol (4,5%) (Greene *et al.*, 1970) (Figure 28).

	Sebum %
Glycerides	30–50
FFA	15–30
WE	26–30
SQ	12–20
CE	3.0–6.0
CH	1.5–2.5

Glycerides; Free Fatty Acids (FFA); Wax Esters (WE); Squalene (SQ); Cholesterol Esters (CE); Cholesterol (CH).

Figure 28 : Composition lipidique du sébum

Le sébum est principalement composé de triglycérides et d'acides gras qui combinés représentent la proportion prédominante (45-80%), suivis des esters de cire (26%) et des squalènes (12%). Le lipide le moins abondant dans le sébum est le cholestérol qui, avec ses esters, représente seulement 4,5% des lipides totaux (*adapté de Picardo et al., 2009*).

Bilan et objectif de la thèse

La famille des gènes *HACD* de mammifères plonge ses racines chez les eucaryotes unicellulaires. Une fonction enzymatique a été identifiée pour la protéine codée par l'unique gène orthologue de levure : au sein du réticulum endoplasmique, Phs1 catalyse la troisième étape d'un cycle qui en comprend quatre et permet d'allonger de deux carbones à chaque tour des acides gras en acides gras à très longue chaîne. Le déficit complet en Phs1 est létal pour la levure dont la croissance est réduite par une mutation hypomorphe, ce qui démontre la fonction essentielle de cette protéine compensable par deux des protéines paralogues de mammifères, HACD1 et HAC2.

Les travaux du laboratoire ont permis d'identifier que la déficience en HACD1 chez le chien et la souris produit un phénotype de myopathie, ultérieurement retrouvé chez des patients de trois familles humaines indépendantes porteuses de mutations distinctes. Nous avons par ailleurs montré que fonction importante de la protéine HACD1 dans l'homéostasie musculaire est corrélée avec l'expression restreinte à ce tissu de l'isoforme d'HACD1 capable de l'activité enzymatique mobilisée dans le cycle d'élongation des acides gras, au cœur semble-t-il du rôle de cette famille protéique. Plus récemment, nous avons démontré que la déficience d'HACD1 dans le lignage musculaire des mammifères en limite le développement par un défaut de fusion des myoblastes, corrélé à une altération de l'évolution de la composition lipidique et de la fluidité membranaire qui précèdent ou accompagnent le mécanisme de fusion en situation normale. Étonnamment, les modifications lipidiques quantifiées ont révélé une atteinte des lipides bien au-delà d'une seule diminution de la longueur des très longues chaînes des acides gras, avec en particulier une augmentation du contenu en lysophosphatidylcholine, un phospholipide connu pour inhiber la fusion et une réduction de la quantité relative des acides gras mono-insaturés au bénéfice des acides gras saturés, connus pour rigidifier la membrane.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, deux questions centrales se posaient au laboratoire :

1. les anomalies de composition lipidique en situation de déficit d'HACD1 peuvent-elles affecter d'autres membranes du lignage musculaire, en lien avec un mécanisme pathogénique à découvrir ;
2. quelle est la fonction chez les mammifères d'*HACD2*, l'unique paralogue d'*HACD1* capable comme lui de sauver chez la levure le phénotype de létalité résultant du déficit de Phs1 ?

La première question a été traitée par Alexandre Prola, postdoctorant et Aymeline Vandestienne, doctorante. Pour ma part, je me suis attelée à la seconde question, en démarrant l'analyse phénotypique de souris préalablement générées au laboratoire et porteuses d'un allèle autorisant toute une série de modifications génétiques. Lorsque je suis arrivée au laboratoire en 2015, il était connu que les souris *Hacd2^{flox/flox}* naissaient mais ne survivaient pas au-delà de quelques jours ou semaines. Par ailleurs, les premiers croisements entre souris hétérozygotes *Hacd2^{KO/+}* n'avaient pas permis d'obtenir d'embryons homozygotes mutés. Mon travail a donc consisté à expliquer la cause de la mortalité postnatale des souris *Hacd2^{flox/flox}* et à identifier la raison de l'absence de nouveau-nés *Hacd2^{KO/KO}*.

Les données que j'ai obtenues ou que j'ai contribué à obtenir sont détaillées dans trois parties dans la prochaine section des résultats, chacune organisée autour d'un article accepté ou en cours de finalisation pour être soumis :

1. nous avons montré que la déficience en HACD1 modifie également la composition lipidique de la membrane mitochondriale, encore une fois plus largement qu'une seule limitation dans l'allongement des chaînes des acides gras. En particulier, nous avons montré dans les muscles des souris *Hacd1-KO* une réduction du contenu en cardiolipine, un phospholipide enrichi dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette diminution de la quantité de cardiolipine relativement aux autres phospholipides est associée à une réduction de l'efficacité du couplage entre l'oxydation des substrats et la phosphorylation de l'ADP, ce qui détériore la balance énergétique musculaire chez les animaux – contribuant au phénotype de myopathie, mais les protège également de l'obésité induite par un régime riche en graisses en raison d'une faible efficacité énergétique ;
2. nous avons combiné les jeux de données obtenus chez les embryons *Hacd2^{KO/KO}* et les souris *Hacd2^{flox/flox}*, tous deux convergeant vers un mécanisme commun d'anomalie globale du fonctionnement mitochondrial, avec létalité postnatale en cas d'invalidation partielle (souris *Hacd2^{flox/flox}*) ou embryonnaire en cas d'invalidation totale d'*Hacd2* (embryons *Hacd2^{KO/KO}*). Chez ces embryons, nous avons retrouvé des anomalies dans les phospholipides, en particulier la présence anormale de formes oxydées de cardiolipine ;
3. un dernier article décrit le phénotype cutané d'ichtyose et de poil cassant chez les souris, en relation pour ce dernier point avec une forte réduction à absence de sébum dans les glandes sébacées.

Résultats et articles

Publication 1

Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle

Article accepté le 1^{er} novembre 2020 à Science Advances, *in press*.

Contexte de l'étude

La mutation du gène *HACD1* provoque chez l'être humain et le chien une myopathie modérée, caractérisée par une réduction de la masse musculaire, une faiblesse musculaire et une fatigabilité à l'effort. Grâce à un modèle de souris invalidées pour le gène *Hacd1* (souris *Hacd1* knockout, *Hacd1*-KO), notre équipe a pu démontrer que le gène *Hacd1* est nécessaire au cours du développement musculaire pour assurer un taux de fusion optimal des myoblastes grâce à un remodelage de la composition lipidique de la membrane des myoblastes. En l'absence du gène *Hacd1*, l'hypotrophie musculaire acquise au cours du développement à cause de ce défaut de fusion persiste toute au long de la vie des animaux (Blondelle *et al.*, 2015). En parallèle, nous avons observé que les souris *Hacd1*-KO présentent une activité locomotrice spontanée réduite de moitié. Cependant, nous avons été surpris de constater que malgré leur masse musculaire et de leur activité locomotrice réduites, les souris *Hacd1*-KO semblaient rester plus minces tout au long de leur vie que les souris contrôles (WT) alors que l'on se serait attendu à ce que cela les prédispose à accumuler au moins autant de tissu adipeux que les souris WT.

Objectifs de l'étude

Compte tenu du rôle majeur du muscle dans le métabolisme énergétique général et du phénotype apparemment paradoxal des souris *Hacd1*-KO, nous avons cherché à caractériser leur métabolisme musculaire et en particulier leur fonction mitochondriale.

Résultats

✓ Cette étude a démontré que lorsqu'elles étaient soumises à un régime riche en graisse, les souris *Hacd1*-KO résistaient à l'obésité, en accumulant nettement moins de tissu adipeux que les souris WT, malgré une consommation d'aliment identique. Une analyse de calorimétrie indirecte a mis en évidence qu'elles présentaient de fait une dépense énergétique plus forte, à l'origine de cette moindre prise de poids.

✓ Cette hausse de la dépense énergétique globale des souris a pu être rattachée à une hausse du métabolisme oxydatif dans les muscles squelettiques, alors que les autres organes présentaient un métabolisme inchangé. Dans les muscles squelettiques, nous avons pu mettre en évidence une hausse de l'activité COX, une masse mitochondriale augmentée et une oxydation accrue des lipides.

✓ Cette hausse de l'activité mitochondriale n'étant pas liée à une hausse de l'activité locomotrice, au contraire, elle suggérait un défaut d'efficacité mitochondriale. De fait, une analyse en microscopie électronique a révélé un défaut dans la structure des mitochondries, avec des crêtes élargies et souvent dilatées à leur extrémité. Cela s'accompagnait de défauts fonctionnels, avec une forte réduction du couplage mitochondrial. Au cours d'un exercice intense, les souris *Hacd1*-KO présentaient une forte baisse du contenu musculaire en ATP, avec hyperlactatémie.

✓ HADC1 étant impliquée dans la synthèse des acides gras à très longue chaîne, nous avons analysé les phospholipides mitochondriaux et observé une très forte réduction de leur contenu, rapporté aux protéines mitochondriales. Parmi les phospholipides, la cardiolipine était la plus diminuée. Cependant, la répartition des différentes espèces de cardiolipines était préservée, ce qui indique que l'altération liée à la mutation du gène *Hacd1* est indépendante de l'action de la Tafazzin. De manière remarquable, l'ajout in vitro de cardiolipine à des mitochondries isolées restaurait leur couplage respiratoire, démontrant le rôle limitant de la cardiolipine dans ce contexte.

Conclusion

Cette étude a permis d'identifier un rôle clé du contenu en cardiolipine dans le couplage mitochondrial dans le muscle, avec des conséquences sur la dépense énergétique globale de l'organisme. Elle a également révélé que le muscle met en jeu une composition lipidique particulière des membranes mitochondriales grâce à l'expression du gène *Hacd1*.

Enfin, elle a révélé un contexte métabolique paradoxal, dans lequel une réduction de la masse et de l'activité musculaire s'accompagne d'une plus forte dépense énergétique à l'échelle de l'organisme, ce qui permettrait d'envisager des axes thérapeutiques originaux contre l'obésité.

Contribution

J'ai contribué à cette étude en participant aux nombreuses séances de prélèvements et de préparation des échantillons chez les souris WT et *Hacd1*-KO. Cela m'a permis d'acquérir les compétences nécessaires à la réalisation de nombreuses techniques (prélèvement de sang, histologie, analyse de la respiration, biochimie des lipides et des protéines en particulier), que j'ai pu utiliser pour l'étude des mutants *Hacd2*.

Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle

Alexandre Prola^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3,*}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3,*}, Jérôme Piquereau⁴, Raphaël GP Denis⁵, Stéphane Guyot⁶, Hadrien Chauvin^{1,2,3}, Arnaud Mourier⁷, Marie Maurer^{1,2,3}, Céline Henry⁸, Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Cindy Gallerne^{1,2,3}, Thibaut Molinié⁷, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Mélanie Gressette⁴, Audrey Solgadi⁹, Florent Dumont⁹, Julien Castel⁵, Julien Ternacle¹⁰, Jean Demarquoy⁶, Alexandra Malgoyre¹¹, Nathalie Koulmann¹¹, Geneviève Derumeaux¹⁰, Marie-France Giraud^{7,8}, Frédéric Joubert¹², Vladimir Veksler⁴, Serge Luquet⁵, Frédéric Relaix^{1,2,3,†}, Laurent Tiret^{1,2,3,†} and Fanny Pilot-Storck^{1,2,3,†}

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Creteil, France.

² EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³ EFS, IMRB, F-94010 Creteil, France.

⁴ UMR-S 1180, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

⁵ Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, F-75014 Paris, France.

⁶ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France.

⁷ Univ. Bordeaux, CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France.

⁸ PAPPISO, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

⁹ UMS IPSIT, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

¹⁰ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Derumeaux, F-94010 Creteil, France.

¹¹ Département Environnements Opérationnels, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Bretigny-Sur-Orge, F-91220, France.

¹² Laboratoire Jean Perrin, CNRS, Sorbonne Université, UMR 8237, Paris, F-75005, France.

† Corresponding authors. Email: fanny.storck@vet-alfort.fr; laurent.tiret@vet-alfort.fr; frederic.relaix@inserm.fr

* These authors contributed equally to this work.

Summary

Unbalanced energy partitioning participates in the rise of obesity, a major public health concern in many countries. Increasing basal energy expenditure has been proposed as a strategy to fight obesity yet raising efficiency and safety concerns. Here we show that mice deficient for a muscle-specific enzyme of very-long-chain fatty acid synthesis display increased basal energy expenditure and protection against high-fat diet-induced obesity. Mechanistically, muscle-specific modulation of the very-long-chain fatty acid pathway was associated with a reduced content of the inner mitochondrial membrane phospholipid cardiolipin and a blunted coupling efficiency between the respiratory chain and ATP synthase, which was restored by cardiolipin enrichment. Our study reveals for the first time that selective increase of lipid oxidative capacities in skeletal muscle, through the cardiolipin-dependent lowering of mitochondrial ATP production, provides an effective option against obesity at the whole-body level.

Keywords: mitochondria; IMM; cristae; OXPHOS; chemiosmotic; HACD; mitochondrial coupling; metabolic syndrome; Tafazzin; basal metabolism

Introduction

Increased food intake and prevailing sedentary activities cause a positive energy balance, leading to an unprecedented obesity epidemic which is nowadays rising at an alarming pace (1). Obesity is associated with many other comorbidities including metabolic disorders (*i.e.* insulin resistance, metabolic syndrome and diabetes), but also cancer, cardiovascular or emerging infectious diseases, increasing therefore the risk of mortality (2–5). Beneficial effects of regular exercise to counter obesity and related diseases have been demonstrated but unfortunately, are hampered by poor compliance and low energy expenditure (6, 7). In this context, increasing basal energy expenditure, independently of exercise, might be an interesting strategy to prevent obesity-related complications (8). Basal energy production relies almost entirely on the mitochondrial function ensuring the efficient production of ATP from energetic substrates through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process, which takes place in the inner mitochondrial membrane (IMM) and couples the generation of a transmembrane gradient of protons by the respiratory chain to the ADP phosphorylation by ATP synthase (9). Any reduction in OXPHOS coupling decreases energetic yield and may lead to increased expenditure of energy substrates to counteract low ATP productivity (8). Mitochondrial organization and function is an active field of research and further insights into the physiological mechanisms that regulate mitochondrial coupling efficiency are a prerequisite for the identification of innovative therapeutic strategies. A striking feature of mitochondria stands in its highly specialized structure. In particular, folding of the IMM into packed cristae is thought to allow optimized organization of respiratory complexes and ATP synthase for efficient ATP production (10). Tight folding of such an extended membrane is not a classical organization of lipid bilayer sheets and involves a dedicated lipid composition. Notably,

the IMM contains the specific four-acyl chain phospholipid cardiolipin, which has been shown to favor proper cristae folding, respiratory chain and ATP synthase function (11–14). Modulation of cardiolipin composition is likely one of the levers used by cells to optimize energetic yield in highly ATP-demanding tissues. Indeed, mutations in Tafazzin, a cardiolipin-remodelling enzyme that tends to homogenize cardiolipin chains to linoleic acyls (C18:2) in heart and skeletal muscle, hamper mitochondrial function and are associated with cardiomyopathy and myopathy (15, 16). Whether other lipid-based mechanisms are involved in optimizing ATP production in these tissues remains to be deciphered. Fatty acids with 18 carbons or more are synthesized by the very-long-chain fatty acid (VLCFA) enzymatic complex in the endoplasmic reticulum membrane through a four-step cycle (17, 18). The first step of elongation is accomplished by fatty acid elongases encoded by seven different *ELOVL* genes with overlapping expression profiles and the second and fourth steps are under the control of unique genes (18). The third step is catalysed by 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (HACD) proteins which are encoded by four different genes (17, 19). Notably, expression of the *HACD1* active isoform is restricted to the heart and skeletal muscle, in which it promotes efficient myoblast fusion during muscle development (20). Whilst *HACD1* deficiency leads to congenital myopathies in humans, dogs and mice sharing an early and stable reduction in muscle mass and strength (20–23), the metabolic consequences of *HACD1* deficiency remained to be deciphered.

Counter-intuitively, we describe here that *Hacd1*-deficient mice stay lean throughout life and that they are protected against diet-induced obesity. An in-depth analysis of their metabolic features uncovers an increased expenditure of energy substrates by the skeletal muscle alone, independently of locomotor activity and excluding the heart, whose function remains unchanged. Upon *Hacd1*-deficiency, mitochondria of skeletal

muscle display a reduced coupling between substrates oxidation and ADP phosphorylation by the ATP synthase, responsible for higher energy substrate consumption. Skeletal muscle mitochondria of *Hacd1*-deficient mice exhibit modified cristae and reduced cardiolipin content, and cardiolipin enrichment fully rescues respiratory coupling efficiency in isolated mitochondria.

Altogether, our data reveal that skeletal muscle benefits from a specific mechanism involving the VLCFA elongation cycle to ensure optimized ATP production and that cardiolipin content in this tissue influences energy balance at the body level.

Results

Genetic invalidation of *Hacd1* leads to protection against diet-induced obesity

Hacd1-KO mice present mild myopathic features characterized by a congenital reduction in muscle mass (20) and reduced spontaneous locomotor activity, both in distance and speed (Fig. 1A and fig. S1A). Surprisingly, *Hacd1*-KO mice did not gain more weight but remained leaner than WT mice throughout their lifespan (Fig. 1, B and C). To investigate whether this observation could be related to a difference in energy homeostasis, we challenged *Hacd1*-KO mice with high-fat diet (HFD). As expected, WT mice regularly gained weight and became obese following a 2-month HFD (Fig. 1, C and D). On the contrary, *Hacd1*-KO mice showed only moderate weight gain, thus escaping obesity (Fig. 1, C and D). Accordingly, *Hacd1*-KO mice were more tolerant to a glucose overload than WT mice after HFD (Fig. 1, E and F). Furthermore, we found a prominent reduction in fat accumulation in *Hacd1*-KO mice after HFD compared to WT mice. In particular we observed a blunted increase in white adipose tissue (WAT) weight (Fig. 1G, fig. S1B, Table S1) whilst a lesser amount of liver steatosis occurred in *Hacd1*-KO mice as compared with WT mice (fig. S1C).

Resistance to HFD-induced obesity in *Hacd1*-KO mice could be explained either by a reduction in energy intake or by an increase in energy substrate expenditure. Analysis of food consumption revealed similar energy intake per animal for both genotypes (fig. S1D), and thus higher energy intake per gram of body mass in *Hacd1*-KO mice, considering their lower mass (fig. S1E). Faecal lipid content was similar between genotypes (fig. S1F), excluding defective intestinal absorption as a cause of energy loss. Altogether, feed efficiency, *i.e.* body weight gain per eaten calories, was markedly reduced in *Hacd1*-KO mice (Fig. 1H), pointing to increased energy substrate expenditure as causative for the observed resistance to HFD-induced obesity.

An indirect calorimetry analysis of metabolic efficiency was performed both in normal diet (ND) and after a switch to HFD. After acclimatization to HFD, energy expenditure was higher at every time point in *Hacd1*-KO mice than in WT mice, resulting in a significant increase in energy expenditure over a 24h period (Fig. 1I). Basal metabolism was found significantly increased in *Hacd1*-KO mice compared to WT, both during day and night periods (Fig. 1J).

Increased energy expenditure and reduced feed efficiency were also found in ND, yet to a lesser extent than in HFD (fig. S1, G and H), indicating that resistance to HFD-induced obesity of *Hacd1*-KO mice was linked to a pre-existing metabolic feature that diverted energy from storage and was magnified upon exposure to lipid-based substrate.

Brown adipose tissue (BAT) has a specific capacity to dissipate energy through heat production by mitochondrial uncoupling due to proton leakage by UCP proteins through the IMM (8). BAT mass was found reduced in *Hacd1*-KO mice compared to WT (Table S1) and expression of *Ucp* genes was similar between genotypes in BAT as well as in other metabolically active tissues (fig. S1, I to K), thus excluding BAT involvement in the higher energy expenditure of *Hacd1*-KO mice. Since muscle mass represents a significant pole of energy expenditure, we next explored the contribution of skeletal muscle in the metabolic phenotype observed in *Hacd1*-KO mice.

Oxidative capacities are increased in the skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice

Expression of *Hacd1-fl* mRNA that encodes the catalytically active isoform of *Hacd1* is nearly restricted to striated muscles (20), hence we decided to investigate heart and skeletal muscle function in *Hacd1*-KO mice. In-depth echocardiographic analysis of heart function revealed no difference between WT and *Hacd1*-KO mice (Table S2). On

the contrary, we observed a metabolic switch of skeletal muscle fibers towards a more oxidative, less glycolytic activity in *Hacd1*-KO mice. First observed on histological sections of the mixed *tibialis* anterior muscle (Fig. 2A), the oxidative switch was exemplified by a higher mitochondrial COX activity both in *soleus* and superficial *gastrocnemius* muscles, which are oxidative and glycolytic, respectively (Fig. 2B). Quantification of citrate synthase (CS) activity and protein content along with CV-ATP5A and VDAC mitochondrial proteins expression confirmed an increase in mitochondrial mass in *Hacd1*-KO skeletal muscle (Fig. 2, C to E), which was linked to increased expression of mitochondrial biogenesis promoters such as the *Ppargc1a* (*PGC-1alpha*), *Ppargc1b* (*PGC-1beta*), *Tfam* and *Nrf-1* genes (fig. S2A). Noteworthy, mitochondrial mass was unchanged in heart, liver, WAT and BAT (fig. S2, B and C). The higher oxidative activity was associated with elevated fat oxidation by *Hacd1*-KO mice during the night, a period normally characterized by low-fat oxidation (Fig. 2, F and G). Accordingly, skeletal muscle showed increased capacity to oxidize fatty acids *in vitro* (Fig. 2H). This metabolic switch was accompanied by transcriptional changes in muscle characterized by an upregulation of genes involved in fatty acid beta-oxidation and lipid signalling pathways, and a reciprocal decrease in lipogenesis genes (fig. S2D). This transcriptional signature was not observed in other metabolically active tissues such as the heart, liver, WAT and BAT (fig. S2E). Furthermore, a non-targeted large-scale proteomic analysis (24) revealed that 37% of the upregulated proteins were involved in metabolic processes (fig. S2F and Table S3), in particular the mitochondrial tricarboxylic acid cycle pathway was overrepresented by a factor of 37.5 ($P = 0.0143$) (fig. S2G and Table S3).

Altogether, these results point to a specific elevation of mitochondrial oxidative activity in skeletal muscles as a driving force for the lipid-based substrate preference and elevated energy expenditure observed in *Hacd1*-KO mice.

HACD1 deficiency is associated with increased energy dissipation in skeletal muscle mitochondria

Because *Hacd1*-KO mice had reduced locomotor activity, we excluded the hypothesis that the increased oxidative activity sustained enhanced muscle contractility. We thus investigated whether it would reflect a reduced mitochondrial efficiency in ATP production in skeletal muscle, which would drive more energy substrate consumption. Ultrastructural analysis of mitochondria by electron microscopy both in *soleus* and *gastrocnemius* muscles revealed a high proportion of altered cristae, with global enlargement and frequent tip dilation (Fig. 3, A to C, fig. S3, A to C). Furthermore, evaluation of respiratory parameters was performed on isolated mitochondria from *tibialis* anterior muscle (Fig. 3, D and E, and Table S4). Whereas basal, non-phosphorylating oxidation was similar in *Hacd1*-KO and WT mice, phosphorylating oxidation that links proton transfer to ATP production was markedly reduced (Fig. 3D), leading to a strong decrease in the respiratory coupling ratio, *i.e.* the ratio between coupled and uncoupled phosphorylation (Fig. 3E). Accordingly, the ATP production flux by muscle mitochondria was reduced (Fig. 3F), leading to a diminished ATP/O ratio indicative of deficient mitochondrial oxidative phosphorylation yield (Fig. 3G). When considering the increased mitochondrial mass of muscle fibers in *Hacd1*-KO mice (Fig. 2, B to E), consistent results were obtained on permeabilised muscle fibers from *soleus* and *gastrocnemius* muscles, both with pyruvate and fatty acid as a substrate (fig. S3, D to I, and Table S4), confirming that reduced mitochondrial coupling

was a general feature of skeletal muscles in *Hacd1*-KO mice. Noteworthy, permeabilised cardiac fibers showed normal respiratory parameters (fig. S3, J to L), restricting the mitochondrial perturbation to skeletal muscles.

To further evaluate consequences of a reduced skeletal muscle mitochondrial efficiency *in vivo*, we challenged mice with a submaximal treadmill exercise. In *Hacd1*-KO mice compared to WT, we quantified a significant 2-fold reduction in skeletal muscle ATP content after the exercise (Fig. 3H). Accordingly, phosphorylation of the AMPK energy sensor was increased in muscle after exercise in *Hacd1*-KO mice, as well as blood lactate concentration (Fig. 3, I to K).

A muscle mitochondrial reduced coupling distinct from the canonical uncoupling

Hacd1-related mitochondrial perturbation in skeletal muscle was accompanied by neither detectable modification of redox potential in both state 3 and state 4 (fig. S4A), nor difference in the generation of $\Delta\Psi_m$ in state 4 (fig. S4B). This demonstrated that successive steps of NADH production by dehydrogenases, NADH consumption by the respiratory chain and establishment of proton gradient by the respiratory chain, respectively, were all unaffected. Contrasting with conditions harboring specific ATP synthase deficiency (25), consumption of $\Delta\Psi_m$ in state 3 was also normal (fig. S4B). Besides, preserved non-phosphorylating respiration indicated that proton leak was unchanged (Fig. 3D). These data confirmed that the reduced mitochondrial coupling characterized in skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice is distinct from the canonical uncoupling. Remarkably, it induced no oxidative stress, as evidenced by normal ratio of aconitase/fumarase activities, expression of antioxidant genes and content of peroxidated lipids or carbonylated proteins (fig. S4C-G). Also, the assembly of the

supercomplexes, the oligomerization of ATP synthase and the mitochondrial translocase activity, providing ADP to the ATP synthase, were all normal (fig. S4, H to J). Altogether, these results excluded an intrinsic defective function of the respiratory chain or the ATP synthase in *Hacd1*-deficient muscles, and rather suggested a functional impairment of proton transfer from the respiratory chain to the ATP synthase.

Mitochondrial coupling efficiency in skeletal muscle depends on cardiolipin content

Given the role of *Hacd1* in the VLCFA elongation cycle, we wondered how its deficiency would alter the composition or content of the key lipids within the IMM that may be involved in the supply of protons to ATP synthase. Cardiolipin is a phospholipid specifically enriched in the IMM that has been involved in proper cristae folding (12, 13). Furthermore, its negative charge and abundance argue for specific interactions with protons (26).

Quantification of cardiolipin in skeletal muscle mitochondria from *Hacd1*-KO mice showed a significant decrease of both its absolute and relative content (Fig. 4A and fig. S5, A and B), whereas it was unchanged in cardiac mitochondria (fig. S5, C and D). Cardiolipin contains four variable acyl chains and forms a family of distinct species whose repartition is tightly controlled in cardiac and skeletal muscles (27). The slight reduction in the C18-C26/C10-C17 fatty acids ratio observed in mitochondria of *Hacd1*-KO mice had no impact on cardiolipin repartition (fig. S5, E and F). Indeed, the comprehensive quantification of cardiolipin species in skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice revealed an unchanged overall repartition (Fig. 4B and fig. S6, A to D). To document the consequences of the reduction in cardiolipin content beyond the

observed abnormalities of cristae, we analysed the properties of the IMM and indeed, we quantified changes in the longest lifetime components in TMA-DPH fluorescence lifetime decay that reflect the behavior of the probe within the most polar membrane domains(28) (fig. S6E, Table S5 and Listing S1).

Furthermore, to investigate whether the reduced cardiolipin content could be a limiting factor for ATP production in the specific context of HADC1 deficiency, we set up an original *in vitro* assay to enrich mitochondrial membranes with cardiolipin or phosphatidylcholine, a neutral and abundant phospholipid slightly increased in *Hacd1*-deficient muscle mitochondria (Fig. 4C and fig. S5B). Incorporation of the two phospholipids within the IMM was validated using fluorescent species (fig. S6F). The proof for cardiolipin enrichment in mitochondria, and more specifically in mitoplasts, was further obtained by the increased Acridine Orange 10-Nonyl Bromide (NAO probe) signal (fig. S6, G and H). Using this system, we then simultaneously measured O₂ consumption and ATP production of mitochondria and found a non-specific decreased O₂ consumption and lowered ATP production after cardiolipin- or phosphatidylcholine-enrichment, in both *Hacd1*-KO and WT conditions (fig. S6, I and J). This may be due to respiratory chain complexes dilution within the membrane (29) or to an impairment in lipid arrangement following phospholipid enrichment. Noteworthy, specific enrichment of mitochondria from *Hacd1*-KO mice with cardiolipin fully rescued the ATP/O ratio that reflects coupling efficiency of ATP synthase activity with the respiratory chain function, while the ratio was dramatically decreased by phosphatidylcholine enrichment in both *Hacd1*-KO and WT conditions (Fig. 4D). Altogether, these data demonstrate that efficient mitochondrial coupling in skeletal muscle depends on the cardiolipin content that is genetically controlled by *Hacd1* expression.

Discussion

In this study, we describe for the first time that lack of *Hacd1*/LCLFA dependent-synthesis of the IMM phospholipid cardiolipin in skeletal muscles leads to whole-body protection against HFD-induced obesity through an atypical mechanism of reduced mitochondrial coupling efficiency that drives a shift towards increased lipid oxidation and basal energy expenditure.

We have identified that in *Hacd1*-KO mice, skeletal muscle is a site of increased energy consumption, fostered by a surge in oxidative activity as a compensating means to overcome an ATP production deficit, resulting from the reduced coupling efficiency of remodelled mitochondria. Molecularly, the reduced coupling between phosphorylating and non-phosphorylating respiration was associated with reduced cardiolipin content, and we demonstrated that the addition of cardiolipin to isolated mitochondria from *Hacd1*-KO mice rescued their coupling efficiency. This rescue experiment reveals a prominent role of cardiolipin content for a fully efficient mitochondrial coupling in skeletal muscle, which does not exclude a minor contribution, yet to be evaluated, of other phospholipids such as phosphatidylinositol.

Pharmacological induction of mitochondrial uncoupling with the aim of increasing lipid oxidation has been an appealing strategy to combat obesity and restore insulin sensitivity (8). Dinitrophenol (DNP), a potent mitochondrial uncoupling compound, was successfully used during three decades for weight loss, before being withdrawn in 1938 because of its toxicity, mostly in highly ATP-demanding tissues including the heart (30). Among recent promising strategies, is a controlled-release formulation for DNP that specifically targets the liver (31). Here, we provide a genetic proof-of-concept that targeting the skeletal muscle and halving the mitochondrial coupling efficiency in this tissue induces protection against diet-induced obesity in mice, with improved

insulin sensitivity, no oxidative stress and a fully preserved cardiac function. These benefits occurred in mice that display a reduced skeletal muscle mass and locomotor activity, a situation mimicking the deleterious clinical condition of most obese patients (6, 7). Our data represent the first *in vivo* demonstration that targeting a reduced coupling in skeletal muscle mitochondria is an actionable mechanism to confer protection against obesity, even in a context of low muscle mass and limited exercise capacity.

In parallel, our study provides evidence that the highly ATP-demanding skeletal muscle benefits from a specific genetic program for optimal mitochondrial efficiency and ATP production through *Hacd1* expression. HACD enzymes participate in the VLCFA elongation cycle which has been implicated in specific lipid synthesis in skin, retina, brain or testis (18). Our study extends the field of VLCFA elongation cycle to cardiolipin metabolism in skeletal muscle as cardiolipin content was reduced in this tissue in *Hacd1*-KO mice. Synthesis of cardiolipin, a four acyl-chain phospholipid specific of the IMM, is a complex process, with the last step consisting in remodeling of cardiolipin acyl chains by Tafazzin, which results in an enrichment of linoleoyl chains (C18:2, ω -6) in heart and skeletal muscles (27). The functional importance of this reaction is illustrated by deleterious consequences of Tafazzin deficiency, which induces the Barth syndrome characterized by a life-threatening infantile dilated cardiomyopathy (15, 16). Notably, acyl chains repartition among cardiolipin species was unchanged in HACD1-deficient muscle mitochondria, indicating that the Tafazzin-dependent step of cardiolipin maturation was unaffected. *Hacd1* is also expressed in the heart (20) but serendipitously, its deficiency had no impact on cardiac mitochondrial function, likely because the redundant paralogous *Hacd* genes, highly expressed in the heart (our observations and (19, 32)), perform HACD activity in this tissue.

Our study identified a specific context of mitochondrial perturbation that suggests a direct role for cardiolipin in mitochondrial coupling efficiency. We measured normal V_0 (*i.e.* O_2 consumption without ADP), which ruled out canonical uncoupling via increased proton leakage through the IMM. Furthermore, careful analysis of respiratory parameters observed in *Hacd1*-KO mice revealed normal activity of the respiratory chain (*i.e.* of complexes I to IV) and analysis of ATP synthase oligomerization and ADP kinetics identified no change in *Hacd1*-KO mice compared to WT. The molecular mechanism that leads to a decreased phosphorylation capacity in mitochondria of HACD1-deficient muscles is therefore based neither on the classical uncoupling mechanism nor on the defective functioning of the respiratory chain or ATP synthase. Cardiolipin has been proposed to favor strong cristae curvatures, assembly of tightly packed lipid-protein complexes (33, 34) and mitochondrial respiratory efficiency (11, 12, 14, 35). Contrarily to models completely lacking cardiolipin (33, 34), our model of *Hacd1* deficiency, with a halving of the cardiolipin content, preserved assembly of respiratory supercomplexes and ATP synthase oligomerization. However, the reduction in cardiolipin content was associated with a reduction in mitochondrial coupling efficiency and our *in vitro* demonstration that the addition of cardiolipin rescued mitochondrial coupling of mitochondria isolated from *Hacd1*-deficient muscle confirms a direct role of cardiolipin in the ATP production efficiency (14, 35). Further exploration of respiratory parameters in this context would be instrumental in unraveling the molecular mechanisms underlying the contribution of cardiolipin to mitochondrial coupling. Among these is a possible role in facilitating the lateral transfer of protons from respiratory complexes to ATP synthase (36–40), enabled by the abundance and negative charge of cardiolipin (26). In parallel, several studies report transient binding of cardiolipin to ATP synthase that contributes to its efficiency,

possibly through lubrication of the ATP synthase ring or facilitated proton translocation (14, 41). All of these data are consistent with previous observations postulating a local proton circuitry at the microdomain level within the IMM for the benefit of optimized ATP synthase efficiency (39, 42–44).

Overall, our data identify that the cardiolipin content of skeletal muscle governs the energy balance of the body and open up new insights into understanding the molecular mechanisms for efficient oxidative phosphorylation in the mitochondria. Whilst future studies are warranted to support the potential of translation of this phenomenon, the mechanism we have discovered is promising for the development of new strategies for the prevention or treatment of metabolic disorders.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA – 16; approval number 11/11/15-2, 20/12/12-16 and 17-030) and all care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on male mice that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7am to 7pm. Food and water were given *ad libitum* unless otherwise stated. *Hacd1*-knockout (*Hacd1*-KO) mice were generated as previously described(20). Food was either a normal diet (ND, 3188 kcal/kg from carbohydrates (64%), proteins (24%) and fat (12%); maintenance diet for mice #C1324, Altronim) or a high-fat diet (HFD, 5241 kcal/kg from fat (60%), carbohydrates (23%) and protein (17%); Diet-Induced Obesity-Diet #C1090, Altronim). Kcal% was related to metabolizable energy (calculated values). Mice assessed for body mass gain under ND or HFD were housed individually and mice body mass and food intake were measured each week. Food efficiency was determined by dividing the body mass gain (mg) by the total calorie intake (kcal). Mice were euthanized by cervical dislocation. The fast-twitch glycolytic superficial *gastrocnemius*, fast-twitch oxidative glycolytic (mixed) *tibialis anterior* and the slow-twitch *soleus* muscle were used to provide a representative panel of muscles with different myofiber composition. In the whole study, brown adipose tissue (BAT) refers to interscapular BAT.

Spontaneous locomotor activity

Spontaneous locomotor activity was measured over a 12 h night period using the Activmeter system (Bioseb). During the experiment, mice (4 to 5-month-old) were individually caged with food and water provided *ad libitum*. The system allowed to quantify movements of the animal (distance, duration, slow *versus* fast movements, average speed of the animal when it is in motion) and the time and duration of immobility. After a 24 h-period of acclimation, locomotor activity was recorded during four consecutive nights.

Treadmill test

The running capacity was evaluated on a treadmill (Tecmachine, Medical Development) at a 4% slope. All mice (4-to-5-mo-old) were initially acclimatized to the treadmill for 5 days (10 min/day, 12 m/min). The maximal aerobic speed was determined by challenging mice to an exercise of progressively increased intensity. Speed was increased every 2 min and the speed of the last completed running step before exhaustion was considered as the individual maximal aerobic speed. Endurance capacity was determined by challenging mice to a submaximal exercise intensity (60% of the maximal aerobic speed) until exhaustion.

Blood lactate concentration

A droplet of capillary blood was produced through incision of the tip of the tail. The tail and the droplet were brought close to the tip of the sensor so that the blood was absorbed and reached the measurement chamber of a LactateScout+ device (EKF Diagnostics, Germany).

Glucose tolerance test

The glucose tolerance test was performed in mice (7-month-old) fasted overnight for 16h prior to an intraperitoneal injection of a 40% glucose in normal saline solution at a dose of 3 g of glucose per kg of body mass for ND-fed mice or 1 g/kg glucose for HFD-fed mice. Blood was sampled from the tail vein just before the injection (T_0) and then after 30, 60, 90 and 120 min in order to assay blood glucose concentration (Glycemia; Contour XT glucometer; Bayer).

Indirect calorimetry study

Mice (4-mo-old) were individually housed 14 days before and presented with training bottle and acclimated to the chambers for 48 h before experimental measurements. For the experiment, they were fed 7 days with normal diet and then 7 days with high-fat diet. They were analyzed for whole energy expenditure, oxygen consumption and carbon dioxide production, RQ (VCO_2/VO_2), food intake and locomotor activity (Beambreaks/h) using a calorimetric device (Labmaster, TSE Systems GmbH). Data were recorded every 15 min for each animal during the entire experiment. Data analysis was performed on excel XP using extracted raw value of VO_2 consumed, VCO_2 production (express in ml/h), and energy expenditure (kcal/h). Subsequently, each value was normalized to the whole lean body mass extracted from the EchoMRI (Whole Body Composition Analysers, EchoMRI, Houston, USA) analysis as previously described (45). No practical method of estimation of the basal metabolism is available presently. However, an estimation could be made from windows of time during which animals should have no access to food, their previous intake had been far enough in time to discard the thermic effect of food and the spontaneous activity had been the lowest possible within the past 30 min. Data points of energy expenditure were

considered as the best estimation of basal metabolism when the spontaneous activity was lower, within the last 30 min, than 5% of the highest daily value and when no intake was recorded within the last 60 min. Fatty acid oxidation was calculated from the following equation: fat ox (kcal/h) = energy expenditure (kcal/h) × (1-RER/0,3) according to (46).

Echocardiography

Mice (7-month-old) were trained to be grasped because transthoracic echocardiography (TTE) was performed in non-sedated mice in order to avoid any cardiac depressor effect of anesthetic agents. Typical heart rates at recording were above 600 bpm. Mice were carefully caught by the left hand and placed in supine position. Images were acquired from a parasternal position at the level of the papillary muscles using a 13-MHz linear-array transducer with a digital ultrasound system (Vivid 7, GE Medical System, Horton, Norway). Left ventricular (LV) diameters, anterior and posterior wall thicknesses were serially obtained from M-mode acquisition. As we expected a homogenous function and planned to compare sequential echocardiography, we used M-mode technic to assess both LV volumes, mass, and ejection fraction. Relative LV wall thickness (RWT) was defined as the sum of septal and posterior wall thickness over LV end-diastolic diameter, and LV mass was determined using the uncorrected cube assumption formula [LV mass = (AWTdp LVEDDp PWTd)³ - (LVEDD)³]. Diastolic function was not assessed by echocardiography because of the heart rate above 600 bpm precluding the analysis of transmitral flow. Therefore, we assessed relaxation by dP/dt_{min} during *in vivo* hemodynamic analysis. Peak systolic values of radial SR in the anterior and posterior wall were obtained using Tissue Doppler Imaging (TDI) as previously described (47).

TDI loops were acquired from the same parasternal view with a careful alignment with the radial component of the deformation (48) at a mean frame rate of 514 fps and a depth of 1 cm. The Nyquist velocity limit was set at 12 cm/s. Radial SR analysis was performed offline using the EchoPac Software (GE Medical Systems) by a single observer (G.D.) blinded to the genotype of the animals. Peak systolic of radial SR was computed from a region of interest positioned in the mid-anterior wall and was measured over an axial distance of 0.6 mm. The temporal smoothing filters were turned off for all measurements. Because slight respiratory variations exist, we averaged peak systolic of radial SR on eight consecutive cardiac cycles. The intra-observer variability of radial SR was assessed (G.D.) using the same acquisition and same method at 24-h intervals ($3.5 \pm 3.4\%$ [3.3–3.7]).

Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses

Samples from 4-mo-old mice were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Total RNAs were isolated using TRIzol reagent (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm >1.7 . RNA quality was checked on agarose gel. One microgram of RNA was used for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNAs were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X; Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). All PCR and qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All presented RT-qPCR results were normalized by the geometrical mean of three independent reference genes (*Ywhaz*, *Polr2a*, *Rplpo*), as previously described (49). Sequences of primers are listed in Table S6.

Western blot experiments

Frozen tissues from 4-to-7-mo-old mice were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid), supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Protein extracts (20 µg) from superficial *gastrocnemius* muscles of 6-mo-old WT and *Hacd1*-KO mice were loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred to PVDF membranes using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Thereafter, blots were blocked for 60 min in 1.25% gelatin in Tris Buffer Saline-Tween at room temperature, followed by incubation with different primary antibodies (phospho-AMPK, AMPK and Citrate Synthase from Cell signaling; ATP5A from Abcam; VDAC (custom-made, kind gift from Dr. C. Lemaire, INSERM U1180), overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies for 60 min at room temperature and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH). Protein content was normalized to β-actin (Antibody from Santa Cruz).

Proteomic analyses

Muscle lysates of *tibialis anterior* from 4-mo-old mice were loaded on a gel and each lane of gel was cut and washed for 15 min with an acetonitrile (ACN) / 100 mM ammonium bicarbonate mixture (1:1). Digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 and the quantity of modified trypsin (Promega, sequencing grade)

was 0.1 µg per sample. Digestion was achieved for 6 h at 37 °C. The supernatant was conserved. Peptides were extracted by 5% formic acid in water/ACN (v/v). Supernatant and extract tryptic peptides were dried and resuspended in 20 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA). HPLC was performed on an Ultimate 3000 LC system (Dionex). A 4 µL sample was loaded at 20 µl/min on a precolumn cartridge (stationary phase: C18 PepMap 100, 5 µm; column: 300 µm i.d., 5 mm; Dionex) and desalted with 0.08% TFA and 2% ACN. After 4 min, the precolumn cartridge was connected to the separating PepMap C18 column (stationary phase: C18 PepMap 100, 3 µm; column: 75 µm i.d., 150 mm; Dionex). Buffers were 0.1% HCOOH, 2% ACN (A) and 0.1% HCOOH and 80% ACN (B). The peptide separation was achieved with a linear gradient from 0 to 36% B for 18 min at 300 nl/min. Including the regeneration step at 100% B and the equilibration step at 100% A, one run took 50 min. Eluted peptides were analyzed on-line with a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.35 kV ionization potential) was performed with liquid junction and a capillary probe (10 µm i.d.; New Objective). Peptide ions were analyzed using Xcalibur 2.07 with the following data-dependent acquisition steps (1): full MS scan in Orbitrap (mass-to-charge ratio (m/z) 300 to 1600, profile mode) and (2) MS/MS in linear Trap (qz = 0.25, activation time = 30 ms, and collision energy = 35%; centroid mode). Steps 2 was repeated for the four major ions detected in step 1. Dynamic exclusion time was set to 60 s. A database search was performed with XTandem (X! tandem CYCLONE version 2010.12.01.1, <http://www.thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible miss cleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. A refinement

search was added with similar parameters except that semi-trypsinic peptide and possible N-ter proteins acetylation were searched. Few databases were used: the *Mus musculus* database (49728 entries, version March 2011 from Uniprot), contaminant database (trypsin, keratins...). Only peptides with an E value smaller than 0.1 were reported. Identified proteins were filtered and grouped using XTandem Pipeline (version 3.1.4) (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) according to: (1) a minimum of two different peptides was required with a E value smaller than 0.05, (2) a protein E value (calculated as the product of unique peptide E values) smaller than 10^{-4} . To take redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed to group proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relatively to other members of the group were reported as sub-groups. Gene Ontology analysis and protein set enrichment statistical analyses were performed using the PANTHER (Protein ANnotation THrough Evolutionary Relationship) classification system (www.pantherdb.org; (24)).

ATP quantification

Muscle ATP content was quantified using the CLSII kit (Sigma). Mice (4-to-5-mo-old) were euthanized immediately after a submaximal treadmill exercise of 40 min at 19 m/min and 4% slope, and *tibialis anterior* muscle were removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were weighted, minced with scissors and homogenized in the lysis buffer provided in the kit using a Dounce homogenizer. Homogenates were centrifuged at 15,000 g for 10 min and supernatants diluted 50:50 in the dilution buffer provided by the kit. ATP quantitation was performed according to the manufacturer's instructions. For each sample, ATP concentration was normalized to the total protein content assessed with the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Isolation of skeletal muscles mitochondria and respiration measurement

Tibialis anterior muscles were quickly collected after euthanasia of mice (8-mo-old) in ice-cold PBS (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; muscle samples were then minced with scissors, rinsed and incubated in 5 ml of ice-cold PBS supplemented with 10 mM EDTA and 0.05% trypsin for 30 min, followed by a centrifugation at 200 g for 5 min. Pellets were suspended in Isolation Buffer 1 (67 mM sucrose, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.2% BSA and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 700 g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then centrifuged at 8,000 g for 10 min. The crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of Isolation Buffer 2 (250 mM sucrose, 3 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). The mitochondrial oxygen consumption flux was measured as previously described (50) at 37 °C using 500 µg of crude mitochondria proteins diluted in 3 ml of mitochondrial respiration buffer (250 mM sucrose, 20 µM EGTA, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) in an oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments). The oxygen consumption rate was measured using 4 mM malate plus either 1 mM pyruvate and or 1 mM pyruvate and 15 mM succinate. Oxygen consumption was assessed in the phosphorylating state with 4 mM of ADP or in the non-phosphorylating state by adding 2.5 µg/ml of oligomycin. Respiration was uncoupled by successive addition of FCCP up to 5 µM to reach maximal respiration.

Measurement of ATP synthesis flux

Isolated mitochondria (65 µg/ml) from 4-mo-old mice were resuspended in the mitochondrial respiration buffer (see above). After addition of ADP (4 mM), pyruvate (10 mM), glutamate (5 mM) and malate (5 mM), the oxygen consumption and ATP synthesis rates were both measured. Aliquots were collected every 60 s and precipitated in 7% HClO₄/25 mM EDTA, centrifuged at 16,000 g for 5 min and then neutralized with KOH 2 M, MOPS 0.3 M. The ATP content in these samples was determined using the CLSII kit (Sigma). In a parallel experiment, oligomycin (2.5 µg/ml) was added to the mitochondrial suspension to determine the non-oxidative ATP synthesis rate.

Membrane potential measurement

The transmembrane potential variations ($\Delta\Psi$) was estimated in isolated mitochondria from 4-mo-old mice from the fluorescence quenching of the lipophilic cationic dye rhodamine 123 using a Hitachi F7000 fluorimeter. Isolated mitochondria (65 µg protein/ml) were incubated in the Mitochondrial Buffer (250 mM sucrose, 20 µM EGTA, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing pyruvate (10 mM), glutamate (5 mM), malate (5 mM), 0.66 µM of rhodamine 123 (Sigma) and thermostated at 37 °C. When added, ADP was 1 mM and oligomycin was 2.5 µg/ml. The rhodamine 123 fluorescence signal at each steady state (F) was recorded using an excitation wavelength of 485 nm and fluorescence emission was continuously detected at 500 nm. At the end of each experiment, the maximum fluorescence signal (F_{max}) was monitored after complete de-energization of the mitochondria following addition of FCCP (6 µM). Then, the F_{max}-F/F_{max} difference at each steady state was calculated.

NAD (P)H/NAD (P)+ Redox measurement

Isolated mitochondria (100 µg protein/ml) from 4-mo-old mice were incubated in the Mitochondrial Buffer (250 mM sucrose, 20 µM EGTA, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) thermostated at 37 °C. When added, pyruvate was 10 mM, glutamate 5 mM, malate 5 mM, ADP 4 mM and cyanide 4 mM. The NAD (P)H autofluorescence signal at each steady state (F) was recorded using an excitation wavelength of 340 nm and fluorescence emission was continuously detected at 450 nm. At the end of each experiment, the maximum fluorescence signal (F_{max}) was monitored after complete reduction within the NAD (P)H/NAD (P)+ couple following addition of cyanide. The fluorescence signal recorded in the presence of mitochondria alone without respiratory substrate was used as the 0% reduction state for the NAD (P)H/NAD (P)+ couple. NAD (P)H/NAD (P)+ ratio was expressed as a percentage of reduction according to the following formula: % Reduction = (F-F_{0%})/ (F_{100%}-F_{0%})*100.

Mitochondrial isolation from heart

Mice (8-mo-old) were euthanized and hearts were quickly collected in ice-cold PBS (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; heart samples were then transferred into Isolation Buffer (310 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.2), minced with scissors and homogenized with a dounce homogenizer (Sigma). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 1,200 g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then centrifuged at 12,000 g for 10 min. The crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of Isolation

Buffer. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Permeabilized muscle fibers respiration

The mitochondrial respiration was studied *in vitro* in saponin-skinned fibers as previously described (51). Briefly, fibers from 4-mo-old mice were separated under a binocular microscope in solution S (see below) on ice and then permeabilized in solution S containing 50 µg/ml of saponin for 30 min at 4 °C. After being placed 10 min in solution R (see below) to wash out adenine nucleotides and creatine phosphate, skinned separated fibers were transferred in a 3 ml water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments) equipped with a Clark electrode, as previously described (51), under continuous stirring. Solution S contained: 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 20 mM imidazole, 50 mM potassium-methane sulfonate, 5.7 mM Na₂ATP, 15 mM creatine-phosphate (final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca²⁺, 1 mM free Mg²⁺). Solution R contained 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 20 mM imidazole, 3 mM phosphate, 90 mM potassium-methane sulfonate, 10 mM sodium-methane sulfonate and 2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, (final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca²⁺, 1 mM free Mg²⁺). After the experiments, fibers were harvested and dried, and respiration rates expressed as µmoles of O₂ per min and per g of dry mass.

Measurement of the maximal muscular oxidative capacities

After the determination of basal respiration rate measured at 22 °C with R solution plus 1 mM pyruvate and 4 mM malate as mitochondrial substrates (V₀, non-phosphorylating rate), fibers were exposed to an increasing concentration of ADP to

determine the apparent K_m for ADP and maximal mitochondrial respiration (at saturating concentration of ADP (2 mM) V_{max} , phosphorylating rate). The ratio of V_{max}/V_0 represented the degree of coupling between oxidation and phosphorylation of ADP for pyruvate.

Measurement of the respiratory chain complexes

While V_{max} was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Then, four min after this V_{max} measurement, complex II was stimulated with succinate (15 mM) (complexes I, II, III, IV). Complex I was then blocked with amytal (2 mM). In these conditions, mitochondrial respiration was evaluated by complexes II, III, and IV.

Measurement of mitochondrial substrate utilization

Experiments were started in solution R plus 4 mM malate, 2 mM carnitine and 0.1 mM palmitoyl-coenzyme A (PCoA). After the determination of basal respiration rate V_0 , the maximal fiber respiration rate of PCoA was measured in the presence of a saturating ADP concentration (2 mM). Then substrates were sequentially added every three to four min as follows: 0.1 mM octanoate, 1 mM pyruvate and 15 mM succinate. The ratio $PCoA/V_0$ corresponded to the degree of coupling between oxidation and phosphorylation for this substrate.

Supramolecular organization of mitochondrial respiratory chain complexes

For BN-PAGE, 75 μ g of isolated mitochondria from the *tibialis anterior* muscle were incubated with digitonin extraction buffer (HEPES (30 mM), potassium Acetate (150 mM), Glycerol (12%), 6-Aminocaproic acid (2mM), EDTA (2 mM), 6 g high purity digitonine/g protein of mitochondria, pH 7.2), and vortexed 1 h at 4 °C to solubilise membrane proteins. After incubation, solubilized extracts were centrifuged at 30 000 g during 20 min, and supernatant are then mixed with loading dye (0.0125% [w/v]

Coomassie Brilliant Blue G-250). Native complexes were resolved using Bis-Tris Invitrogen™ Novex™ NativePAGE™ 3-12% acrylamide gradient. OXPHOS complexes were visualised after in-gel activity (IGA) assays as described previously (52). Briefly, native gel was washed in Potassium Phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) and then incubated in Potassium Phosphate buffer containing iodinitrotetrazolium (INT, 1 mg/ml) and NADH (400 µM, pH 7.2) for CI. For CIV in-gel activity assays, native gels were incubated in Respiratory buffer (120 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM Tris-base, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.2) containing Diaminobenzidine (DAB, 1 mg/ml) and bovine cytochrome *c* (0.5 mg/ml). Coomassie staining was performed following 'PageBlue protein staining' (Fermentas) recommendations. BN-PAGE IGA were collected using the Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare).

ATP synthase oligomerization

Three independent preparations of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle of 6-mo-old WT and *Hacd1*-KO mice were resuspended at a protein concentration of 10 mg/mL in extraction buffer (150 mM potassium acetate, 15% (w/v) glycerol, 2 mM ε-amino caproic acid, 30 mM HEPES pH 7.4) in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche) and 1.5% digitonin (w/v). After an incubation of 30 min at 4 °C, samples were centrifuged at 25,000 g for 30 min at 4 °C. 10 µL of supernatant were mixed with 1 µL of 0.0125% (w/v) SERVA blue G and loaded on 3-12% Bis-Tris native gel (Novex, Life technologies). Anode buffer was prepared with a 20-fold dilution of Novex Running Buffer, and light blue cathode buffer was obtained by a 200-fold dilution of Novex cathode additive in anode buffer. Gels were run at 150 V for 120 min and ATPase activities were revealed in gel.

Measurement of Fatty Acid Oxidation

Gastrocnemius muscles from 12-mo-old mice were finely chopped in 2 ml of Krebs-Henseleit bicarbonate medium, pH 7.4, then incubated in Erlenmeyer flasks containing a final volume of 25 ml of the same medium. Flasks were maintained at 37 °C in an oxygenated atmosphere (O₂/CO₂ 95/5). For fatty acid oxidation determination, 1 pCi of ¹⁴C-linoleate was added to the medium and the flask was hermetically sealed with rubber caps with centrally-inserted plastic wells. After 20-30 min of incubation, 0.4 ml of 40% (w/v) HClO₄ were added through the rubber cap and 0.4 ml of 1 M solution of hyamine hydroxide were deposited in the center of the well. The flasks were then shaken at RT for 1 h. The radioactivity present in the center wells (corresponding to the formed CO₂) was determined and the flask content was harvested and centrifuged at 700 g for 15 min. The resulting supernatant was neutralized with KOH (5 M) and total ¹⁴C-labeled acid-soluble products were counted. Total fatty acid oxidation corresponded to the sum of the catabolism of labeled linoleate into CO₂ and acid-soluble products.

Mitoplast preparation

Freshly isolated mitochondrial pellets were incubated in 1 ml of H300 Mitoplast Buffer (sucrose 70 mM, mannitol 220 mM, Hepes 2 mM, pH 7.4) supplemented with 0.05% BSA and 0.12 µg of digitonin per µg of mitochondrial protein, for 15 min at 4 °C, with gentle shaking. Mitochondria were centrifugated at 8,000 g for 5 min and pellets were incubated in 1 ml of H40 Mitoplast Buffer (H300 buffer diluted 7.5 X in distilled water) for 15 min at 4 °C, with gentle shaking. Suspension was then homogenized with a dounce homogenizer (Sigma) and centrifuged at 8,000 g for 5 min. Pellets were

resuspended in 1 ml of H40 buffer and centrifuged at 8,000 g for 5 min. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Physical properties of mitochondrial membranes (TMA-DPH decay-fluorescence)

1- (4-Trimethylammonio-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluenesulfonate (TMA-DPH, Sigma Aldrich) was used to monitor physical properties of mitochondrial membranes of 7-to-8-month-old mice. TMA-DPH is composed of a cationic substitute (TMA) that anchors at the polar heads of the membrane, while allowing the fluorescent hydrophobic probe DPH to be located in nonpolar regions. To limit fluorescent noise, mitoplasts were resuspended in the Hypotonic Buffer (sucrose 9 mM, mannitol 29 mM, Hepes 0.3 mM, pH 7.4) as described hereafter.

Experiments were repeated five times using independent samples, each from different mice. Decay-fluorescence measurements were performed on each sample at 37 °C after a measurement of the instrumental response of the spectrofluorimeter used to measure fluorescence-decay ("prompt"). Thirty μ l of sample ($DO_{600} = 0.055$) diluted in 2.97 ml of Hypotonic Buffer were introduced into spectroscopic quartz cuvette with an optical path length of one cm (VWR International).

Fluorescence-decay was measured by the time-correlated single-photon counting (TCSPC) method using a Horiba-Fluoromax-4® spectrofluorimeter (Horiba) equipped with a 370-nm laser diode (NanoLED C2, Horiba) as the source of excitation. Fluorescence decays were measured in TCSPC setup (Deltahub, Horiba). The Instrument Response Function (IRF) was about 160 ps (measured at 370 nm using the hypotonic buffer). Emission and excitation wavelength of TMA-DPH were

respectively fixed at 370 nm and 431 ± 1.1 nm. Each decay curve corresponded to 10,000 counts.

Quantitative investigation of fluorescence decay of TMA-DPH

Curve smoothing

For illustration purposes, we smoothed the decay for the representative experiments using the generalized additive model (GAM) of R statistical package “mgcv” with a Gaussian link and a P -spline smooth term. This smoothing was not used for the subsequent modelling steps below.

Finite exponential mixture model

We modelled the fluorescence decay obtained from the lipidomic analyses of mitoplasts using finite exponential mixtures (28). We accounted for the artefacts of the measuring apparatus by convolving the mixtures with the instrumental response (or “prompt”). The model was comprised of $2N$ parameters, with N the number of exponentials (each exponential has a scale and a characteristic time). We did not find necessary to account for neither a potential time shift nor for background noise with an additional constant, as those additions did not improve the fit (data not shown). More specifically, let $P(i)$ be the “prompt” (instrumental response) and $Y(i)$ the “decay” (experimental response) for channel i . The times of measurement are δi , with δ the time interval between channels. The decay $G(t)$ at time t is given by a mixture of exponentials with characteristic times τ_k and scaling parameters C_k (\mathcal{H} is the Heaviside function):

$$G(t) = \mathcal{H}(t) \sum_k C_k e^{-t/\tau_k}$$

Convolving with the Prompt response $P(i)$ gives the model, with $B_k = \delta C_k$ scaling parameters:

$$F(i) = \sum_{j=0}^{\infty} P(j) \mathcal{H}(t) \sum_k B_k e^{-\delta(i-j)/\tau_k}$$

For the optimization procedures, we reparametrized the τ_k to $\theta_k = \log \tau_k$.

Non-linear mixed-effects models

To compare mixing proportions and characteristic times of decay, we used various non-linear mixed-effects models (see Listing S1): firstly, a baseline nonlinear mixed-effects model for the inner membrane that did not discriminate WT and *Hacd1*-KO (model A); secondly, two models where either the mixing proportions or the characteristic times of decay alone could vary between WT and *Hacd1*-KO (respectively, models B1 and B2); finally, one model where both the mixing proportions and characteristic times were allowed to differ (model C).

More specifically, the mice phenotype (WT or *Hacd1*-KO) was encoded in a categorical factor with the following contrast matrix:

$$L = \begin{pmatrix} & \text{Hacd1-KO} & \text{WT} \\ \text{intercept} & 1 & 0 \\ \text{WT} & -1 & 1 \end{pmatrix}$$

For instance, the mean θ_1 for population *Hacd1*-KO is the intercept, and the mean θ_1 for population WT is (intercept) + (WT).

Model fitting

We fitted the model through either a weighted nonlinear least-square method at the experiment level or nonlinear mixed-effects models (NLME) with potential linear regressors for the fixed parameters.

Statistical analysis

For model comparison, we performed an analysis of variance (ANOVA), privileging the reading of the Akaike's Information Criterion over that of the Bayesian Information Criterion and the P -value of the log-likelihood-ratio (53).

Workflow

Firstly, we determined the number of exponentials to use by comparing the AIC between potential models and whether models converged when fitted through a Levenberg-Marquardt nonlinear least square method. Then, we determined the appropriate random-effects structure and heteroscedasticity correction for NLME modelling by assessing convergence, AIC, within-experiment and between-experiment heteroscedasticity for various combinations. Lastly, we added a linear dependence of (some of) the fixed effects to a dummy variable *WT/Hacd1-KO* and assessed the statistical significance of this addition with an analysis of variance (ANOVA).

Software implementation

The model is implemented in C++ using the Armadillo library for linear algebra and uses Armadillo's Fast Fourier Transform to perform the discrete convolution with the instrumental response. Both the optimization and analysis were made in the R statistical language with package "nlme". All the code is made available at github.com/ProlaLab/Prola2020.Sci.Adv with the appropriate tests and reproducible workflow (in addition, the releases are archived at DOI 10.5281/zenodo.1228112). The raw data is available upon request at DOI 10.5281/zenodo.4046133.

Lipidomic analyses

Mice (4-month-old) were euthanized, and mitochondria were isolated from TA muscles as described above and immediately frozen in liquid nitrogen and protected from oxidation by a layer of argon gas and stored at -80 °C until analysis. Quantitation of

fatty acids and glycerophospholipids contents was performed as previously described for myoblasts (20, 54). Phospholipid species representation was performed as described hereafter. Briefly, total phospholipid amount was determined with Corona CAD detection by calculating the concentration of each PL class (in $\mu\text{g/ml}$) compared to calibration ranges of commercial standards. Chromatographic system from ThermoFisher Scientific included a Dionex U-3000 RSLC system with 2 quaternary pumps, an autosampler and a column oven. The RSLC system was coupled on-line to a charged aerosol detector, Corona-CAD Ultra for the quantitative part of the study and a LTQ-Orbitrap Velos Pro for the lipidomic study (all from ThermoFisher).

Liquid chromatography, mass spectrometry, phospholipid species identification and phospholipid species representation were performed as previously described (55).

Statistical analysis was performed using multiple pair wise tests according to the Holm-Bonferroni method.

Mitochondrial phospholipids enrichment

Isolated mitochondria (500 μg) from 4-mo-old mice were incubated in Fusion Buffer (220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 2 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM Glutamate, 2 mM Malate, 10 mM Pyruvate and 2.5 mM ADP, pH 6.5) for 20 min at 30 °C under constant stirring agitation in the presence of 15 nmol small unilamellar vesicles (SUV), prepared as previously described (56) and using natural or fluorescent phospholipids (Avanti Polar Lipids). After fusion, mitochondria were layered on a sucrose gradient (0.6 M) and centrifuged 10 min at 10,000g at 4 °C to remove SUV. Pellet was then washed in Mitochondrial Buffer 2 (250 mM sucrose, 3 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Confocal images were acquired with a Zeiss LSM800 confocal (Zeiss).

NAO quantification

Isolated mitochondria or mitoplasts (100 µg of proteins) from 4-mo-old mice were fixed in 2% PFA for 15 min, centrifuged at 10,000 g for 10 min and rinsed with PBS. The pellet was then resuspended and incubated 10 min at RT in 100 µl of PBS supplemented with 35 µM of Acridine Orange 10-Nonyl Bromide (NAO). Mitochondria or mitoplasts were then centrifuged at 10,000 g for 10 min, pellets were resuspended in 100 µl of PBS and fluorescence (λ excitation: 495 nm, λ emission: 620 nm) was acquired in 96-well plates with a spectrofluorimeter (TECAN infinite M200, TECAN, Austria).

Enzymatic assay

Complete enzymatic extractions from small pieces of frozen tissues from 4-mo-old mice were obtained in an ice-cold buffer (one ml for 50 mg of tissue) containing 5 mM Hepes, pH 8.7, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.1% Triton X-100, using a Precellys homogenizer (Bertin), by 2 cycles of 8 sec at 6,500 rpm. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Total activity of cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS), were assayed at 30 °C, pH 7.5, using standard spectrophotometric assays(57). Total activities of aconitase and fumarase were assayed from mitochondrial extracts at 30 °C, pH 7.5, using standard spectrophotometric assays (58).

Protein carbonylation

Muscle carbonylation of proteins was quantified using the Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore). Briefly, protein lysates from the superficial *gastrocnemius*

muscle of 4-mo-old mice were prepared as for western blots and treated to derivatize carbonyl groups according to the manufacturer's instructions. Then, protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the provided primary and secondary antibodies. Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH). Membrane was stained with Coomassie Blue and protein content was normalized to one band.

Histological staining

Tibialis anterior muscles from 7-mo-old mice were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and then stored at -80°C . Ten μm -thick transverse sections were stained for Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), succinate dehydrogenase (SDH) and NADH dehydrogenase (NADH tetrazolium reductase reaction, NADH-TR) activity as previously described (59). Livers were frozen in OCT embedding medium (Tissue-Tek). Ten μm -thick transverse sections were fixed for 30 min in Baker solution (136 mM CaCl_2 , 4% HCHO), rinsed with water and then stained with Oil Red O (ORO) solution (12 mM ORO in 70% ethanol) for 5 min (liver) or 30 min (muscle). The adipose tissue from gonadal pads was fixed in 10% formalin for 48 h and embedded in paraffin. Four μm -thick transverse sections were stained with hematoxylin-eosin. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed in a blinded manner using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Electron microscopy

After euthanasia of 5-to-6-mo-old mice, muscle tension and position were normalized by pinning the entire skinned hindlimb on a paraffin-coated dish, with the metatarsus

making an angle of 90 degree with the tibia. The limb was then fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at room temperature for 4 h. Muscles were cut in small pieces and kept overnight in the same fixation buffer at 4 °C. Samples were then processed at the Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, (<https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>). They were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer; postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate; gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Data Analysis

For cristae quantification, 20 images at x 12,000 magnification were analyzed per animal and all visible cristae were assessed using the function plot profile on ImageJ (v1.47, NIH). Mean cristae width corresponded to the maximal diameter of the tubular part and was calculated for each crista of each analyzed mitochondrion. For each animal, a minimum of 100 cristae was measured for the superficialis *gastrocnemius* muscle and 800 cristae for the *soleus* muscle. All images were analyzed in a blinded manner.

Fecal lipids quantitation

One gram of feces was collected after 8 wk of HFD (7-mo-old mice) and powdered using a tissue grinder. The powder was re-suspended in 5 ml of normal saline solution

(NaCl 0.9%) and lipids were extracted in a mixture of chloroform:methanol (2:1). The solution was centrifuged at 1,000 g for 10 min. Lipids collected in the lower phase were air-dried and weighted.

Quantification and statistical analysis

All data are presented as mean of values measured on distinct samples \pm s.e.. Data were analysed using Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Raw data from each individual experiment were evaluated using an unpaired two-tailed t test with 95% confidence. For datasets that did not pass the D'Agostino and Pearson omnibus normality test ($\alpha = 0.05$), differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Multiple pair wise tests were corrected using Holm-Bonferroni method. The results of indirect calorimetry are expressed as mean \pm s.e.m.. Variance equality was analyzed by F test, and comparisons between groups were carried out using Analysis of variance with food (ND or HFD) or phase (day or night) and genotype of mice (WT or *Hacd1*-KO mice) and their interactions as factors followed by post hoc Tukey test. Data of calorimetrics presented represent mean of at least 96 h measurement. Differences between groups were considered significant if the *P* value was less than 0.05.

Key resources

A complete set of the reagents used in this study is available in Table S7.

The PDF file of Supplementary Materials includes:

Tables S1 to S7

Listing S1

Figures S1 to S6

REFERENCES

1. L. M. Jaacks, S. Vandevijvere, A. Pan, C. J. McGowan, C. Wallace, F. Imamura, D. Mozaffarian, B. Swinburn, M. Ezzati, The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **7**, 231–240 (2019).
2. J. Kerr, C. Anderson, S. M. Lippman, Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *Lancet Oncol.* **18**, e457–e471 (2017).
3. M. O. Goodarzi, Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 223–236 (2018).
4. A. Chait, L. J. den Hartigh, Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 22 (2020).
5. D. A. Kass, P. Duggal, O. Cingolani, Obesity could shift severe COVID-19 disease to younger ages. *The Lancet.* **395**, 1544–1545 (2020).
6. J. L. Kraschnewski, J. Boan, J. Esposito, N. E. Sherwood, E. B. Lehman, D. K. Kephart, C. N. Sciamanna, Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int. J. Obes.* **34**, 1644–1654 (2010).
7. K. R. Westerterp, Physical activity, food intake, and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutr. Rev.* **68**, 148–154 (2010).
8. Y.-H. Tseng, A. M. Cypess, C. R. Kahn, Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 465–482 (2010).
9. P. Mitchell, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* **191**, 144–148 (1961).
10. S. Cogliati, J. A. Enriquez, L. Scorrano, Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 261–273 (2016).
11. N. Ikon, R. O. Ryan, Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1859**, 1156–1163 (2017).
12. G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis, F. M. Ruggiero, G. Petrosillo, Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**, 408–417 (2014).
13. M. Schlame, M. Ren, The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1788**, 2080–2083 (2009).
14. A. L. Duncan, A. J. Robinson, J. E. Walker, Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 8687–8692 (2016).

15. N. Ikon, R. O. Ryan, Barth Syndrome: Connecting Cardiolipin to Cardiomyopathy. *Lipids*. **52**, 99–108 (2017).
16. P. G. Barth, H. R. Scholte, J. A. Berden, J. M. V. D. K.-V. Moorsel, I. E. M. Luyt-Houwen, E. T. V. Veer-Korthof, J. J. V. D. Harten, M. A. Sobotka-Plojhar, An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J. Neurol. Sci.* **62**, 327–355 (1983).
17. V. Denic, J. S. Weissman, A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*. **130**, 663–77 (2007).
18. T. Sassa, A. Kihara, Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. *Biomol. Ther.* **22**, 83–92 (2014).
19. M. Ikeda, Y. Kanao, M. Yamanaka, H. Sakuraba, Y. Mizutani, Y. Igarashi, A. Kihara, Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.* **582**, 2435–2440 (2008).
20. J. Blondelle, Y. Ohno, V. Gache, S. Guyot, S. Storck, N. Blanchard-Gutton, I. Barthélémy, G. Walmsley, A. Rahier, S. Gadin, M. Maurer, L. Guillaud, A. Prola, A. Ferry, G. Aubin-Houzelstein, J. Demarquoy, F. Relaix, R. J. Piercy, S. Blot, A. Kihara, L. Tiret, F. Pilot-Storck, HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 429–440 (2015).
21. E. Muhammad, O. Reish, Y. Ohno, T. Scheetz, A. DeLuca, C. Searby, M. Regev, L. Benyamini, Y. Fellig, A. Kihara, V. C. Sheffield, R. Parvari, Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 5229 (2013).
22. M. Pelé, L. Tiret, J.-L. Kessler, S. Blot, J.-J. Panthier, SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1417–1427 (2005).
23. F. Al Amrani, C. Gorodetsky, L.-N. Hazrati, K. Amburgey, H. D. Gonorazky, J. J. Dowling, Biallelic LINE insertion mutation in HACD1 causing congenital myopathy. *Neurol. Genet.* **6**, e423 (2020).
24. H. Mi, A. Muruganujan, J. T. Casagrande, P. D. Thomas, Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* **8**, 1551–1566 (2013).
25. J. A. Mayr, V. Havlícková, F. Zimmermann, I. Magler, V. Kaplanová, P. Jesina, A. Pecinová, H. Nusková, J. Koch, W. Sperl, J. Houstek, Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3430–3439 (2010).
26. T. H. Haines, N. A. Dencher, Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **528**, 35–39 (2002).

27. G. Oemer, K. Lackner, K. Muigg, G. Krumschnabel, K. Watschinger, S. Sailer, H. Lindner, E. Gnaiger, S. B. Wortmann, E. R. Werner, J. Zschocke, M. A. Keller, Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4158–4163 (2018).
28. C. D. Stubbs, C. Ho, S. J. Slater, Fluorescence techniques for probing water penetration into lipid bilayers. *J. Fluoresc.* **5**, 19–28 (1995).
29. H. Schneider, J. J. Lemasters, M. Höchli, C. R. Hackenbrock, Liposome-mitochondrial inner membrane fusion. Lateral diffusion of integral electron transfer components. *J. Biol. Chem.* **255**, 3748–3756 (1980).
30. J. Grundlingh, P. I. Dargan, M. El-Zanfaly, D. M. Wood, 2,4-Dinitrophenol (DNP): A Weight Loss Agent with Significant Acute Toxicity and Risk of Death. *J. Med. Toxicol.* **7**, 205–212 (2011).
31. R. J. Perry, D. Zhang, X.-M. Zhang, J. L. Boyer, G. I. Shulman, Controlled-release mitochondrial protonophore reverses diabetes and steatohepatitis in rats. *Science.* **347**, 1253–1256 (2015).
32. B. Wang, J. Pelletier, M. J. Massaad, A. Herscovics, G. C. Shore, The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2767–2778 (2004).
33. D. Acehan, A. Malhotra, Y. Xu, M. Ren, D. L. Stokes, M. Schlame, Cardiolipin Affects the Supramolecular Organization of ATP Synthase in Mitochondria. *Biophys. J.* **100**, 2184–2192 (2011).
34. M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 29403–29408 (2005).
35. S. E. Gasanov, A. A. Kim, L. S. Yaguzhinsky, R. K. Dagda, Non-bilayer structures in mitochondrial membranes regulate ATP synthase activity. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 586–599 (2018).
36. D. A. Cherepanov, W. Junge, A. Y. Mulkidjanian, Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: dependence on the fixed and mobile pH buffers, on the size and form of membrane particles, and on the interfacial potential barrier. *Biophys. J.* **86**, 665–680 (2004).
37. C. Zhang, D. G. Knyazev, Y. A. Vereshaga, E. Ippoliti, T. H. Nguyen, P. Carloni, P. Pohl, Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9744–9749 (2012).
38. T. Nilsson, C. R. Lundin, G. Nordlund, P. Ädelroth, C. von Ballmoos, P. Brzezinski, Lipid-mediated Protein-protein Interactions Modulate Respiration-driven ATP Synthesis. *Sci. Rep.* **6**, 24113 (2016).

39. A. Toth, A. Meyrat, S. Stoldt, R. Santiago, D. Wenzel, S. Jakobs, C. von Ballmoos, M. Ott, Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 2412–2421 (2020).
40. M. Y. Yoshinaga, M. Y. Kellermann, D. L. Valentine, R. C. Valentine, Phospholipids and glycolipids mediate proton containment and circulation along the surface of energy-transducing membranes. *Prog. Lipid Res.* **64**, 1–15 (2016).
41. A. Mühleip, S. E. McComas, A. Amunts, Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin. *eLife*. **8** (2019), doi:10.7554/eLife.51179.
42. G. F. Azzone, T. Pozzan, E. Viola, P. Arslan, Proton electrochemical gradient and phosphate potential in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **501**, 317–329 (1978).
43. P. Mitchell, A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Lett.* **78**, 1–20 (1977).
44. B. Rieger, W. Junge, K. B. Busch, Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F₀F₁ ATP-synthase in folded mitochondrial membranes. *Nat. Commun.* **5**, 1–7 (2014).
45. A. Joly-Amado, R. G. P. Denis, J. Castel, A. Lacombe, C. Cansell, C. Rouch, N. Kassis, J. Dairou, P. D. Cani, R. Ventura-Clapier, A. Prola, M. Flamment, F. Fougelle, C. Magnan, S. Luquet, Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J.* **31**, 4276–4288 (2012).
46. M. D. Bruss, C. F. Khambatta, M. A. Ruby, I. Aggarwal, M. K. Hellerstein, Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E108-116 (2010).
47. G. Derumeaux, F. Ichinose, M. J. Raheer, J. G. Morgan, T. Coman, C. Lee, J. M. Cuesta, H. Thibault, K. D. Bloch, M. H. Picard, M. Scherrer-Crosbie, Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: a strain rate imaging study. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* **1**, 227–234 (2008).
48. V. Ferferieva, A. Van den Bergh, P. Claus, R. Jasaityte, A. La Gerche, F. Rademakers, P. Herijgers, J. D'hooge, Assessment of strain and strain rate by two-dimensional speckle tracking in mice: comparison with tissue Doppler echocardiography and conductance catheter measurements. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging.* **14**, 765–773 (2013).
49. J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
50. A. Mourier, B. Ruzzenente, T. Brandt, W. Kühlbrandt, N.-G. Larsson, Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2580–2592 (2014).

51. A. V. Kuznetsov, V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter, W. S. Kunz, Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **3**, 965–976 (2008).
52. I. Wittig, H.-P. Braun, H. Schägger, Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 418–428 (2006).
53. Kenneth P. Burnham and David R. Anderson, *Model Selection and Multimodel Inference - A Practical | Kenneth P. Burnham | Springer* (Springer-Verlag New York, New York, 2002; <http://www.springer.com/us/book/9780387953649>).
54. J. Blondelle, J.-P. Pais de Barros, F. Pilot-Storck, L. Tiret, in Skeletal muscle development (James Ryall, Springer., 2017; <http://www.springer.com/fr/book/9781493972821>), vol. 1668 of Methods in Molecular Biology, pp. 39–60.
55. M. Moulin, A. Solgadi, V. Veksler, A. Garnier, R. Ventura-Clapier, P. Chaminade, Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol. Sex Differ.* **6**, 20 (2015).
56. R. Mendez, S. Banerjee, Sonication-Based Basic Protocol for Liposome Synthesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **1609**, 255–260 (2017).
57. F. Caffin, A. Prola, J. Piquereau, M. Novotova, D. David, A. Garnier, D. Fortin, M. Alavi, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, F. Joubert, Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *J. Physiol.* **591**, 6017–6037 (2013).
58. J. Piquereau, F. Caffin, M. Novotova, A. Prola, A. Garnier, P. Mateo, D. Fortin, L. H. Huynh, V. Nicolas, M. V. Alavi, C. Brenner, R. Ventura-Clapier, V. Veksler, F. Joubert, Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc. Res.* **94**, 408–417 (2012).
59. G. L. Walmsley, S. Blot, K. Venner, C. Sewry, J. Laporte, J. Blondelle, I. Barthélémy, M. Maurer, N. Blanchard-Gutton, F. Pilot-Storck, L. Tiret, R. J. Piercy, Progressive Structural Defects in Canine Centronuclear Myopathy Indicate a Role for HACD1 in Maintaining Skeletal Muscle Membrane Systems. *Am. J. Pathol.* **187**, 441–456 (2017).

Figure 1 | Increased energy expenditure protects *Hacd1*-KO mice against high-fat diet-induced obesity.

(A) Spontaneous distance traveled per night by wild-type (WT) and *Hacd1*-KO mice. (B) Body weight evolution over life. (C) Body weight evolution of mice fed during 9 wk with high-fat diet (HFD), compared to age-matched mice fed with normal diet (ND). (D) Morphology of WT and *Hacd1*-KO mice after 9 wk of HFD. (E) Glycemia measured after fasting and assessed during 120 min after an intraperitoneal glucose injection at T₀ in mice fed during 9 wk with HFD. (F) Area under the glycemia curves displayed in (E). (G) Total body fat percentage (adiposity index) after 9 wk of ND or HFD, expressed as a percentage of the eviscerated body mass (lean body mass, LBM). (H) Feed efficiency during the 9-wk period of HFD (body weight, BW). (I) Circadian energy expenditure measured by indirect calorimetry under HFD; the active period of night is shaded. Mean hourly energy expenditure during the assessment period is represented as histogram. (J) Estimated basal metabolism during the assessment period of (I) during daylight and night. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values; \$\$\$ $P < 0.001$ versus respective ND values. Photo Credit for (D): Alexandre Prola, EnvA.

Figure 2 | Skeletal muscle of *Hacd1*-KO mice display increased oxidative activity.

(A) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), succinate dehydrogenase (SDH) and NADH dehydrogenase (NADH tetrazolium reductase reaction, NADH-TR) activity on *tibialis anterior* muscle sections. Note the decreased GPDH (glycolytic) and increased SDH and NADH-TR (oxidative) activity on *Hacd1*-KO mice sections. (B) Cytochrome *c* oxidase (COX or Complex IV) activity in superficial *gastrocnemius* and

soleus muscles. (C) Citrate synthase (CS) activity in superficial *gastrocnemius* and *soleus* muscles. (D-E) Representative immunoblots (D) and quantification (E) of citrate synthase (CS), ATP5A and VDAC normalized to β -actin in superficial *gastrocnemius* muscle. (F) Circadian fat oxidation under ND measured by indirect calorimetry; the active period of night is shaded. (G) Fat oxidation during the assessment period of (F) during daylight and night. (H) ^{14}C -labelled linoleic acid consumption rates in isolated *gastrocnemius* muscle. Scale bar in A: 200 μm . Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.

Figure 3 | Remodeled structure and lowered respiratory coupling of mitochondria leads to reduced ATP production in muscle of *Hacd1*-KO mice.

(A) Transmission electron microscopy of longitudinal sections of myofibers from the superficial *gastrocnemius* muscle. Images are from datasets taken at a low (x 2,500; left panel), intermediate (x 10,000; middle panel) and high (x 30,000; right panel) magnification. The Z-line is delimited by arrows. Cristae are regular tubular-shaped invaginations (white arrow heads) of the inner mitochondrial membrane, unambiguously identified on the same plane than the outer mitochondrial membrane (black arrow heads). Excessive dilation of cristae tips (asterisk) is frequently observed in *Hacd1*-KO myofibers. (B and C) Morphometric quantification of mitochondria containing cristae with excessively dilated tips (maximal diameter >15nm, in percentage) (B) and the mean of the maximal diameter of cristae (C). (D) Oxidation rate of freshly isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle in the presence of pyruvate plus ADP (Phosphorylating), oligomycin (Non-phosphorylating) and FCCP (Uncoupled). (E) Mitochondrial coupling ratio for pyruvate (Respiratory Control Ratio

(RCR; State 3/State 4)) of isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. (F) ATP production measured on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. (G) ATP/O ratio calculated from simultaneous recording of O₂ consumption and ATP production on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. (H) ATP content after submaximal exercise on treadmill in *tibialis anterior* muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice, set to 1.0. (I-J) Representative immunoblots (I) and quantification (J) of phospho-AMPK and AMPK in *tibialis anterior* muscle after submaximal exercise on treadmill. (K) Blood lactate concentration (lactatemia) before (at rest) and after (exercised) a submaximal exercise on treadmill. Scale bars in A: 100 nm. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values; \$\$\$ $P < 0.001$ versus respective at rest values.

Figure 4 | Cardiolipin deficit in muscle mitochondria of *Hacd1*-KO mice is responsible for reduced mitochondrial coupling.

(A) Total cardiolipin content of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle, normalized to the mitochondrial protein content. (B) Heatmap of individually identified cardiolipin species in mitochondria isolated from *tibialis anterior* muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice. Colors show row Z scores. (C) Diagram depicting the experimental steps allowing to enrich mitochondrial membranes with phospholipids. (D) ATP/O ratio calculated from simultaneous recording of O₂ consumption and ATP production of native, cardiolipin-enriched (+CL) and phosphatidylcholine-enriched (+PC) mitochondria isolated from *tibialis anterior* muscle of WT and *Hacd1*-KO mice. error bars: \pm s.e.m.; * $P < 0.05$ versus WT, \$ = $P \leq 0.05$ and \$\$ = $P \leq 0.01$ versus Native, ££ = $P \leq 0.01$ versus +CL.

Acknowledgments: The authors are grateful to Camille Laisne and Diana Gelperowic for taking care of mice; Jean-Paul Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; Christine Longin and Martine Letheule for electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); Garance Delahaye, Marie-Perle Sellier and Camille Poncet for technical help; Renée Ventura-Clapier for insightful discussions; Gemma Walmsley for the edition of an interim version of the manuscript. We acknowledge the technical platform of metabolism of the Unit “Biologie Fonctionnelle et Adaptative” (University de Paris, BFA, UMR 8251 CNRS, Paris, France) for metabolic analysis and the animal core facility “Buffon” of the Université de Paris - Institut Jacques Monod for animal husbandry and the Plateau Technique d’IMagerie Spectroscopique (PIMS) which is a part of DImaCell platform (Université de Bourgogne – INRAE, Dijon, France). **Funding:** N.Ka.’s PhD fellowship has been financially supported by the French “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). The work was primarily supported by the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-12-JSV1-0005) and the “Association Française contre les Myopathies” (AFM #16143 and Translamuscle #19507). **Author contributions:** Conceptualization, A.P., J.B. and F.P-S; Methodology, A.P., S.G., A.S., N.Ko., G.D., M-F.G., F.J., S.L. and F.P-S; Formal Analysis, A.P., J.B., A.V., J.P., R.D., S.G., A.M., M.M., C.H., N.Ka., C.G., T.M., G.C., L.G., M.G., A.S., J.C., J.T., J.D., A.M., G.D. and F.P-S; Data Curation, A.P., J.B., J.P., R.D., S.G., H.C., A.M., C.H., A.S., F.D., J.D., A.M., N.Ko., G.D., M-F.G., V.V., S.L. and F.P-S; Figures Conception, A.P., J.B., R.D., H.C., A.M., L.T. and F.P-S; Writing – Original Draft, A.P., L.T. and F.P-S; Review & Editing, all authors; Funding Acquisition, F.R., L.T. and F.P-S; Resources, J.P., R.D., S.G., H.C., A.M., J.D., A.M., N.Ko., M-F.G., F.J., V.V., S.L., F.R., L.T. and F.P-S; Supervision, A.P., F.R., L.T. and

F.P-S. Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Data materials and availability: All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from Fanny Pilot-Storck (fanny.storck@vet-alfort.fr).

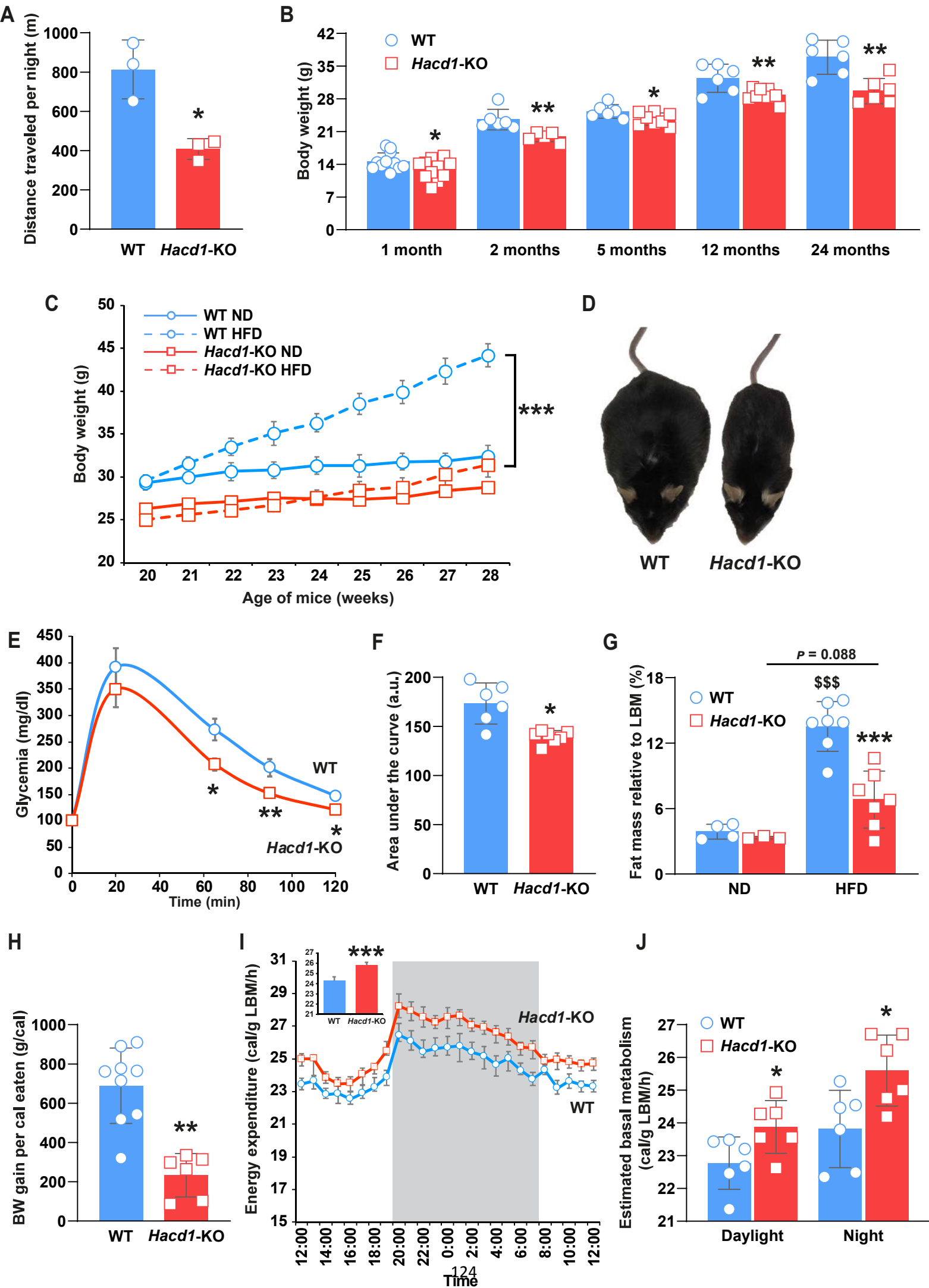
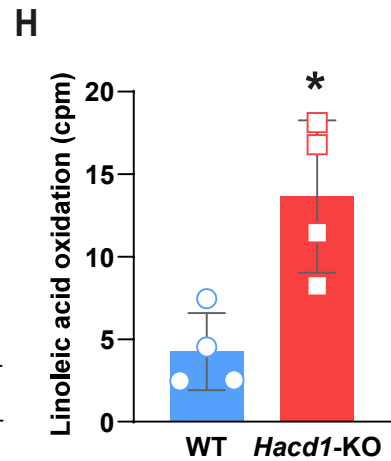
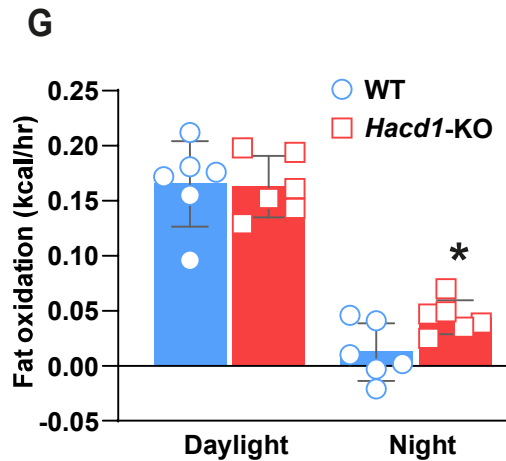
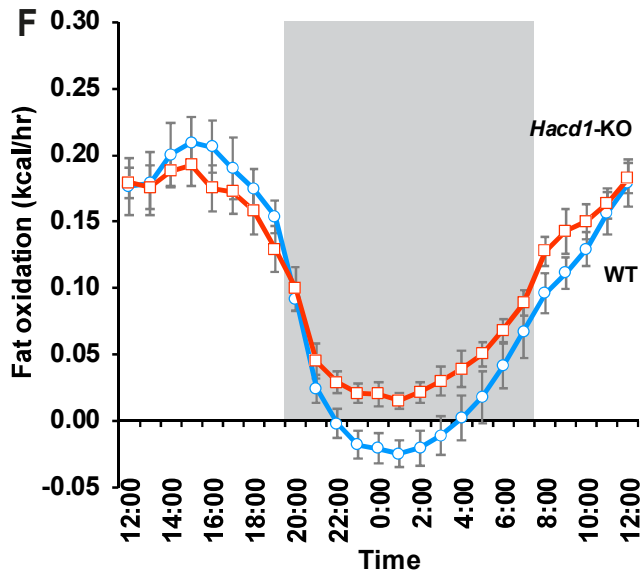
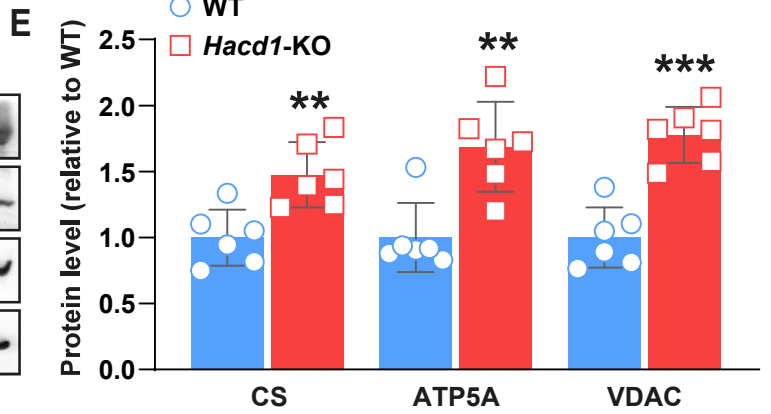
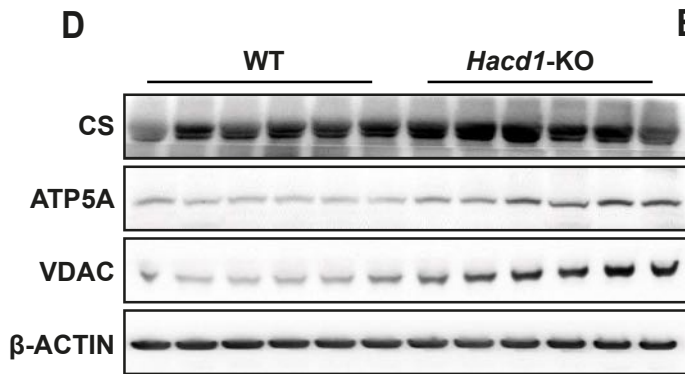
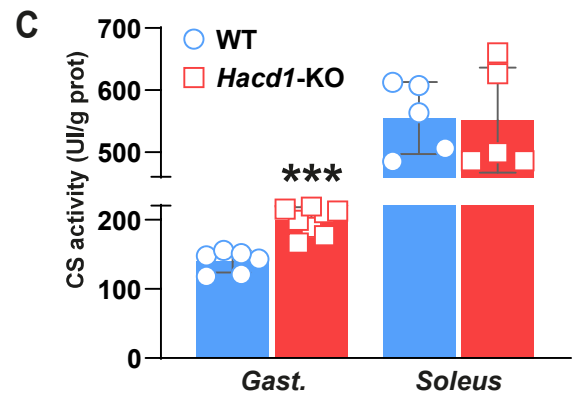
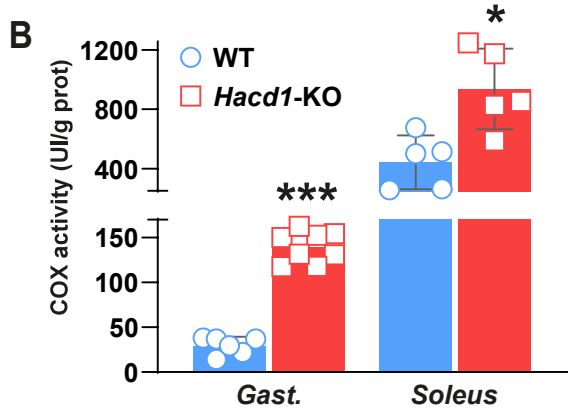
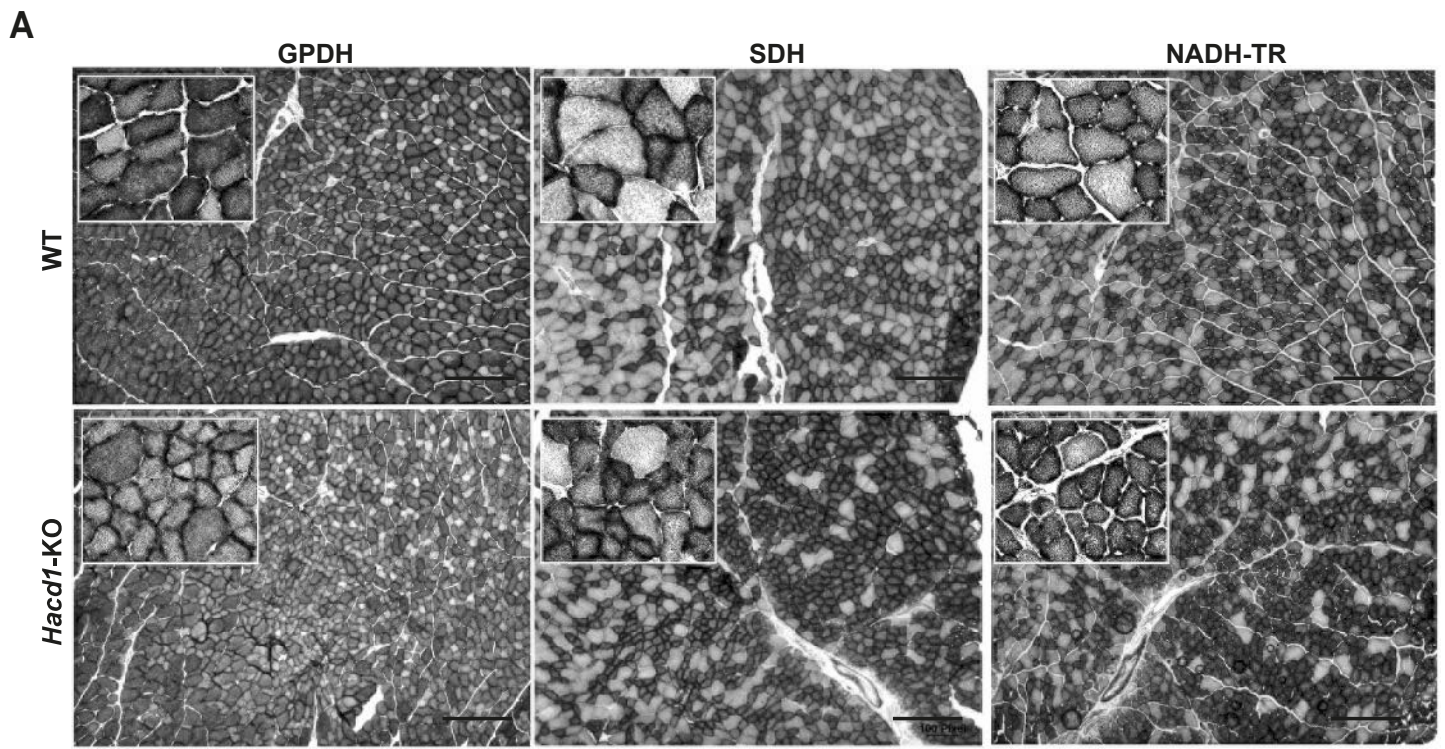


Figure 1 Prola



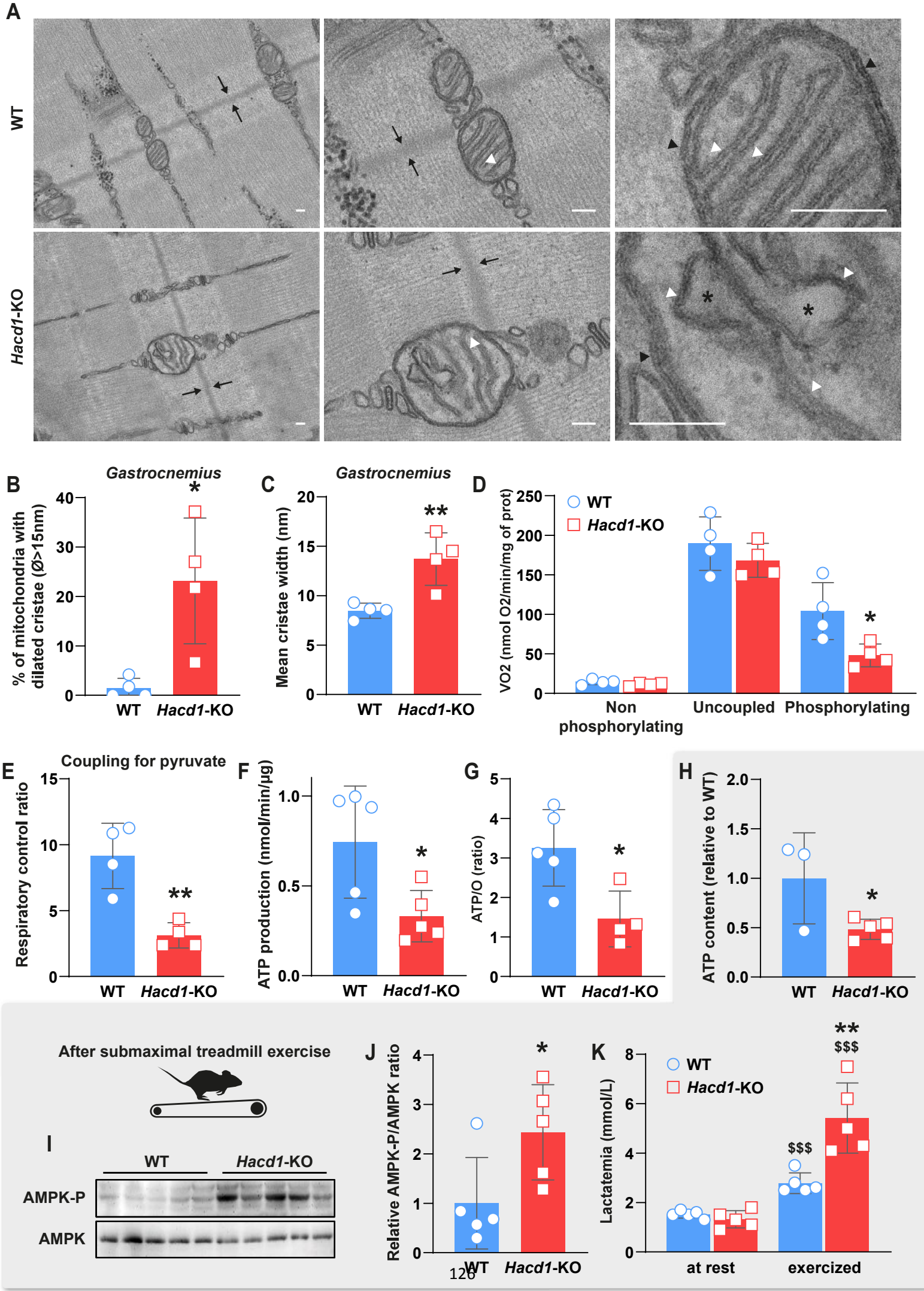


Figure 3 Prola

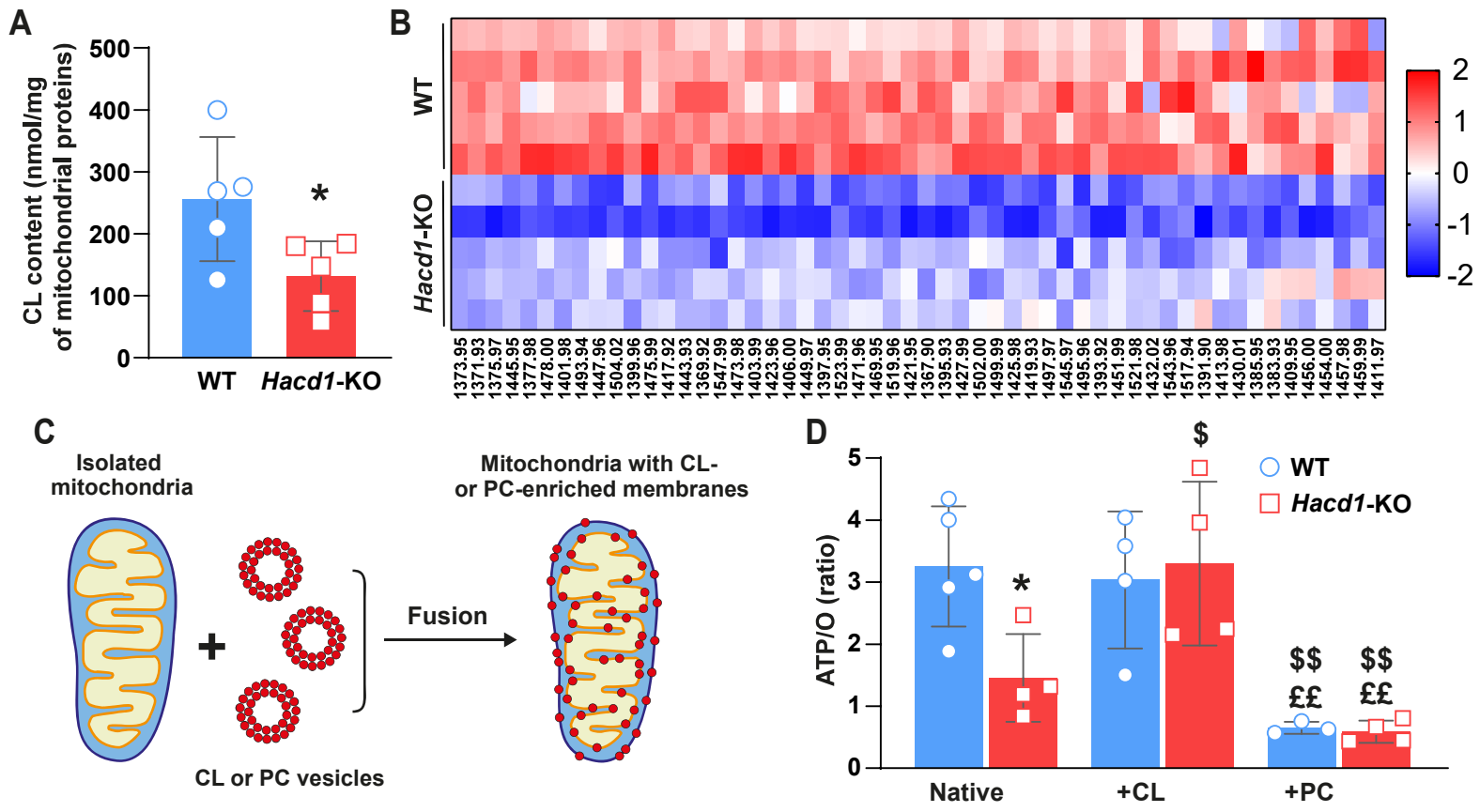


Table S1: Anatomical parameters of WT and *Hacd1*-KO mice after normal or high fat diet.
Related to Figures 1 and S1.

	WT ND	<i>Hacd1</i> -KO ND	WT HFD	<i>Hacd1</i> -KO HFD
Eviscerated BW (g)	29.9 ± 1.4	26.3 ± 1.5	33.1 ± 2.1	25.8 ± 1.3 *
Initial BW (g)	29.3 ± 0.9	26.3 ± 0.5 **	29.6 ± 0.6	25.4 ± 0.7 ***
Final BW (g)	32.4 ± 1.2	28.8 ± 0.4 **	44.2 ± 1.3 \$\$\$	31.4 ± 1.4 ***
BW gain (g)	3.1 ± 0.6	2.5 ± 0.3	14.6 ± 1.0 \$\$\$	6.3 ± 1.0 ***\$
BW gain (%)	10.4 ± 1.8	9.7 ± 1.1	49.5 ± 3.2 \$\$\$	25.3 ± 3.9 ***\$\$
Tibial length (cm)	1.78 ± 0.03	1.80 ± 0.04	1.74 ± 0.02	1.74 ± 0.02
Heart weight (mg)	130.3 ± 4.9	120.1 ± 3.6	153.7 ± 7.6 \$	130.7 ± 13.5 **
Lung weight (mg)	185.8 ± 16.4	164.9 ± 11.6	273.3 ± 27.9	221.2 ± 9.9
Liver weight (mg)	1633.7 ± 85.1	1309.6 ± 39.0	1698.5 ± 118.2	1132.7 ± 103.1 \$
Kidney weight (mg)	214.9 ± 11.2	185.9 ± 7.2	203.8 ± 5.8	205.2 ± 3.9
<i>Tibial anterior</i> (mg)	46.1 ± 1.3	37.5 ± 0.9 **	47.9 ± 1.8	40.8 ± 1.3 ***
Gonadal fat pad (mg)	416 ± 82	279 ± 90	2182 ± 244 \$\$\$	1079 ± 244 **\$
Retroperitoneal fat pad (mg)	157.2 ± 47.3	94.3 ± 16.5	927.8 ± 83.0 \$\$\$	353.3 ± 91.2 ***
Mesenteric fat pad (mg)	567.2 ± 27.5	504.0 ± 42.9	942.7 ± 121.2 \$\$	452.0 ± 102.7 **
BAT weight (mg)	133.9 ± 16.9	79.3 ± 5.8 **	283.2 ± 26.2 \$\$\$	174.1 ± 26.9 \$\$\$**
HW/BW	4.21 ± 0.11	4.83 ± 0.14 *	3.52 ± 0.15 \$	3.96 ± 0.22 \$\$
Lung /BW	5.98 ± 0.44	6.61 ± 0.43	6.24 ± 0.49	6.66 ± 0.27
Liver/BW	52.63 ± 1.39	52.53 ± 0.82	38.57 ± 2.06 \$	33.45 ± 1.76 \$
Kidney/BW	6.92 ± 0.13	7.46 ± 0.26	4.70 ± 0.21 \$	6.24 ± 0.33
TA/BW	1.75 ± 0.03	1.52 ± 0.04 **	1.11 ± 0.02 \$\$\$	1.23 ± 0.00 \$\$\$
Gonadal fat pad/BW	11.85 ± 2.03	9.13 ± 0.72	53.31 ± 5.04 \$\$\$	34.26 ± 5.87 *\$
Retroperitoneal fat pad/BW	4.44 ± 1.23	3.01 ± 0.37	22.81 ± 1.34 \$\$\$	11.13 ± 2.31 ***\$\$\$
Mesenteric fat pad/BW	16.37 ± 0.59	16.27 ± 0.37	23.13 ± 1.94 \$	14.31 ± 2.35 *
BAT/BW	4.25 ± 0.40	3.18 ± 0.21 *	6.43 ± 0.50 \$\$	5.05 ± 0.57 \$\$*

Table S2: Echocardiographic parameters of WT and *Hacd1*-KO mice.
Related to Figures 2 and S2.

	WT	<i>Hacd1</i>-KO
EF(%)	81.2 ± 2.3	83 ± 2.2
FS (%)	44.8 ± 2.5	46.7 ± 2.7
HR (bpm)	631 ± 9	624 ± 17
LVd (mm)	2.73 ± 0.11	2.88 ± 0.05
LVs (mm)	1.51 ± 0.10	1.54 ± 0.10
IVSd (mm)	0.83 ± 0.04	0.78 ± 0.03
IVSs (mm)	1.43 ± 0.05	1.44 ± 0.05
PWd (mm)	0.82 ± 0.03	0.80 ± 0.04
PWs (mm)	1.36 ± 0.07	1.48 ± 0.05
Strain rate ant (unit/s)	25.64 ± 1.40	23.25 ± 1.33
Strain rate post (unit/s)	25.91 ± 1.60	23.75 ± 1.08

Table S2 Prola

Table S3: Proteomic dataset and Panther analysis.
Related to Figure S2.

See Table S3 Excel File .

Table S4: Mitochondrial respiration rates.
Related to Figures 3 and S3.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in WT or *Hacd1*-KO mice superficial *gastrocnemius* and *soleus* permeabilized muscle fibers.

	WT <i>Gast.</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Gast.</i> (6)	<i>P</i>
Vo	2.16 ± 0.29	4.10 ± 0.45	0.003
Complex I	11.06 ± 0.89	9.37 ± 1.03	0.235
Complex I+II	16.11 ± 1.56	12.26 ± 1.42	0.089
Complex II	5.71 ± 0.54	3.45 ± 0.44	0.006
Ratio CxII/CxI	0.52 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.020
ACR (Complex I/Vo)	5.73 ± 0.94	2.71 ± 0.68	0.007
	WT <i>Soleus</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Soleus</i> (6)	<i>P</i>
Vo	4.21 ± 0.49	7.92 ± 0.55	<0.001
Complex I	19.72 ± 2.31	16.05 ± 1.39	0.263
Complex I+II	25.07 ± 2.78	23.46 ± 2.28	0.652
Complex II	13.78 ± 2.93	15.37 ± 1.62	0.534
Ratio CxII/CxI	0.68 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.878
ACR (Complex I/Vo)	4.83 ± 0.35	3.05 ± 0.28	<0.001
	WT <i>Heart</i> (4)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Heart</i> (4)	<i>P</i>
Vo	5.40 ± 0.30	5.62 ± 0.32	0.611
Complex I	27.25 ± 1.28	29.67 ± 1.83	0.299
Complex I+II	37.34 ± 2.76	44.59 ± 3.80	0.207
ACR (Complex I/Vo)	5.22 ± 0.42	5.39 ± 0.38	0.782

Mitochondrial substrate utilization in WT or *Hacd1*-KO mice superficial *gastrocnemius* and *soleus* permeabilized muscle fibers.

	WT <i>Gast.</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Gast.</i> (6)	<i>P</i>
Vo	0.97 ± 0.16	2.07 ± 0.14	<0.001
Palmitoyl-CoA	2.27 ± 0.30	3.06 ± 0.35	0.043
+ octanoate	2.29 ± 0.36	3.10 ± 0.30	0.026
+ pyruvate	7.37 ± 0.52	7.49 ± 0.36	0.851
+ Glutamate/Succinate	10.27 ± 0.98	11.18 ± 0.62	0.425
ACR (PCoA/Vo)	3.07 ± 0.61	1.52 ± 0.16	0.003
% fatty acids	27.33 ± 4.81	28.33 ± 2.47	0.845
% pyruvate	59.03 ± 5.06	67.90 ± 2.67	0.112
% PCoA/Octanoate	97.52 ± 6.21	97.71 ± 1.76	0.975
	WT <i>Soleus</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Soleus</i> (6)	<i>P</i>
Vo	3.32 ± 0.81	6.04 ± 0.50	<0.001
Palmitoyl-CoA	12.83 ± 1.13	15.79 ± 1.03	0.049
+ octanoate	14.65 ± 0.75	17.89 ± 0.89	0.011
+ pyruvate	18.88 ± 1.17	20.44 ± 1.82	0.583
+ Glutamate/Succinate	24.14 ± 1.54	25.14 ± 1.90	0.931
ACR (PCoA/Vo)	3.85 ± 0.22	2.77 ± 0.26	0.004
% fatty acids	61.96 ± 3.50	72.69 ± 2.76	0.025
% pyruvate	78.48 ± 2.14	81.01 ± 2.12	0.583
% PCoA/Octanoate	86.03 ± 4.72	89.22 ± 5.93	0.678

Mitochondrial respiration rates in isolated mitochondria from WT or *Hacd1*-KO mice TA.

	WT (4)	<i>Hacd1</i>-KO (4)	<i>P</i>
Phosphorylating (State 3)	101.55 ± 19.72	48.03 ± 7.20	0.044
State 4	10.90 ± 0.87	12.75 ± 2.01	0.432
RCR	9.14 ± 1.24	3.12 ± 0.48	0.004
Non-phosphorylating	14.34 ± 1.70	11.25 ± 1.04	0.172
Uncoupled	189.42 ± 16.95	160.78 ± 16.48	0.153
Cyt-C stimulation (%)	7.80 ± 3.80	8.57 ± 3.98	0.667
VO₂ (for ATP/O determination)	129.87 ± 6.80	96.62 ± 10.57	0.038
ATP production (for ATP/O determination)	2.02 ± 0.24	0.89 ± 0.22	0.011

Table S5: Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH.
Related to Figure S6.

Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay from the analyses of mtIM.

	<i>Dependent variable:</i>			
	Experimental response (event count/ns)			
	A	B1	B2	C
θ_1	0.455*** (0.153)	0.505*** (0.153)		
B_1	0.025*** (0.001)		0.025*** (0.001)	
θ_2	-2.852*** (0.242)	-2.631*** (0.257)		
B_2	0.0002* (0.0001)		0.0001* (0.0001)	
θ_3	-0.697*** (0.087)	-0.667*** (0.094)		
B_3	0.016*** (0.001)		0.016*** (0.001)	
B_1 (inter.)		0.029*** (0.002)		0.029*** (0.002)
B_1 (WT)		-0.007*** (0.002)		-0.007*** (0.002)
B_2 (inter.)		0.001*** (0.0002)		0.0005*** (0.0002)
B_2 (WT)		-0.0004 (0.0003)		-0.0004 (0.0003)
B_3 (inter.)		0.018*** (0.001)		0.018*** (0.001)
B_3 (WT)		-0.002 (0.002)		-0.002 (0.002)
θ_1 (inter.)			0.752*** (0.160)	0.846*** (0.172)
θ_1 (WT)			-0.647*** (0.226)	-0.708*** (0.243)
θ_2 (inter.)			-2.629*** (0.316)	-2.432*** (0.336)
θ_2 (WT)			-0.509 (0.448)	-0.549 (0.476)
θ_3 (inter.)			-0.727*** (0.121)	-0.692*** (0.126)
θ_3 (WT)			0.040 (0.171)	0.028 (0.178)
Obs.	57,344	57,344	57,344	57,344
Log Likelihood	-136,223.600	-136,134.000	-136,268.900	-136,157.800
Akaike Inf. Crit.	272,475.300	272,301.900	272,571.900	272,355.600
Bayesian Inf. Crit.	272,600.700	272,454.200	272,724.100	272,534.800

Table S6: Sequence of qPCR primers used in this study.
Related to Materials and methods.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Acadm</i>	CCGTTCCCTCTCATCAAAG	ACACCCATACGCCAACTCTT
<i>Acadvl</i>	TGGGCCTCTCTAATACCCAGT	TCCCAGGGTAACGCTAACAC
<i>Cd36</i>	CCACTGTGTACAGACAGTTTTGG	GCTCAAAGATGGCTCCATTG
<i>Catalase</i>	CCTCGTTCAGGATGTGGTTT	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
<i>Coxl</i>	CACTAATAATCGGAGCCCCA	TTCATCCTGTTCTGCTCCT
<i>Cpt1</i>	TCACCTGGGCTACACGGAGA	TCGGGGCTGGTCTACACTT
<i>Cpt2</i>	ACCTGCTCGCTCAGGATAAA	AAACGACAGAGTCTCGAGCAG
<i>Fas</i>	GCAAGTGCAGCCTGAGGGAC	ACAGCCTGGGGTCATCTTTGC
<i>Gpx1</i>	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC	TCACTTCGCACTTCTCAAACA
<i>Hadha</i>	GCTTGGGAGGAGGACTTGA	AGCAACACTTCAGGGACACC
<i>Nrf1</i>	TTACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCGTCTCT
<i>Pex11a</i>	TCAAGAGGCTGGAGACCAGT	CGGTTGAGGTTGGCTAATGT
<i>Pex19</i>	TGTACCCATCCCTGAAGGAG	TGTGCTGCTGCTGGTACTTC
<i>Polr2a</i>	CAACATGCTGACAGATATGACC	TGATGATCTTCTTCTTGTGTCTG
<i>Ppara</i>	AAGTGCCTGTCTGTCTGGGAT	GCTTCGTGGATTCTCTTGCC
<i>Ppard</i>	GGGGACCAGAACACACGCTT	CCGCACACCCGACATTCCAT
<i>Ppargc1a</i>	CACCAAACCCACAGAGAACAG	GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA
<i>Ppargc1b</i>	TGGAAAGCCCTGTGAGAGT	TTGTATGGAGGTGTGGTGGG
<i>Rpl32</i>	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTACTCTGATGG
<i>Rplpo</i>	GCGACCTGGAAGTCCAATA	TTGTCTGCTCCCACAATGAA
<i>Sod2</i>	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG	GTAGTAAGCGTGCTCCCACA
<i>Scd1</i>	CTACATGACCAGCGCTCTG	CGTACACGTCATTCTGGAACG
<i>Scd2</i>	GTAATCAGCGCCCTGGGCAT	CATACACGTCATTCTGGAACGC
<i>Srebp-1c</i>	CTGGAGACATCGCAAACAAGCTG	TGAGGTTCCAAAGCAGACTGCAG
<i>Tfam</i>	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Ucp1</i>	AGGGAGAGAAACACCTGCC	GCATTCTGACCTTCACGACC
<i>Ucp2</i>	CAGATGTGGTAAAGTCCGC	CAGAAGTGAAGTGGCAAGGG
<i>Ucp3</i>	ATGGTTGGACTTCAGCCCTC	TGGGGGTGTAGAACTGCTTG

Table S7: Key resources table.
Related to Materials and methods.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-AMPK	Cell signaling	2532
Rabbit anti-phospho-AMPK	Cell signaling	2535
Rabbit anti-Citrate Synthase	Cell signaling	14309
Rabbit anti-UCP3	Abcam	ab10985
Mouse anti-ATP5A	Abcam	ab110413
Rabbit anti-VDAC	Custom	N/A
Mouse anti-β-actin	Santa Cruz	47778
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Sodium pyruvate	Sigma	P2256
Palmitoyl coenzyme A lithium salt	Sigma	P9716
L-Carnitine inner salt	Sigma	C0158
L-Glutamic acid potassium salt monohydrate	Sigma	G1501
L-(-)-Malic acid	Sigma	M6413
Sodium succinate dibasic	Sigma	14160
Adenosine 5'-diphosphate monopotassium salt dihydrate	Sigma	A5285
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Sigma	A3377
β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate	Sigma	N8129
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)	Sigma	C2910
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	Sigma	T3134
(+)-Sodium L-ascorbate	Sigma	A7631
Magnesium chloride solution	Sigma	63069
Sodium azide	Sigma	S2002
Cytochrome c from equine heart	Sigma	C2506
Oligomycin from Streptomyces diastatochromogenes	Sigma	O4876
Digitonin	Sigma	D141
Saponin	Sigma	84510
Acetyl coenzyme A lithium salt	Sigma	A2181
Oxaloacetic acid	Sigma	O4126
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	Sigma	D8130
Trizma® base	Sigma	T1503
Potassium hexacyanoferrate(III)	Sigma	P3667
Bovine Serum Albumin	Sigma	A7030
D-(+)-Glucose	Sigma	G7021
Sodium dithionite	Sigma	1.06507
Dibasic potassium phosphate	Sigma	1551128
Potassium phosphate monobasic	Sigma	P5655
Sodium bicarbonate	Sigma	S5761
TRI Reagent®	Sigma	T9424
Nitrotetrazolium Blue chloride	Sigma	N6876
Menadione	Sigma	M5625
rac-Glycerol 1-phosphate disodium salt hydrate	Sigma	G2138
Glycerol	Sigma	G7757
Calcium chloride dihydrate	Sigma	C3881
Hepes sodium salt	Sigma	H7006
MOPS	Sigma	M1254
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Sigma	03777
Hematoxylin Solution, Mayer's	Millipore	109249
Oil Red O	Sigma	O0625
Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 17-well	Thermo Fisher Scientific	NW04127BOX
TMA-DPH (N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate)	Sigma	T0775
cis-Aconitic acid	Sigma	A3412
Triton™ X-100	Sigma	T9284
Sodium pyrophosphate dibasic	Sigma	P8135
Acetoacetyl coenzyme A sodium salt hydrate	Sigma	A1625
Fluorescent mounting medium containing chromatin stain DAPI	Vectashield®	H-1200
Sodium cyanide	Sigma	431591
Rhodamine 123	Sigma	R8004

Perchloric acid	Sigma	311421
Cardiolipin from bovine heart	Sigma	C0563
TopFluor® Cardiolipin	Sigma	810286C
Egg PC	Sigma	131601C
Texas Red™ DHPE	Thermofischer	T1395MP
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375-100G
Potassium Acetate	Sigma-Aldrich	P1190-500G
6-Aminocaproic acid	Sigma-Aldrich	A7824-25G
EDTA disodic	euromedex	EU0007-B
Glycerol	VWR	24388.295
Invitrogen™ Novex™ NativePAGE™ 3-12%% Bis-Tris Protein Gels, 1.0mm, 10 well	Fisher Scientific	10064012
Digitonin	Merck	300410-5GM
D-(+)-Sucrose, ultrapure DNase RNase free	VWR	0335-500g
Tris-Base	Euromedex	200923-A
EGTA	Sigma-Aldrich	E3889-100G
Potassium chloride	Alfa Aesar	11595-A1
Magnesium Chloride, HexaHydrate	Euromedex	2189-B
KH2PO4 Potassium phosphate, monobasic, anhydrous	Euromedex	2018-A
Iodonitrotetrazolium	Sigma-Aldrich	I8377-1G
Diaminobenzidine	Sigma-Aldrich	32750-5G-F
Cytochrome c from bovine heart	Sigma-Aldrich	C2037-500MG
Critical Commercial Assays		
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche	11699695001
Pierce BCA	Thermo Fisher Scientific	23225
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34095
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific	K1641
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial	Thermo Fisher Scientific	K0252
Rat/Mouse Insulin ELISA	Millipore	EZRMI-13K
Deposited Data		
Raw and analyzed data	This paper	github.com/hchauvin/prola2019
Uniprot Mus Musculus database	Uniprot	uniprot.org
GenBank sequence database	NIH	ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: <i>Hacd1</i> -KO mice in the C57BL/6N genetic background	Home-made	ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160855
Oligonucleotides		
Primers, see Table S6	This paper	N/A
Software and Algorithms		
ImageJ	NIH	fiji.sc
SigmaStat 3.0	Systat Software	systatsoftware.com
GraphPad	GraphPad Software	graphpad.com/company/
Algorithms for TMA-DPH decay analysis	This paper	github.com/ProlaLab/Prola2020.Sci.Adv
PANTHER Classification system	GENEONTOLOGY	http://pantherdb.org/
XTandem Pipeline	The Global Proteome Machine Organization	http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline

Supplemental Listing S1 | Final non-linear mixed effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH on mitoplasts and whole mitochondria.
Related to Figure S6. *(in the R statistical language).*

```
1 library(nlme)
2
3 # Shared coefficients between Hacd1-KO and WT
4 model_A <- nlme(
5   Decay ~ ...,
6   fixed = theta1 + B1 + theta2 + B2 + theta3 + B3 ~ 1,
7   random = list(
8     File = pdDiag(B1 + B2 + B3 + theta1 + theta2 + theta3 ~ 1)
9   ),
10  weights = varConstPower(fixed = c(power = 0.5), const = 1, form = ~ fitted(.))
11 )
12
13 # Only Bs (resolving to mixing proportions) allowed to be different
14 # in Hacd1-KO and WT populations
15 model_B1 <- update(
16   model_A,
17   fixed = list(
18     theta1 + theta2 + theta3 ~ 1,
19     B1 + B2 + B3 ~ Population
20   )
21 )
22
23 # Only thetas (resolving to characteristic times) allowed to be different
24 model_B2 <- update(
25   model_A,
26   fixed = list(
27     theta1 + theta2 + theta3 ~ Population,
28     B1 + B2 + B3 ~ 1
29   )
30 )
31
32 # All coefficients allowed to be different
33 model_C <- update(
34   model_A,
35   fixed = theta1 + B1 + theta2 + B2 + theta3 + B3 ~ Population
36 )
```

Listing S1 Prola

Supplemental Table S1 | Anatomical parameters of WT and *Hacd1*-KO mice after normal or high-fat diet. Related to Figures 1 and S1.

Anatomical parameters measured after 9 wk of normal (ND) or high-fat diet (HFD). BW: body weight; initial and final: before and after the 9-wk period of ND or HFD, respectively; BW gain: difference between final and initial body weight; HW: heart weight; TA: *tibialis anterior* mass; GWAT, RWAT and MWAT: gonadal, retroperitoneal and mesenteric white adipose tissue weight, respectively; BAT: brown adipose tissue weight. Results are represented as mean \pm s.e.m.. $n = 9$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus respective WT values. \$ $P < 0.05$; \$\$ $P < 0.01$; \$\$\$ $P < 0.001$ versus respective ND values.

Supplemental Table S2 | Echocardiographic parameters of WT and *Hacd1*-KO mice. Related to Figures 2 and S2.

Cardiac function of mice fed with normal diet was analyzed by echocardiography. EF: Ejection Fraction; FS: Fractional shortening; HR: Heart rate; LVd, LVs: Left Ventricle diameter in diastole and systole, respectively; IVSd, IVSs: interventricular septum thickness in diastole and systole, respectively; PWd, PWs: posterior wall thickness in diastole and systole, respectively. Strain rate was measured in unit/s (ant.) and (post.). Results are represented as mean \pm s.e.m.. $n = 8$ per group.

Supplemental Table S3 | Proteomic dataset and Panther analysis. Related to Figure S2.

Supplemental Table S4 | Mitochondrial respiration rates. Related to Figures 3 and S3.

Complex activity and substrate utilization unit is $\mu\text{molO}_2/\text{min/g}$ of dry mass of fibers or per g of protein for isolated mitochondria. Respiration rates in the presence of saturating pyruvate and ADP (Phosphorylating, State 3) and after complete ADP consumption (State 4). RCR: Respiratory Control Ratio. Respiration rates in the presence of oligomycin (Non-phosphorylating) and FCCP (Uncoupled). At the end of the experiment, cytochrome *c* was added to the medium (Cyt-C stimulation) to check that the stimulation of respiration did not exceed 10%, confirming the integrity of the outer mitochondrial membrane. Simultaneous measurement of respiration rates and ATP production in the presence of saturating pyruvate and ADP (State 3) for ATP/O determination. Values are given as mean \pm s.e.m.. Number in parentheses is the number of analyzed animals. Value for each animal was the mean of 1-3 independent analyses. For statistical analysis, unpaired t-test was used. ACR: Acceptor Control Ratio.

Supplemental Table S5 | Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH. Related to Figure S6.

Values are given as fixed effects \pm s.e for the variables defined in models A, B1, B2 and C (see *Materials and Methods*). More specifically, B_1 , B_2 and B_3 are scale coefficients for the three exponentials and θ_1 , θ_1 and θ_1 are monotonous parametrizations of characteristic times. For models B1, B2 and C, the variables are

regressed against the mice phenotype (WT or *Hacd1*-KO). The contrast matrix for this regression is given in the *Materials and Methods*. $P < 0.1$; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

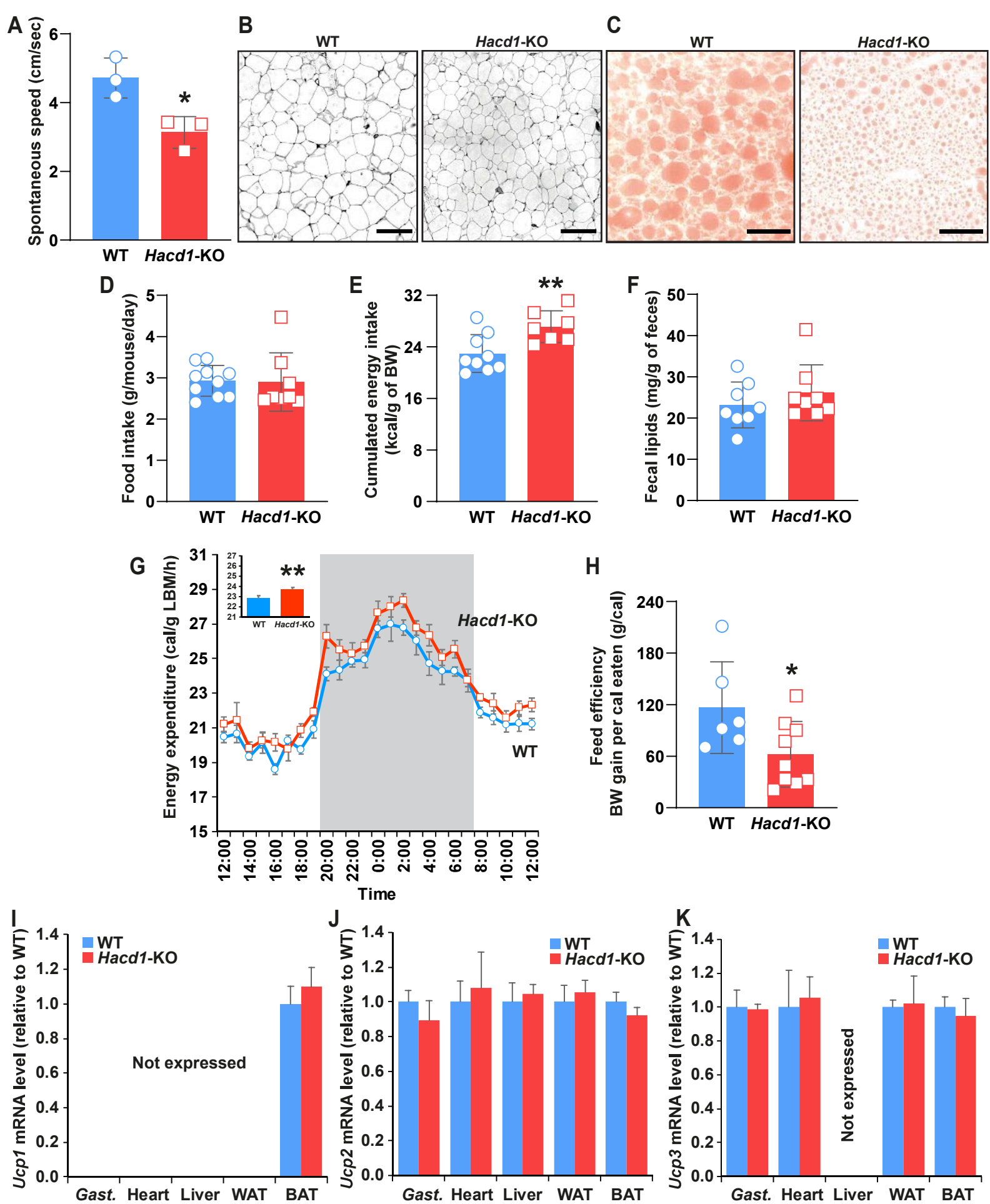
Supplemental Table S6 | Sequence of qPCR primers used in this study. Related to Materials and methods.

Supplemental Table S7 | Key resources table. Related to Materials and methods.

Supplemental Listing S1 | Final non-linear mixed effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH on mitoplasts and whole mitochondria. Related to Figure S6.

Specifics, given in the *R statistical language* for the **nlme** library, of the non-linear mixed effects models A, B1, B2 and C.

All the code is made available at github.com/ProlaLab/Prola2020.Sci.Adv with the appropriate tests and reproducible workflow (in addition, the releases are archived at DOI 10.5281/zenodo.1228112). The raw data is available upon request at DOI 10.5281/zenodo.4046133.



Supplemental Figure 1 | Metabolic parameters associated with protection against high-fat diet-induced obesity in *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 1.

(A) Mean speed of spontaneous nocturnal locomotor activity. **(B)** Hematoxylin & Eosin-stained transverse sections of gonadal fat pads after 9 wk of high-fat diet (HFD), highlighting the contour of adipocytes. **(C)** Oil-Red-O-stained transverse sections of liver after 9 wk of HFD. **(D)** Mean daily food intake during the 9-wk period of HFD per mouse. **(E)** Cumulated energy intake during the 9-wk period of HFD. **(F)** Fecal lipid excretion after 8 wk of HFD. **(G)** Circadian energy expenditure measured by indirect calorimetry under normal diet (ND); the active period of night is shaded. Mean hourly energy expenditure during the assessment period is represented as histogram. **(H)** Feed efficiency during the 9-wk assessment period of ND. **(I-K)** *Ucp1* **(I)**, *Ucp2* **(J)** and *Ucp3* **(K)** mRNA expression normalized by geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle (*Gast.*), heart, liver, gonadal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice set to 1.0. Scale bars represent 50 μm in **B** and **C**. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values.

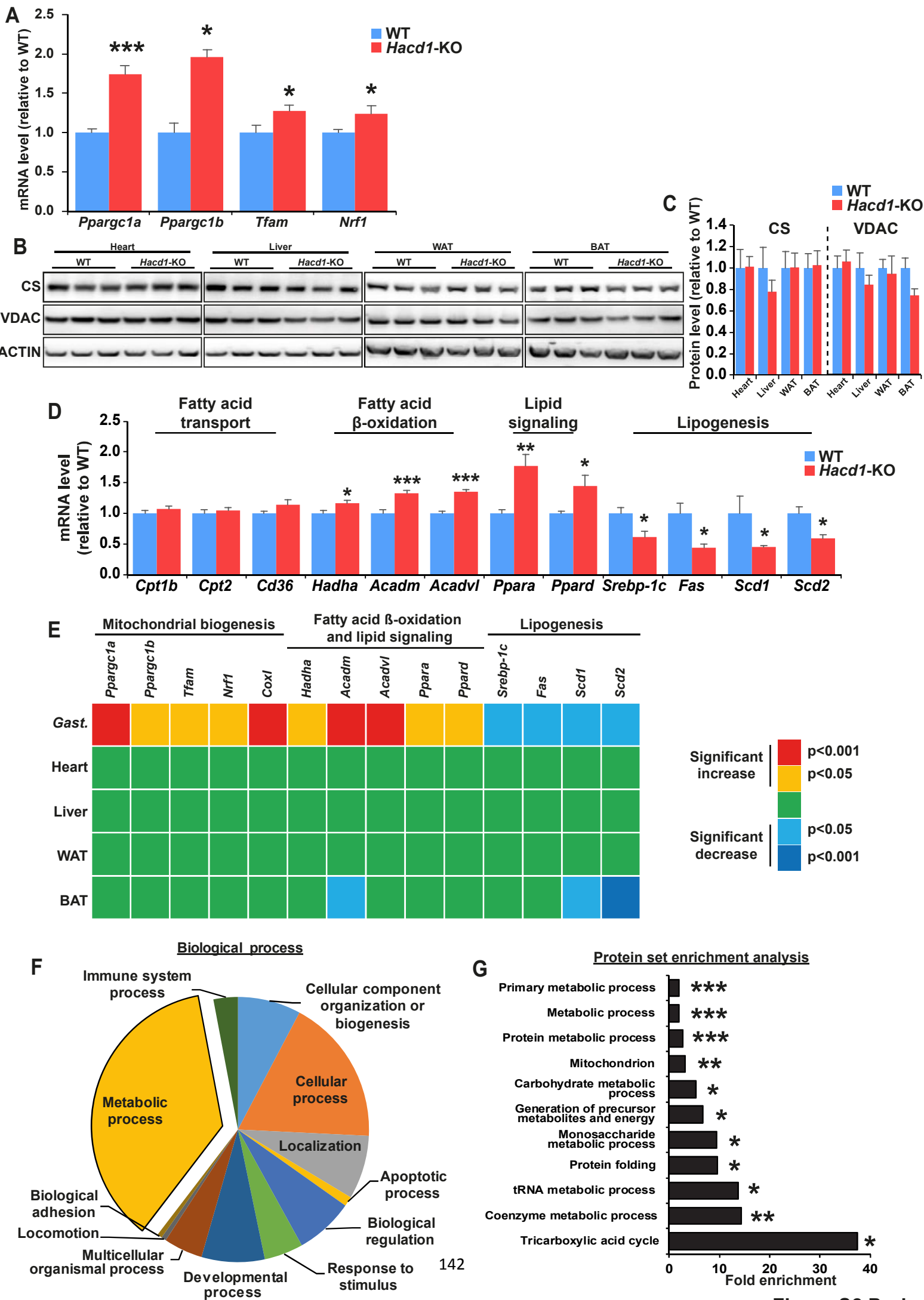
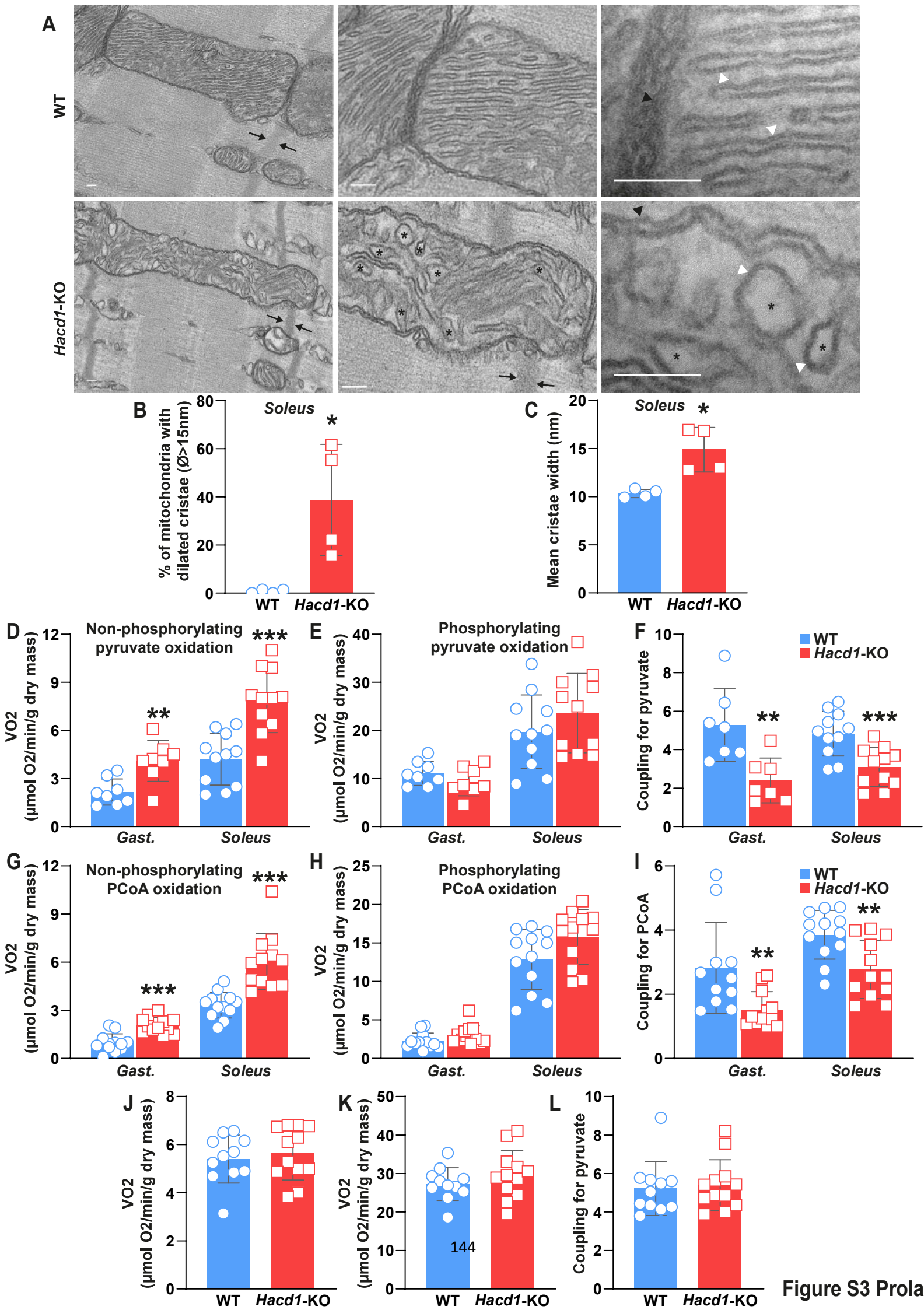


Figure S2 Prola

Supplemental Figure 2 | Metabolic changes of *Hacd1*-KO mice are restricted to skeletal muscle. Related to Figure 2.

(A) *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Tfam* and *Nrf1* mRNA expression normalized by the geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle. **(B-C)** Representative immunoblots **(B)** and quantification **(C)** of CS and VDAC, normalized to the expression of β -Actin in heart, liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). **(D)** mRNA expression in superficial *gastrocnemius* muscle of a panel of genes involved in lipid metabolism, normalized by the geometrical mean of three independent reference genes. **(E)** mRNA expression of a panel of genes involved in mitochondrial biogenesis, lipid oxidation and lipogenesis, normalized by geometrical mean of three independent reference genes, in superficial *gastrocnemius* muscle (*Gast.*), heart, liver, gonadal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). **(F and G)** Gene ontology analysis and PANTHER protein set statistical enrichment analysis performed on the panel of the 96 proteins that are upregulated in the *tibialis anterior* muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 3 | Remodeled structure and modified respiratory parameters of skeletal muscle fibers of *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 3.

(A) Transmission electron microscopy of longitudinal sections of myofibers from *soleus* muscle. Images are from datasets taken at a low (x 2,500; left panel), intermediate (x 10,000; middle panel) and high (x 30,000; right panel) magnification. The Z-line is delimited by arrows. Cristae are regular tubular-shaped invaginations (white arrow heads) of the inner mitochondrial membrane, unambiguously identified on the same plane than the outer mitochondrial membrane (black arrow heads). Excessive dilation of cristae tips (asterisk) is frequently observed in *Hacd1*-KO myofibers. **(B and C)** Morphometric quantification in *soleus* muscle of the percentage of mitochondria containing cristae with excessively dilated tips (maximal diameter >15 nm) **(B)** and the mean maximal diameter of the tubular segment of cristae **(C)**. **(D and E)** Non-phosphorylating **(D)** and phosphorylating **(E)** oxidation rate in the presence of pyruvate in permeabilized myofibers freshly isolated from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(F)** Mitochondrial coupling for pyruvate (Acceptor Control Ratio (ACR) of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of pyruvate from **D** and **E**). **(G and H)** Non-phosphorylating **(G)** and phosphorylating **(H)** oxidation rate in the presence of Palmitoyl-Coenzyme A (PCoA) in permeabilized myofibers freshly isolated from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(I)** Mitochondrial coupling for PCoA (ACR of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of PCoA from **G** and **H**). **(J and K)** Non-phosphorylating **(J)** and phosphorylating **(K)** respiration rates of saponin-permeabilized cardiac fibers in the presence of pyruvate. **(L)** Mitochondrial coupling of saponin-permeabilized cardiac fibers in the presence of pyruvate (ACR of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of pyruvate

from **J** and **K**). Scale bars in **A**: 100 nm. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.

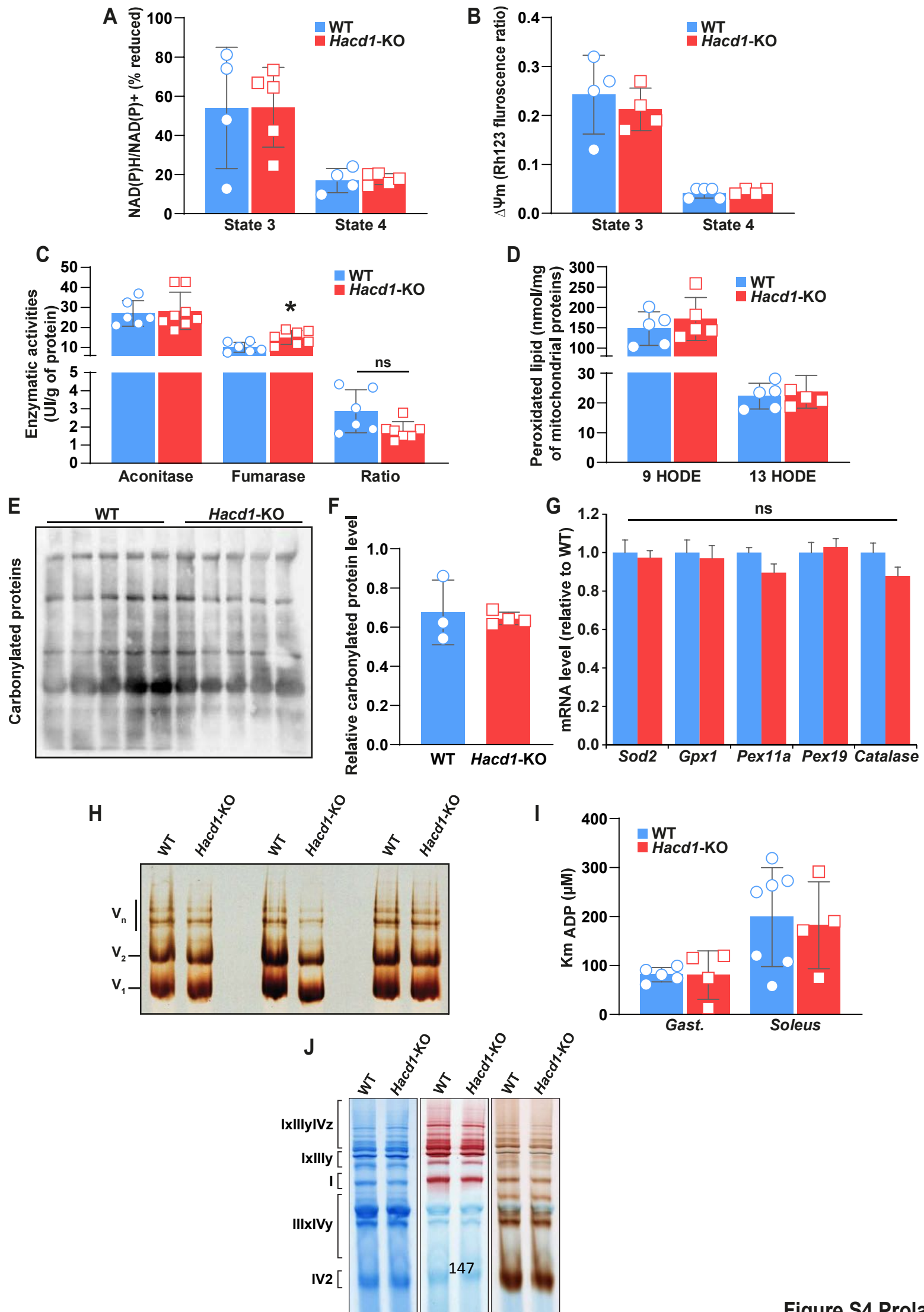
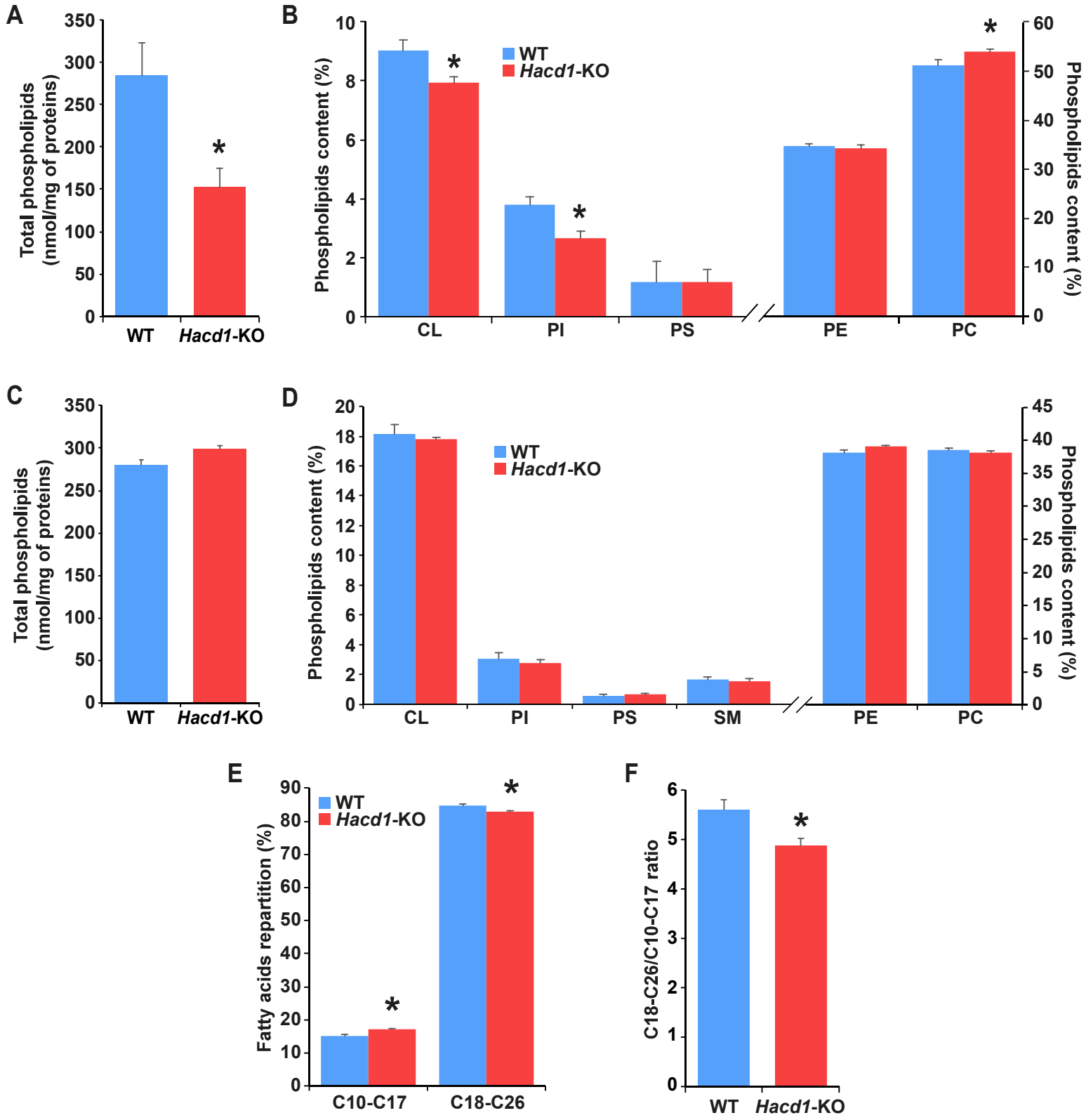


Figure S4 Prola

Supplemental Figure 4 | Reduced mitochondrial coupling in muscle of *Hacd1*-KO mice is not associated with respiratory chain or ATP synthase dysfunction, nor oxidative stress. Related to Figure 3.

(A) NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio measured on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle of WT and *Hacd1*-KO mice in state 4 (no ADP) and state 3 (2 mM ADP). **(B)** $\Delta\psi_m$ measured on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle of WT and *Hacd1*-KO mice in state 4 (no ADP) and state 3 (2 mM ADP). **(C)** Aconitase and fumarase enzymatic activities and ratio of aconitase to fumarase activity in isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. **(D)** 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) and 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) quantification in isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. **(E and F)** Quantitative blotting of protein carbonylation in superficial *gastrocnemius* muscle. **(G)** *Sod2*, *Gpx1*, *Pex11a*, *Pex19* and *Catalase* mRNA expression normalized by geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle. **(H)** In-gel activity of mitochondrial ATP synthase complexes isolated from the *tibialis anterior* muscle. **(I)** Apparent K_m of oxygen consumption for ADP on permeabilized fibers from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(J)** Analysis of the supramolecular organization of mitochondrial respiratory chain complexes in WT and *Hacd1*-KO mice. Mitochondria from the *tibialis anterior* muscle were analyzed by BN-PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue staining or In-gel enzyme activities (IGA) for complexes I or IV. The positions of respiratory chain complexes and supercomplexes are indicated to the left. (Representative image from three independent experiments.) Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 5 | Phospholipid and fatty acid quantification in mitochondria from *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 4.

(A) Total phospholipid content of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle, normalized to the mitochondrial protein content. **(B)** Relative phospholipid species content of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle, normalized to the total content of mitochondrial phospholipids. **(C)** Total phospholipid content of mitochondria isolated from the heart, normalized to the mitochondrial protein content. **(D)** Relative phospholipid species content of mitochondria isolated from the heart, normalized to the total content of mitochondrial phospholipids. **(E and F)** Fatty acids repartition **(E)** and ratio of C18-26 to C10-17 **(F)** from total lipids of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle. CL = cardiolipins, PC = phosphatidylcholine, PE = phosphatidylethanolamine, PI = phosphatidylinositol, PS = phosphatidylserine, SM = sphingomyeline.

error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values.

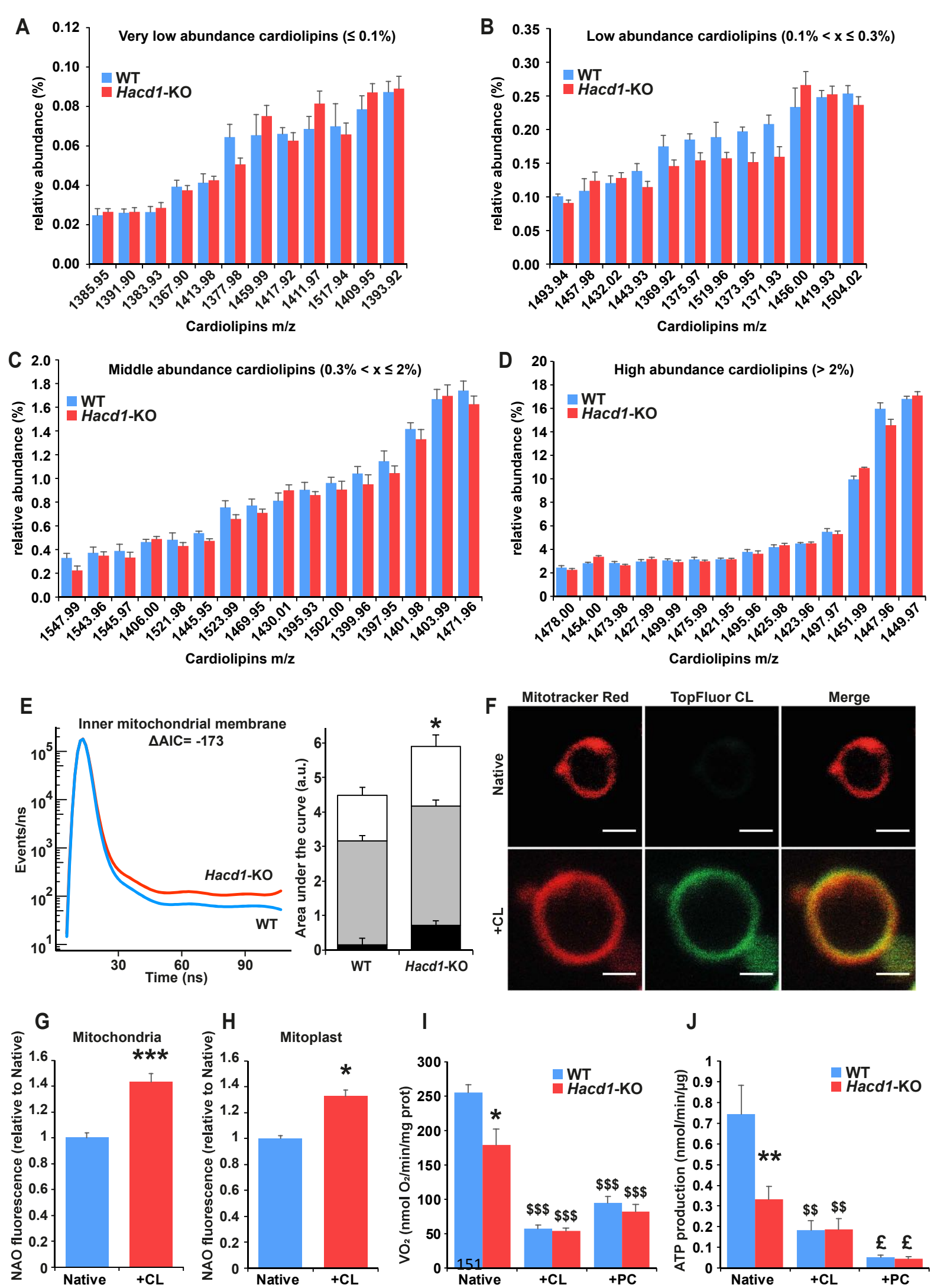


Figure S6 Prola

Supplemental Figure 6 | Cardiolipin enrichment in mitochondria from *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 4.

(A-D) Relative cardiolipins composition of mitochondria isolated from tibialis anterior muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice. Each cardiolipin species is expressed as a percentage of total cardiolipin content and separated as very low (<0.1%, **A**), low (0.1% < x ≤ 0.3%, **B**), middle (0.3% < x ≤ 2%, **C**) and high (>2%, **D**) abundance. **(E)** TMA-DPH lifetime decay (curves) and mixing proportions (histograms) in the inner mitochondrial membrane, measured on mitoplasts from the *tibialis anterior* muscle. **(F)** Representative images of mitoplasts made from native mitochondria or after fusion of mitochondria with TopFluor-Cardiolipin (CL) vesicles and stained with Mitotracker Red. Scale bar: 1µm. **(G and H)** Quantification of cardiolipin enrichment with Nonyl-Acridine Orange (NAO) staining on native mitochondria and after fusion with CL vesicles (**G**) and on mitoplasts isolated from the corresponding mitochondria (**H**). **(I and J)** Oxidation rate (**I**) and ATP production (**J**) measured on native isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle or after fusion with cardiolipin (+CL) or phosphatidylcholine (+PC) vesicles. $n = 5$ per group for **A-D**; error bars: ± s.e.m.; multiple pair wise tests using Holm-Bonferroni method revealed no significant differences. Δ AIC = difference in the Akaike's Information Criterion (full analysis in Tables S5); error bars, ± s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values; \$\$ = $P \leq 0.01$ vs Native, \$\$\$ = $P \leq 0.001$ vs Native, £ = $P \leq 0.05$ vs +CL.

Publication 2

***Hacd2* deficiency leads to early and lethal mitochondrial disease**

Article en préparation pour Molecular Metabolism.

Contexte de l'étude

Le gène *HACD1* possède 3 paralogues chez les mammifères (*HACD2-4*). Parmi eux, les gènes *HACD3* et *HACD4* sont assez éloignés du gène *HACD1* et contrairement à *HACD1* et *HACD2*, ils ne sont pas capables de sauver l'absence de leur orthologue *Phs1* chez la levure. Le gène *HACD2* est au contraire proche en structure et en fonction in vitro du gène *HACD1* (Ikeda *et al.*, 2008). Le gène *HACD2* aurait une expression large (Wang *et al.*, 2004) mais aucune mutation n'était décrite pour ce gène, ce qui fait que sa fonction restait à découvrir. Avant mon arrivée, notre équipe avait réalisé deux lignées de souris mutantes pour le gène *Hacd2* : l'une présentant une légère expression résiduelle du transcrite normal d'*Hacd2* (lignée *Hacd2*-flox, dite *KnockDown* (KD)), l'autre correspondant à une perte de fonction totale du gène *Hacd2* (*Hacd2*-KO). Ils avaient pu observer que les animaux hétérozygotes pour chacun de ces allèles étaient normaux, fertiles et de longévité normale. Au contraire, les animaux homozygotes pour l'allèle *Hacd2*-flox (*Hacd2*-KD), normaux à la naissance, mouraient très rapidement, aucun n'atteignant le sevrage. Enfin, aucun animal homozygote pour l'allèle *Hacd2*-KO (*Hacd2*-KO) n'avait pu être observé parmi cinq portées, ce qui orientait vers une létalité embryonnaire.

Objectifs de l'étude

Le but de ma thèse a été de caractériser le phénotype lié à la perte de fonction partielle et totale du gène *Hacd2*, en essayant en particulier de comprendre l'origine de la létalité correspondante. Comme pour l'étude du rôle du gène *Hacd1* dans le métabolisme musculaire, nous avons cherché ici à comprendre ces phénotypes aux différentes échelles de l'organisme, depuis l'échelle tissulaire jusqu'à l'échelle moléculaire, en nous appuyant en partie sur les connaissances acquises pour le gène *Hacd1*.

Résultats

✓ Nous avons pu montrer que le gène *Hacd2* s'exprime de manière précoce au cours du développement embryonnaire et reste exprimé de manière ubiquitaire à l'âge adulte, avec une expression très forte dans le foie, les reins et les tissus adipeux blanc et brun. Conformément à ce qui était attendu, les embryons *Hacd2*-KO ne présentaient plus d'expression du gène *Hacd2* tandis que les souriceaux *Hacd2*-KD présentaient une expression résiduelle faible, variable selon les tissus.

✓ Nous avons pu mettre en évidence que les embryons *Hacd2*-KO meurent aux alentours de E9.5, en présentant un retard de croissance et de profondes anomalies du développement du cœur et des vaisseaux embryonnaires et vitellins que nous avons pu caractériser finement.

✓ Les souriceaux *Hacd2*-KD présentent une mortalité étalée principalement entre une et trois semaines après la naissance. A chaque fois, leur croissance est normale puis ils présentent un arrêt de leur croissance qui aboutit en quelques jours à une cachexie et à la mort si on ne les euthanasie pas à temps. Nous avons pu mettre en évidence qu'ils présentent précocement une hypoglycémie et une hyperlactatémie, fortement évocatrice d'un syndrome mitochondrial.

✓ De fait, l'analyse du fonctionnement respiratoire a révélé une atteinte mitochondriale à la fois chez les embryons *Hacd2*-KO et dans le foie et les reins des souriceaux *Hacd2*-KD. Une analyse en microscopie électronique a permis de mettre en évidence de profondes anomalies de structure des crêtes mitochondriale dans l'ensemble des tissus étudiés chez les embryons *Hacd2*-KO.

✓ Une analyse lipidomique sur les embryons *Hacd2*-KO et le foie et les reins des souriceaux *Hacd2*-KD est encore en cours d'analyse par la plateforme de lipidomique de Châtenay. L'analyse quantitative des phospholipides et plus particulièrement des différentes espèces de cardiolipines n'est pas encore disponible. Néanmoins, les premiers éléments d'analyse

qualitative ont révélé une présence massive de cardiolipines oxydées chez les embryons *Hacd2*-KO tandis qu'elles sont quasiment absentes chez les embryons contrôles.

Conclusion

Cette étude a permis de révéler que le gène *Hacd2* est un gène essentiel du développement et que sa perte de fonction provoque une altération du fonctionnement mitochondrial très certainement à l'origine de la mort des individus atteints. Le gène *Hacd2* est ainsi nécessaire au développement cardiovasculaire de l'embryon, puis au fonctionnement normal du foie et des reins. L'atteinte multi-organe des souriceaux *Hacd2*-KD peut certainement être considéré comme un syndrome mitochondrial.

Enfin, cette étude confirme un rôle essentiel des gènes *Hacd* dans le métabolisme des cardiolipines, qu'il reste encore à comprendre sur le plan enzymatique.

Contribution

J'ai contribué à cette étude en réalisant et en coordonnant l'ensemble des expériences. J'ai ainsi supervisé les accouplements, réalisé le prélèvement des embryons *Hacd2*-KO, suivi les naissances des portées *Hacd2*-KD, pesé les souriceaux dès leur identification, réalisé les prélèvements et les analyses nécessaires. J'ai bénéficié de l'aide et de l'expertise de plusieurs membres de l'équipe pour la réalisation de certaines analyses (analyse de la respiration et histologie en particulier), ainsi que de l'aide de plusieurs personnes extérieures pour l'histologie (Hélène Huet), la microscopie électronique (Christine Péchoux) et la lipidomique (Audrey Solgadi).

***Hacd2* deficiency leads to early and lethal mitochondrial disease**

Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Alexandre Prola^{1,2,3}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Maxime Bodak^{1,2,3}, Audrey Solgadi⁴, Hélène Huet⁵, Christine P  choux⁶, Mélody Wintrebert^{1,2,3}, Frédéric Relaix^{1,2,3}, Laurent Tiret^{1,2,3,*}, Fanny Pilot-Storck^{1,2,3,*}

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Creteil, France.

² EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³ EFS, IMRB, F-94010 Creteil, France.

⁴ UMS IPSIT, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

⁵ Biopôle,   cole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France

⁶ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

* Co-last and co-corresponding authors

Corresponding authors e-mail addresses: fanny.storck@vet-alfort.fr; laurent.tiret@vet-alfort.fr

Summary

Mitochondria fuel most animal cells with ATP energy and accordingly, early and broad failure of mitochondrial function leads to severe forms of mitochondrial diseases. On the contrary, later or restricted mitochondrial dysfunction may lead to mild diseases, as observed for *Hacd1*-related myopathy in humans, dogs and mice for example. As *Hacd1*, *Hacd2* gene encodes an enzyme involved in very long chain fatty acid (C \geq 18) synthesis, yet its roles in vivo are unknown. Here we show that *Hacd2* displays an early and broad expression and that both the knockout and knockdown of its expression in mouse are lethal. Knockout of *Hacd2* leads to embryonic lethality around E9.5, characterized by a developmental delay and severe cardiovascular malformations of the embryos. In parallel, knockdown of *Hacd2* leads to death within one to four weeks after birth, after a sudden growth arrest followed by cachexia and lethargy, without macroscopic abnormalities. In-depth mechanistic analysis revealed that both *Hacd2*-knockout embryos and vital organs of *Hacd2*-knockdown pups displayed reduced mitochondrial efficiency, in association with altered mitochondrial ultrastructure. Molecularly, we demonstrated the presence of oxidized cardiolipin in *Hacd2*-knockout embryos. Altogether, this study reveals essential roles for *Hacd2* gene in embryonic and postnatal development through the control of proper mitochondrial organization and function.

Keywords

Mitochondrion; cristae; phospholipid; fatty acid; VLCFA; ELOVL; OXPHOS coupling; lipidomics; cardiac development; angiogenesis; vasculogenesis; CD31; ATP synthase; cardiolipin oxidation; Hsd17b12

Introduction

Mitochondria are double-membrane-bound organelles that provide most cell energy supply through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process, which consists in an electron transfer by the respiratory chain that generates a proton gradient, which in turn allows the synthesis of ATP by the ATP synthase (Mitchell, 1961). Impairment in OXPHOS leads to mitochondrial diseases, which is one of the most common and severe groups of inherited diseases (Frazier et al., 2019; McCormick et al., 2018; Vafai and Mootha, 2012). Mutations in >250 genes of both mitochondrial and nuclear genomes have been identified as responsible for mitochondrial diseases, yet molecular diagnosis is still lacking for many patients. Mitochondrial diseases are clinically diverse, with one or several affected organs and prenatal to adult onset. Because of their high energy demand, brain, heart, muscle, liver, kidney and endocrine organs are the most frequently affected organs in mitochondrial diseases, either alone or in any possible combination, depending in part on the expression pattern and redundancy of the mutated gene (Frazier et al., 2019; Maldonado et al., 2019; Murayama et al., 2019). A large part of genes involved in mitochondrial diseases are directly involved in OXPHOS and encode in particular OXPHOS subunits or assembly factors. In parallel, many nuclear genes involved in mitochondrial diseases are indirectly required for the OXPHOS, ensuring proper mitochondrial organization. Among this group belong several genes involved in mitochondrial morphology, dynamics and membrane lipid composition. A particular feature of mitochondria stands in the complex organization of its inner mitochondrial membrane (IMM), which folding into cristae relies on an exquisite interplay between proteins and lipids (Cogliati et al., 2016; Lu and Claypool, 2015). Notably, it requires cardiolipin, a four acyl-chain phospholipid specific of the IMM, which favors correct folding of the IMM and allows efficient organization of respiratory complexes and optimal function of the ATP synthase (Ikon and Ryan, 2017; Paradies et al., 2014).

Membrane phospholipids, including cardiolipin, often comprise one or several acyl chain of 18 or more carbons (Hishikawa et al., 2014; Lu and Claypool, 2015; Renne and de Kroon, 2018). Contrarily to fatty acids <C18 that are synthesized in the cytosol by Fatty Acid Synthase complex, fatty acids from C18 are elongated by the Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA) cycle machinery, in a four-step cycle accomplished in the ER by membrane-embedded enzymes (Sassa and Kihara, 2014). The first reaction is a condensation catalyzed by ELOVL proteins, which are encoded by seven different genes with diverse but partly redundant expression

patterns. The second and fourth reactions are reductions catalyzed by unique KAR and TER proteins, respectively. The third reaction is a dehydration catalyzed by HACD proteins, encoded by *Hacd1* to 4 genes. The essential role of the VLCFA elongation cycle is attested by the lethality of mutant yeasts for *PHS1* gene that encodes the unique yeast HACD ortholog and of mutant mice for *Hsd17b12* gene that encodes KAR protein, which die at E9.5 during embryonic development (Denic and Weissman, 2007; Rantakari et al., 2010). Because of their large array of expression patterns and their partly redundant activities, inactivation of *Elovl* genes has been associated with diverse phenotypes, yet precise cellular and molecular mechanisms are fragmentary (Sassa and Kihara, 2014). Of note, mechanistic characterization has been achieved in *HACD1* deficient conditions (Blondelle et al., 2015) (Prola et al., *accepted in Science Advances*). *HACD1* mutations cause a congenital myopathy in humans, dogs and mice that associates reduced muscle mass and weakness (Al Amrani et al., 2020; Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005; Toscano et al., 2017). *Hacd1* has been proven to play a key role in membrane phospholipid composition, both in muscle development and function (Blondelle et al., 2015)(Prola et al.). In particular, *Hacd1* deficiency impairs proper mitochondrial membrane composition and structure and leads to defective respiratory coupling between the respiratory chain and the ATP synthase, thus including *HACD1*-related myopathy into the group of mitochondrial myopathies (Prola et al.).

In contrast, no mutation has been described so far for *Hacd2* gene. Structural and in vitro functional analyses revealed that HACD1 and HACD2 proteins share a close proximity (Ikeda et al., 2008) but contrarily to *Hacd1* which expression of its full-length isoform that encodes the catalytically active protein is nearly restricted to skeletal and cardiac muscle (Blondelle et al., 2015), *Hacd2* reportedly exhibits a broad expression pattern (Wang et al., 2004). We decided to investigate *Hacd2* function during mouse development. Using two different constructs, we managed to create both a knockout (KO) and a knockdown (KD) condition for *Hacd2* expression. Neither *Hacd2*-KO nor *Hacd2*-KD mice were viable, with lethality occurring at mid-embryonic development and during early postnatal life, respectively. In-depth characterization identified defective mitochondrial organization and function as a common cell failure mechanism in both conditions. Altogether, our study suggests that *Hacd2* gene is a new mitochondrial disease-related nuclear gene.

Results

Hacd2 gene is early and broadly expressed

To generate *Hacd2* deficient models in mouse, we used two independent ES cell lines (G09, A10) containing a versatile KOMP recombination construct at *Hacd2* locus. After homozygous recombination and verification of germline transmission, we generated mice bearing the following alleles: *Hacd2*-Flox (native recombined construct), *Hacd2*-KO (after excision of exon 2 by a ubiquitous Cre recombinase) and *Hacd2*-cKO (after excision of *LacZ* and *NeoR* cassettes by a ubiquitous flippase) (Figure S1).

A *LacZ* reporter gene in frame with exon 1 of *Hacd2* gene was present in *Hacd2*-Flox and *Hacd2*-KO alleles, allowing the expression of LacZ enzyme under the control of *Hacd2* promoter (Figure S1A-B). X-Gal staining was used to investigate the expression of *Hacd2* in *Hacd2*^{flox/+} or *Hacd2*^{KO/+} mice. Similar results were observed for individuals coming from both ES cell lines and for the two alleles. At mid-embryonic development, ubiquitous expression was observed in the embryos, with a high expression in the heart and the somites (Figure 1A-C). At E9.5, embryo sections confirmed an expression in the two layers of the heart, *i.e.* the endocardium and myocardium (Figure 1D-E). In adults, expression was observed in most organs, with a strong staining in skin (NK *et al.*, *in preparation*) and heart conductive tissue (Figure S2).

In adults also, RT-PCR experiments detected only one, full-length mRNA for *Hacd2* in all tested tissues (not shown), contrarily to *Hacd1* that displays two isoforms, a full-length one that encodes the active enzyme and a truncated isoform that encodes an inactive protein (Blondelle *et al.*, 2015). Also, in contrast with *Hacd1* gene for which expression of the full-length isoform is nearly restricted to skeletal and cardiac muscle, RT-qPCR experiments confirmed a ubiquitous expression of *Hacd2* gene, with a high expression in brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT), liver, kidney and testis, an intermediate expression in skin, brain, stomach, lung and muscles, and a low expression in all other tested tissues (Figure 1F). At day 9 after birth (P9), a broad expression of *Hacd2* gene was already present, with the highest expression found in the liver and BAT (Figure 1G).

***Hacd2* deficiency is lethal**

To characterize the role of *Hacd2* in vivo, we first crossed heterozygous mice for the *Hacd2* knockout (KO) allele to examine the consequences of *Hacd2* complete loss-of-function. No viable *Hacd2*^{KO/KO} (hereafter *Hacd2*-KO) mice were born, whereas the other genotypes followed expected Mendelian ratios (analyzed pups n = 48, *Hacd2*^{+/+} n = 16, *Hacd2*^{+/^{KO} n = 32). We interrupted the gestation of mothers carrying *Hacd2*-KO embryos from progressively earlier stages. At embryonic day 11.5 post coitum (E11.5) and then E10.5, we observed very abnormal and delayed embryos with pericardial edema, absence of salient cephalic vesicles, pigmented optic vesicles, protruding limb buds or well-defined branchial arches (Figure 2A). In some cases, we noticed the first signs of an embryonic resorption evidenced by a truncated caudal part and a collapsed heart (Figure 2A).}

We next analyzed *Hacd2*-KO embryos at E9.5. Genotyping revealed normal Mendelian ratios at this stage (analyzed embryos n = 285, *Hacd2*^{+/+} n = 64, *Hacd2*^{+/^{KO} n = 147, *Hacd2*-KO n = 74). WT and *Hacd2*^{+/^{KO} littermates were indistinguishable, thus hereafter called “control” embryos. At E9.5, all control embryos with 18-22 pairs of somites had turned, subdivision of the primitive brain vesicles was visible in the cephalic region, characterized by closure of the anterior neuropore and well developed telencephalic vesicle. Two pairs of branchial arches were also clearly visible, as well as otic vesicles and optic pits (Figure 2A). On the contrary, all *Hacd2*-KO embryos had developmental delays evidenced by a smaller cephalic region with poorly defined subdivisions, and in many cases the anterior neuropore remained open, revealing anterior neural folds. In the posterior part, the allantois was always present. Among these globally delayed embryos, two groups could be distinguished. Most of them (81 %) had completed their turning, otic pits and branchial arches were visible (Figure 2A), but they contained a fewer pairs of somites whose number enabled to classify them as E9.0 to E9.25 embryos. Of note, most of these embryos had a nascent pericardial edema (Figure 2A), indicative of a cardiovascular dysfunction sufficient at this stage to induce a growth arrest and death of the embryo. The second group (19 %) was composed of embryos with even more pronounced stunted growth or developmental delays, evidenced by an incomplete turning. After removal of annexes, they appeared as erected embryos that were staged as E8.5 embryos (Figure 2A).}}

RT-qPCR analysis confirmed the complete lack of *Hacd2* mRNA expression in *Hacd2*-KO embryos (Figure 2B), and in western blot a band at the expected size of HADC2 protein was

present in WT embryos but absent in *Hacd2*-KO embryos (Figure 2C). Absence of transcripts and protein proved full efficiency of the genetic knockout strategy.

Secondly, we took advantage of the *Hacd2*-Flox allele to investigate the consequences of a partial reduction of *Hacd2* expression. Indeed, a strong splicing acceptor site at the 5' end of the *LacZ* construct should favor splicing between the *LacZ* cassette and exon 1 of the *Hacd2* gene. However, WT splicing between exon 1 and exon 2 of the *Hacd2* gene remains plausible (Figure S1), and in this case, residual expression of *Hacd2* mRNA was expected, at least in some organs. Mating between heterozygous mice for the *Hacd2*-Flox allele gave rise to pups of all expected genotypes, although the number of *Hacd2*^{flox/flox} (hereafter *Hacd2*-KD) pups at postnatal day 5 (P5) was slightly reduced compared to the expected Mendelian ratio (analyzed pups n = 342, *Hacd2*^{+/+} n = 100, *Hacd2*^{+/^{flox}} n = 180, *Hacd2*^{flox/flox} n = 62). We further observed that between P5 and P22, all *Hacd2*-KD pups exhibited a growth arrest systematically leading to cachexia and lethargy within a few days, which required compassionate euthanasia (Figure 2D). RT-qPCR experiments revealed reduced, albeit non-null levels of *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD pups compared to their WT littermates, with the strongest reduction observed in the liver (- 91%), the kidney (- 82%), the brown adipose tissue (BAT, - 71%), the heart (- 70%) and muscle (- 39%) (Figure 2E). Residual expression of *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD pups confirmed that this condition constitutes a knockdown model for the *Hacd2* gene.

***Hacd2* knockout leads to severe cardiovascular malformations**

We analyzed the *Hacd2*-KO embryos at E9.5, when development deviated from the normal course for a majority of them. Also, by this time point they are constituted of a sufficient number of cells (Palis et al., 1999) for the quantitative molecular and functional analyses that we had to carry out. Between E8.5 and E9.5, the total number of cells in the embryo and its annexes increases almost ninefold, from 112,000 to 960,000 (Palis et al., 1999). This exponential growth is accompanied by the establishment of a circulatory system that allows each cell to be rid of metabolites and supplied with substrates, growth factors, signaling molecules and oxygen in a buffered medium. Beyond stage E7.5, the survival of the embryo depends successively on the vascularization of the yolk sac - choriovitellin placentation - and then on the proper embryonic circulation. We therefore carefully observed the development of vascular networks and heart. Systematically, the yolk sac of *Hacd2*-KO embryos was devoid of the vessels that were well developed in controls (Figure 3A). In *Hacd2*-KO embryos, vessel

development was stopped at the honeycomb-shaped capillary plexus stage. No red blood cells were visible inside these vascular anlagen (Figure 3A).

Even in the most advanced E9.5 *Hacd2*-KO embryos, the heart never resembled a normally developed looped heart. In most cases, it remained at the heart tube stage (Figures 2A and 3B), a hallmark of the late E8.5 stage.

Analysis on histological sections or from high-resolution episcopic microscopy (HREM) images allowed to identify the presence of the three concentric cellular layers constituting the heart, namely the pericardium, myocardium and endocardium (Figures 3B and 3C). However, the myocardium was always thinner than in controls. Because the primitive myocardium secretes cardiac jelly (Krug et al.), we stained transverse sections with alcian blue that reveals cardiac jelly and observed that it was produced in *Hacd2*-KO embryos, although in a smaller amount than in controls (Figure 3B and 3C).

We then observed the internal vascularization of whole embryos with a binocular loupe, by HREM or by z-stack confocal imaging of the endothelial network immunolabeled with an anti-CD31 antibody. In both control and *Hacd2*-KO embryos, we observed the presence of a pair of dorsal aortae and umbilical veins, an anterior and a posterior cardinal vein and a caudal vitelline vein, all lumenized. This indicated that vasculogenesis and angiogenesis proceeded appropriately (Figures 3B and 3D). However, in the *Hacd2*-KO embryos, we observed a defect in caudal expansion of the posterior cardinal vein and intersomitic vascular ramifications, which were very poorly developed in comparison with the controls (Figure 3D). Finally, red blood cells, although present in *Hacd2*-KO embryos (Figure 3C), were accumulated in the venous network, rarely observed in dorsal aortae and never in the cardiac chamber (Figures 2A and 3B).

In summary, *Hacd2* loss of function induced a vascularization defect of the conceptus, interrupted at an earlier stage in the yolk sac than in the embryo, as well as an arrest of cardiac development at stage ~E8.5. This arrest is concomitant with the looping morphogenetic movement that normally leads to the formation of a functional four-cavity heart (Kelly, 2016). In the heart, the myocardium was present, it secreted the cardiac jelly and was animated by contraction movements revealing that myocardial cells had differentiated (Movie S1). However, these contractions were never accompanied by blood movement, likely because of a poorly developed or insufficiently contracting myocardium. As the myocardium was unable to pump blood cells, they accumulated in the venous network. It was therefore considered

that the absence of *Hacd2* function causes an embryonic congestive heart failure that induced a defect in cellular perfusion responsible for a precocious termination of the embryo's development.

Hacd2 loss of function restricted to specific cardiovascular lineages does not prevent embryos from developing

We next wondered whether the proper development of the embryonic cardiovascular system requires the cell-autonomous function of *Hacd2* in its constitutive lineages. To this end, we generated embryos lacking *Hacd2* early expression in the TEK (or TIE2)+ angioblast lineage yielding yolk sac and embryonic endothelial cells (Kisanuki et al., 2001), or in the MESP1+ mesodermal cell lineage yielding precursor cells of the heart tube and the myocardium at E9.5 (Saga et al., 1999). Selective inactivation of *Hacd2* in these lineages was obtained using the Cre recombinase genetic system under the *Tek* or the *Mesp1* gene promoter (Figure S1C). In embryos expressing the *ROSA^{mTmG}* allele (Muzumdar et al., 2007), we first validated that *Tek*-Cre was expressed in the endothelium of vessels and the endocardium at E9.5, and that at this stage, *Mesp1*-Cre was broadly expressed in all lineages of the heart (Figure S3A). We then crossed each of the two Cre lines with our mice carrying the conditional *Hacd2*-cKO allele (Figure S1C) and genotyped pups after birth. In both lines, we obtained mice of the genotype allowing the invalidation of *Hacd2* in the targeted lineages in Mendelian proportion (five *Hacd2^{ckO/ckO}* ; *Tek*-Cre+ individuals and six *Hacd2^{ckO/ckO}* ; *Mesp1*-Cre+ individuals). They were all viable, showed no difference with their control littermates and reached adulthood in healthy conditions. Accordingly, dissection of *Hacd2^{ckO/ckO}* ; *Tek*-Cre+ embryos at E10.5 showed normal yolk sac vascularization and cardiovascular development (Figure S3B). Likewise, echocardiographic parameters recorded in *Hacd2^{ckO/ckO}* ; *Mesp1*-Cre+ adult mice were normal (data not shown). Efficiency of *Hacd2* inactivation in the heart of these mice was confirmed (Figure S3C).

Consistently with the early ubiquitous embryonic expression of *Hacd2*, these results reveal that its essential role in cardiovascular development likely involves other lineages in a non-cell autonomous process.

Hacd2 knockdown leads to a systemic disease resulting in cachexia

When genotyped at P5, *Hacd2*-KD pups were indistinguishable from their WT and *Hacd2*^{+/*fllox*} littermates although their body mass was already slightly reduced (Figure 4A). However, all *Hacd2*-KD pups failed to thrive before weaning, experiencing a growth arrest at a variable point between P5 and P22. From this stage, *Hacd2*-KD pups never recovered normal body mass compared to littermates and within one to five days, exhibited cachexia and lethargy, requiring euthanasia (Figures 2D and 4B). In parallel, an ichthyosis, *i.e.* a pronounced skin dehydration, appeared within one to three days after growth arrest on the hindlimbs and the tail, which could eventually lead to tail necrosis in the most severe cases (Figure 2D; NK et al., *in preparation*). At the terminal stage, growth retardation was illustrated by a lower body mass compared to littermates (Figure 4C) and at necropsy, liver, BAT and *tibialis anterior* muscle mass was significantly reduced compared to littermates (Figure 4D). However, morphological examination of the heart and large vessels (data not shown), and routine histological examination of liver, kidney and muscle failed at identifying abnormalities (Figure S4) and blood and marrow smear tests revealed normal cell counts (data not shown).

To identify the causative mechanisms of this condition, we examined younger *Hacd2*-KD pups when still growing. Strikingly, infrared thermic camera revealed that still naked *Hacd2*-KD pups were devoid of the characteristic interscapular bright area that was observed in control littermates, which corresponded to BAT-related thermogenesis (Figure 4E). Nevertheless, their internal temperature was not different from their control littermates (Figure 4F), suggesting another heat source in this condition.

Most importantly, blood analysis revealed a hypoglycemia accompanied by a 2-fold increase in lactatemia in *Hacd2*-KD pups compared to littermates (Figure 4G-H).

This early excess of lactate in the context of a devastating systemic disorder was evocative of a primary mitochondrial disease, which often presents as a multi-organ, progressive and life-threatening disease when early expressed (Frazier et al., 2019; McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019). This hypothesis was compatible with the embryonic lethality around E9.5-E10.5 observed with *Hacd2* full knockout as severe impairment of OXPHOS or ATP synthase assembly leads to embryonic lethality at the same stage (Delavallée et al., 2020; Vrbacký et al., 2016).

***Hacd2* deficiency impairs mitochondrial energetic function**

To assess mitochondrial function in *Hacd2* deficient conditions, we first evaluated mitochondrial respiration rates of WT and *Hacd2*-KO single embryos at E9.5 using Seahorse device (Vrbacký et al., 2016) (Table S1). In *Hacd2*-KO embryos, both phosphorylating and non-phosphorylating respirations were significantly reduced (Figure 5A-B), with a stronger impact on the phosphorylating respiration, thus leading to a marked reduction in mitochondrial respiratory coupling (respiratory control ratio, *i.e.* phosphorylating to non-phosphorylating respiration ratio) (Figure 5C). These results indicate that the efficiency of both the respiratory chain and the coupling between the respiratory chain and the ATP synthase were affected in *Hacd2*-KO embryos. This reduced mitochondrial capability to generate ATP was associated with a preserved mitochondrial mass as illustrated by a similar activity of citrate synthase (CS) (Figure 5D) and no modification in the expression of CS gene and master coordinators of mitochondrial biogenesis (*Ppargc1a* and *Ppargc1b* genes and their target *Nrf1* gene) (Figure 5E). As expected from a reduced mitochondrial efficiency (Figure 5C), phosphorylation of the AMP kinase (AMPK) energy sensor was increased in *Hacd2*-KD embryos (Figure 5F).

Then, we evaluated the respiratory capacities of the main vital organs of *Hacd2*-KD pups when still growing, at P9. This early analysis of respiratory function revealed normal respiratory parameters in the heart and *tibialis anterior* muscle but altered respiratory function in BAT, liver and kidney (Table S2). More precisely, both phosphorylating and non-phosphorylating respiration rates were reduced in the BAT yet preserving respiratory coupling (Figure S5A-C). In line with the absence of a visible BAT-related thermogenesis (Figure 4E), this likely reflected a reduced activity of heat-generating respiration in this tissue, which might accommodate to a low heat requirement in *Hacd2*-KD pups.

On the contrary, respiration analysis revealed a marked decrease in the respiratory control ratio both in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups (-54 % and -46%, respectively) (Table S2, Figure 6A-C and F-H). In the liver, we wondered how mitochondria coped with this early reduction in respiratory efficiency and investigated mitochondrial parameters in *Hacd2*-KD mice when experiencing growth arrest. In this context, COX activity tended to increase (Figure 6D), as well as the expression of the *Cs* gene and genes involved in mitochondrial biogenesis such as *Ppargc1a*, *Nrf1* and *Tfam* (Figure S5D). These data suggested an adaptative response of the liver to the decreased mitochondrial coupling and accordingly, liver cells displayed an

increased glycolysis flux (Figure 6E) that likely participated to the observed hyperlactatemia (Figure 4H).

Oppositely, kidney cortex already displayed a marked reduction in COX activity in still growing mice (Figure 6I) and in *Hacd2*-KD pups experiencing growth arrest, both CS and COX activity tended to be reduced (Figure S5E), along with *Ppargc1a* gene expression (Figure S5F). In accordance with an absence of adaptative response in kidney, glycolysis flux remained unchanged (Figure S5G)

Together, our results showed that *Hacd2* deficiency impairs mitochondrial coupling efficiency, likely explaining the embryonic lethality associated with *Hacd2*-KO condition and the life-threatening systemic disease accompanied by hyperlactatemia in *Hacd2*-KD mice.

***Hacd2* deficiency impairs mitochondrial membrane organization**

Given these results and the role of *Hacd2* in lipid synthesis and the alteration of the composition and structure of mitochondrial membranes in *Hacd1*-deficient muscles, we investigated the ultrastructural organization and the lipid composition of mitochondria in *Hacd2*-deficient conditions.

First, we performed transmission electronic microscopy both in *Hacd2*-KO embryos and in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups. We carefully analyzed mitochondria ultrastructure in several tissues of different embryonic origins (*i.e.* the myocardium, endocardium, pericardium, branchial arch, foregut and ectoderm). In WT embryos, we noticed that while cristae density was variable even in a same cell, several cristae were visible in every mitochondria, exhibiting an elongated shape (Figure 7A,C,E,G). On the contrary, the vast majority of mitochondria in *Hacd2*-KO embryos exhibited abnormal cristae shape and organization, leading either to vesicle-like cristae or to the compartmentalization of mitochondria (Vincent et al., 2016) (Figure 7B,D,F,H). This latter anomaly was salient in the myocardium and its quantification revealed that 37% of mitochondria displayed compartmentalization in the myocardium of *Hacd2*-KO embryos, compared to 12% in WT embryos (n=3 embryos per genotype, $P<0.01$). In addition, double-membrane organelles resembling mitochondria in shape and location but void of any cristae-like structure were frequently observed in *Hacd2*-KO embryos, suggesting that these organelles could correspond to an ultimate stage of IMM disorganization. Alteration of respiratory parameters in association with a defective cristae structure was suggestive of perturbations in cardiolipin

metabolism, an IMM-specific phospholipid required for efficient OXPHOS process and proper cristae folding (Ikou and Ryan, 2017; Paradies et al., 2014) (Prola *et al.*).

We thus analyzed the content and the integrity of cardiolipin in *Hacd2*-KO embryos and we observed that beyond a preserved proportion of phospholipids (data not shown), they displayed a large amount of oxidized cardiolipin compared to WT (Figure 8A). However, cardiolipin oxidation did not trigger an antioxidative defense as the expression of *Sod2* and *Gpx1* genes that encode antioxidant enzymes was unchanged in *Hacd2*-KO embryos (Figure 8B).

[Precise quantification of phospholipids and cardiolipin in Hacd2-KO embryos and in liver and kidney of Hacd2-KD pups is pending.]

Altogether, these data suggest an early, broad and essential role of *Hacd2* in IMM composition and organization that supports its requirement for efficient mitochondrial function in ATP production.

Discussion

Our study revealed that both the knockout and the knockdown of *Hacd2* expression in mouse is lethal, at E10.5 embryonic stage and in the first postnatal weeks, respectively, which demonstrates that *Hacd2* gene acts as an essential gene. Phenotypes associated with *Hacd2* deficiency were pleiomorphic as *Hacd2*-KO embryos exhibited major cardiac malformations, a poor embryonic and extra-embryonic vascular development and a developmental delay whereas *Hacd2*-KD pups failed to thrive and systematically evolved to fatal cachexia and lethargy. Such devastating and pleiomorphic conditions are evocative of mitochondrial diseases, a hypothesis that was reinforced by the recent discovery of a key role of *Hacd1* gene in mitochondrial function in muscle (Prola *et al.*). Accordingly, we demonstrated severe mitochondrial dysfunction in *Hacd2*-KO embryos, as well as in liver and kidney of *Hacd2*-KD pups.

Mitochondrial diseases can affect one or several organs, but the most severe forms have predominantly multi-organs involvement, at early onset (Frazier *et al.*, 2019; McCormick *et al.*, 2018; Murayama *et al.*, 2019). These severe forms are frequently lethal in early postnatal life despite intensive care. Observation of abortion and still births in families affected by mitochondrial disease suggests that prenatal onset could also occur. *Hacd2* deficiency falls into this most severe group of mitochondrial diseases, in contrast with *Hacd1* deficiency that affects only muscle, at later onset, leading to a mild mitochondrial myopathy (Prola *et al.*). Difference in these phenotypes likely relies at least in part on the different expression patterns of the two genes. Indeed, *Hacd1* full-length isoform, which encodes the catalytically active protein, is nearly restricted to skeletal and cardiac muscles (Blondelle *et al.*, 2015) whereas we demonstrated that *Hacd2* exhibits only one full-length isoform in an early and broad pattern.

Hacd2-KO embryos were characterized by an abnormal cardiovascular development and a developmental delay that was lethal around E9.5. At that time, looping of the heart was accomplished but compartmentalization was not achieved and cardiac jelly, which promotes mesenchymal cushion development and heart compartmentalization (Kelly, 2016; Krug *et al.*), was barely present. Cardiac malformation was associated with pericardial oedema and an absence of blood flow despite cardiac beating. Vascular development was also failing, with thin and short peripheral vessels, and an absence of visible vessels in the yolk sac. Global

embryonic development was altered, with embryos often presenting reduced growth, incomplete turning, reduced tail part and delayed head development. This systemic phenotype could result from heart dysfunction and the associated absence of blood flow, which led us to test the hypothesis of a cardiac-autonomous requirement for *Hacd2* expression. Conditional knockout of *Hacd2* in cardiac and endothelial cells did not reproduce *Hacd2*-KO phenotype, suggesting that *Hacd2* role in cardiovascular development requires, or at least can be compensated by, other *Hacd2*-expressing structures, perhaps through the diffusion of products synthesized by the VLCFA elongation pathway.

Reciprocally, mitochondrial dysfunction was demonstrated in whole embryo homogenates and abnormal mitochondrial ultrastructure was observed in all analysed tissues, which likely reflects a broad requirement of *Hacd2* expression for mitochondrial organization and function. Thus, although cardiovascular malformations likely drive embryonic lethality, *Hacd2*-KO embryos likely suffered from a systemic mitochondrial phenotype.

A second genetic construct, with residual expression of *Hacd2* mRNA allowed us to investigate the consequences of *Hacd2* knockdown. Notably, residual expression of *Hacd2* gene was <20% in liver and kidney but higher in the BAT and the heart (around 30%) and in skeletal muscles (around 60%). Reduced body mass was most of the time the only clinical anomaly at day 5 (P5). However, all pups then experienced a growth arrest within one to three weeks after birth that was rapidly followed by cachexia and lethargy, leading to death or prompting euthanasia. In patients, early and devastating mitochondrial disorders often involve several organs, yet their precise involvement is generally poorly resolved (McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019). Here we demonstrated a mitochondrial dysfunction, with reduced mitochondrial coupling and thus efficiency in energy production, in liver and kidney of *Hacd2*-KD pups at early stages, associated with altered mitochondrial ultrastructure. While mitochondrial biogenesis tended to increase in the liver, it tended to decrease in kidney, possibly reflecting an earlier failure of kidney to cope with mitochondrial dysfunction. Hyperlactatemia and hypoglycaemia are key biological anomalies associated with severe mitochondrial diseases (McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019) and both perturbations were observed in *Hacd2*-KD pups in early stage, once more pointing to a primary mitochondrial disease and indicating that lactic acidosis was the likely cause of death of *Hacd2*-KD pups.

In contrast to liver and kidney, heart and skeletal muscle displayed normal respiratory parameters. This could either reflect a non-essential role of *Hacd2* gene in these organs at this

stage or a sufficient residual expression of *Hacd2* mRNA to ensure their normal mitochondrial function.

Strikingly, BAT displayed reduced respiratory levels that were corroborated by a reduction in BAT-generated heat when visualized by infrared camera. Although BAT uncoupling is normally a major source of heat for young pups (Diaz et al., 2014), reduced BAT function was not associated with hypothermia in *Hacd2*-KD pups. We hypothesize that the observed reduction in respiratory coupling in liver and kidney could turn them as sufficient heat suppliers to compensate or even trigger lower BAT function.

Mitochondrial dysfunction in *Hacd2*-KO embryos, as well as in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups affected both respiratory chain complexes and respiratory coupling. Mitochondrial dysfunction was thus more pronounced in *Hacd2*-deficient conditions than in *Hacd1*-deficient muscle fibres in which respiratory coupling was markedly reduced but respiratory complexes behaved normally. In *Hacd1*-deficient muscle fibres, cardiolipin depletion was proved as causative of the reduced coupling, linking HADC1 enzymatic activity to mitochondrial phospholipids synthesis (Prola *et al.*). Importantly, more severe cardiolipin alterations have been associated with defective respiratory complex assembly and function (Maranzana et al., 2013; Zhang et al., 2002, 2005) and *Hacd2* deficiency likely falls in this category. In particular, *Hacd2*-knockout was associated with high amounts of oxidised cardiolipin that likely contribute to the respiratory dysfunction and might trigger cell death in the most severely affected embryos (Maguire et al., 2017).

Finally, our study reveals that *Hacd2* is the second gene encoding enzymes of the VLCFA elongation cycle to be proven as essential for embryonic development, along with *Hsd17b12* gene, which knockout also leads to severe developmental defects and embryonic arrest at E9.5 (Rantakari et al., 2010). In light of our observations, analysis of mitochondrial function would be of interest in this condition.

In conclusion, we identified that *Hacd2* deficiency is responsible for a severe and early mitochondrial disease, likely demonstrating an early requirement of *Hacd2* for mitochondrial organization and function.

- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

- DETAILED METHODS
 - Generation of *Hacd2*-deficient mice
 - Extraction and PCR analysis of genomic DNA
 - Tissue and embryo collection
 - X-Gal staining of embryos
 - Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses
 - Histological staining
 - Immunofluorescence
 - High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM) imaging
 - Determination of glucose and lactate blood concentration
 - Infrared thermography
 - Enzyme assay
 - Respiratory measurement
 - Western blot experiments
 - Electron microscopy
 - Lipidomic analyses

- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA – 16; approval number 20/12/12-17 and 17-031) and all care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on animals that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7am to 7pm. Food and water were given *ad libitum*. Food was breeding diet for rats and mice (C1314, Altronim) for pregnant and lactating females or maintenance diet (C1324, Altronim) for weaned animals.

DETAILED METHODS

Generation of *Hacd2*-deficient mice

Three clones of recombinant ES cells with a tm1a(EUCOMM)Hmgu allele at the *Hacd2* locus (MGI:1918007; clones A10, E11 and G09) were obtained from the EUCOMM consortium (www.mousephenotype.org) and were injected into host blastocysts. Southern blot of genomic DNA confirmed a unique insertion of the recombination vector, at the *Hacd2* locus for all three clones. As chimeras derived from the E11 clone did not transmit the recombinant allele, independent *Hacd2* mutant lines were established from the two A10 and G09 clones.

Mice carrying the *Hacd2* targeting allele (*Hacd2^{fllox}*, further named *Hacd2^{KD}*) were bred with *PGK-Cre* mice to generate *Cre*-positive mice carrying a recombinant, knockout *Hacd2* (*Hacd2^{KO}*) allele lacking exon 2 and the *NeoR* cassette. In parallel, mice

carrying the *Hacd2^{fllox}* allele were bred with *act-Flp* mice to generate *Flp*-positive mice carrying a recombinant allele lacking *LacZ* and *NeoR* cassettes, suitable for conditional knockout (*Hacd2^{cKO}* allele). Eventually, we generated an *Hacd2* allele lacking exon 2 and the *NeoR* cassette (*Hacd2^{completeKO}*) by sequentially crossing *Hacd2^{fllox}*-bearing mice with *act-Flp*-bearing mice and then with *PGK-Cre*-bearing mice. In all cases, *PGK-Cre* and *act-Flp* transgenes were eliminated at the following generation. All experiments were performed on mice generated from the two independent ES clones. We confirmed the complete similarity of *Hacd2^{KO/KO}* and *Hacd2^{completeKO/completeKO}* embryos and further performed the experiments on *Hacd2^{KO/+}* crosses.

To generate *Hacd2* conditional knockout, we crossed *Hacd2^{cKO/+}* mice with *Mesp1-Cre*- or *Tie2-Cre*-bearing mice and mice bearing both alleles were further crossed with *Hacd2^{KO/+}* mice to obtain *Hacd2^{cKO/KO}*; *Mesp1*- or *Tie2-Cre*+ mice and control littermates.

Extraction and PCR analysis of genomic DNA

Mouse embryos were harvested at specific developmental stages from timed pregnant females. Embryos were dissected under a stereomicroscope (Nikon SMZ1500).

For pups from *Hacd2^{KD/+}* crosses, we sectioned a finger at P5 for genotyping and identification. For embryos, we carefully removed the yolk sac, avoiding contamination with maternal tissues. Genotyping was performed on yolk sac and finger lysates. Samples were incubated 20 min at 99 °C in 50 µl or 200 µL (yolk sac and finger, respectively), of a 25 mM NaOH, 0.2Mm EDTA buffer, then the same volume of a 40 mM Tris buffer pH5 was added, followed by centrifugation 2 min at 20,000 rcf.

Primers used for genotyping for *Hacd2* alleles are shown in the Table S3. Primers used to detect the *PGK-Cre*, *Mesp1-Cre*, *Tek-Cre* or *act-FLP* transgene are shown in Table S4.

Tissue and embryo collection

Mice were killed by cervical dislocation for animals older than three weeks, or by section of the head for mice up to three weeks, in accordance with the principles of good laboratory animal practice.

After removal, the organs were rinsed with phosphate buffered saline (PBS). Direct freezing in liquid nitrogen was carried out for RNA extraction. Freezing in liquid nitrogen-cooled liquid isopentane was carried out for cryostat sectioning. For X-Gal staining or histological analyses, organs were fixed in formol (4% formaldehyde in PBS) during 30 min or several days, respectively.

According to the vaginal plug, pregnant females carrying embryos expected to be between E9.5 and E11.5 were killed by cervical dislocation. Their pregnant uterine horns were exposed by laparotomy. When visualization of vitelline and embryonic blood vessels was required, the female and its uterine horns, left attached, were placed on ice for 30 min, which allowed for the retention of red blood cells in the so-colored vessels. For other experiments, uterine horns were removed immediately. All uterine horns were placed in a Petri dish containing PBS prechilled on ice. Incision was made along the large curvature of each uterine horn, and the fetal envelopes were removed using thin forceps to access directly to the embryo surrounded by its amniotic sac. The embryos were then rinsed in PBS and directly observed or processed as required for the different experiments. All observations of the embryos were done using a Nikon SMZ1500 stereo microscope and images were acquired using NIS software (Nikon).

Precise staging was assessed by counting pairs of somites and by observing morphological features specific of each Theiler's stage and confirmed the expected stage of embryos.

X-Gal staining of embryos

For X-Gal staining, the embryos were fixed in 1% formaldehyde in PBS for 15 min (embryos at E9.5) or 20 min (embryos at E10.5 or E11.5), then rinsed in PBS and immersed overnight at 33 °C in the absence of light, in a solution of X-Gal (4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂, 1% *sodium deoxycholate*, 1% Nonidet P40, 4% 5-Bromo-4-chloro-3-india-BD-Galactopyranoside or X-Gal, in PBS). The next day, the embryos were rinsed in PBS and observed.

After freezing in OCT embedding medium (Tissue-Tek) with isopentane and storage at -80°C, E9.5 embryos and adult heart from *Hacd2^{+/-KO}* mice were cut with a cryostat with a thickness of 10 µm for embryos and 20 µm for heart and sections were deposited on Superfrost slides. After taking out of the freezer at -80°C, the slides were dried and fixed as previously described and then immersed overnight at 33 °C in the absence of light, in a solution of X-Gal. The next day, slides were rinsed in PBS and mounted using aqueous mounting medium (Dako Faramount).

Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses

Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNAs were isolated using either TRIzol reagent (Sigma) for tissues or RNeasy plus micro kit (Qiagen) for embryos according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm > 1.8. RNA quality was checked on agarose gel. 200 ng of RNA were used for reverse transcription with the

Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNA was amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X; Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All the primers used are listed in Table S4.

Histological staining

Organs fixed with formol were processed at the EnvA Biopole. After inclusion in paraffin and cutting, sections were stained with hematoxylin and eosin.

Embryos were fixed in formol for 20 min, then embedded in paraffin and cut, and sections were stained with acidic alcian blue.

For enzymatic activities, liver and kidney were frozen in OCT embedding medium (Tissue-Tek) in isopentane precooled in liquid nitrogen, and then stored at -80°C . Sections were fixed for 30 min in formol and stained for COX activity in a 20 mM KH_2PO_4 , 80 mM Na_2HPO_4 , 30 μM 3,3'-diaminobenzidine, 1 μM Cytochrome C buffer. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed in a blinded manner using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Immunofluorescence

Embryos were fixed in 1% formaldehyde in PBS for 1 hour, rinsed twice in PBS for 30 min and then blocked and permeabilized with 3% BSA and 0.1% Triton X-100 in PBS for 7h at 4°C , followed by incubation with primary antibody at 4°C overnight. The following antibodies were used: Alpha-Smooth Muscle Actin (Biosciences, 50-9760-82; 1:500 dilution), CD31 (PECAM1; BD, 553370; 1:500 dilution). Embryos were then rinsed three times with 3 % BSA and 0.1% Tween in PBS and incubated for 1 h at

room temperature with a fluorophore conjugated anti-mouse or anti-rat antibody Alexa-fluor555 (A-21434) and Alexa-fluor647 (A-21247), respectively (Thermofisher; 1:500 dilution). Embryos were finally rinsed twice in PBS for 30 min. Images were acquired on a confocal microscope (Zeiss LSM 800).

HREM imaging

High Resolution Episcopic Microscopy was performed on E9.5 embryos as described (Mohun and Weninger), using the optical high-resolution microscope (indigo Scientific). Resulting datasets comprised 700 -1200 images of 1 * 1 μm size produced by repeated removal of 1-2 μm sections.

Determination of glucose and lactate blood concentration

Two small blood drops were obtained after a 0.5 mm section of tail tip. Blood glucose and lactate levels were measured using Contour XT glucometer (Bayer) and Lactate Scout (EKF Diagnostics for life) devices, respectively.

Temperature measurement

Infrared thermography was performed with the infrared digital thermographic camera E60: Compact Infrared Thermal Imaging Camera (FLIR) and data were analyzed by FLIR Quick Report software (FLIR ResearchIR Max 3.4; FLIR).

Internal temperature was obtained with a rectal probe adapted for pups (Bio-Thermo-Cis thermometer equipped with a Bio-Bret-3 rectal probe for mice; Bioseb).

Enzymatic assays

Cell extracts from small pieces of frozen tissues or embryos were obtained in an ice-

cold buffer (one ml for 20 mg of tissue or a pool of two embryos) containing 5 mM Hepes, pH 8.7, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.1% Triton X-100, using a Precellys homogenizer (Bertin), by 2 cycles of 8 s at 6,500 rpm. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Total activity of cytochrome oxidase (COX) and citrate synthase (CS) was assayed at 30 °C, pH 7.5, using standard spectrophotometric assays (Caffin et al., 2013).

Respiration measurement

Fresh mouse embryos or tissues were homogenized in the assay medium (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.2% BSA; pH 7.2) containing substrates for Complex I (10 mM pyruvate, 2 mM malate, 10 mM glutamate) and 2 mM ADP. Homogenization was performed in a Dounce homogenizer (Sigma). Homogenates were transferred to XF-V7 24-well plates (Seahorse Bioscience) and spun down for 20 min at 2000 *g*, 4°C. The oxygen consumption rate (OCR) was determined at 37°C with complex I substrates and ADP and then after subsequent addition of 10 mM succinate, 2 μM oligomycin, 4 μM FCCP and 0.4 μM antimycin A. At the end of the run, cells from the wells were collected by up and down pipetting, transferred into tubes, and centrifuged to discard the supernatant. Two successive washes of the pellet were done with PBS, then protein quantification was performed using the bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit -23225).

Extracellular acidification rate

Fresh tissues were homogenized in the assay medium (120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 15

mM D-Glucose. Homogenization was performed in a Dounce homogenizer (Sigma). Homogenates were transferred to XF-V7 24-well plates (Seahorse Bioscience) and spun down for 20 min at 2000 *g*, 4°C. The extracellular acidification rate (ECAR) was determined at 37°C after the addition of 2 µM oligomycin. At the end of the run, cells from the wells were collected by up and down pipetting, transferred into tubes, and centrifuged to discard the supernatant. Two successive washes of the pellet were done with PBS, then protein quantification was performed using the bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit -23225).

Western blot experiments

Frozen tissues were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid), supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay. Protein extracts from embryos were loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred to PVDF membranes using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Thereafter, blots were blocked for 60 min in 5% BSA and 0.1% Tween20 in TBS pH 7.4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl) at room temperature, followed by incubation with primary antibodies (anti-phospho-AMPK (ref. 2535) and anti-AMPK (ref. 2532) from Cell signaling; anti-HACD2 (orb33286) from Biorbyt; 1:1000) overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with an HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 60 min at room temperature and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by ImageJ software (v1.47, NIH).

Transmission electron microscopy

Tibialis anterior muscle, kidney, a small piece of liver, and the apical part of heart, or embryos, were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 4°C overnight. Samples were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer; postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate; gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Lipidomic analyses

Embryos, liver and kidney were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and protected from oxidation by a layer of argon gas and stored at -80 °C until analysis. Total phospholipid amount was determined with Corona CAD detection by calculating the concentration of each PL class (in µg/ml) compared to calibration ranges of commercial standards. Chromatographic system from ThermoFisher Scientific included a Dionex U-3000 RSLC system with 2 quaternary pumps, an autosampler and a column oven. The RSLC system was coupled on-line to a charged aerosol detector, Corona-CAD Ultra for the quantitative part of the study and a LTQ-Orbitrap Velos Pro for the lipidomic study (all from ThermoFisher). Liquid chromatography, mass spectrometry, phospholipid species identification and phospholipid species representation were performed as previously described (Moulin et al., 2015).

Acetylcholinesterase activity

Heart sections from *Hacd2^{+/-KO}* mice were prepared as for X-Gal staining. Histochemical localization of acetylcholine esterase (AChE) activity in the conduction system was performed with the esterase reaction (Karnowsky and Roots reaction). Briefly, we prepare a solution containing 0.173 mM of acetylthiocholine iodide, 0.01 mM of *tetraisopropyl pyrophosphoramidate* (iso-MPA), 60 mM of sodium acetate, 5 mM sodium citrate, 3 mM cupric sulfate and 5 mM of potassium ferricyanide in PBS. Three hundred microliters of this solution were put on sections for 30 minutes and then rinsed with PBS.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES

All data are presented as mean \pm s.e.m.. Datasets were analysed using GraphPad Prism. Differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Differences between groups were considered significant if the *P* value was less than 0.05, with *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01; ***: *P* < 0.001 versus WT.

References

- Al Amrani, F., Gorodetsky, C., Hazrati, L.-N., Amburgey, K., Gonorazky, H.D., and Dowling, J.J. (2020). Biallelic LINE insertion mutation in HADC1 causing congenital myopathy. *Neurol Genet* 6, e423.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HADC1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol* 7, 429–440.
- Caffin, F., Prola, A., Piquereau, J., Novotova, M., David, D., Garnier, A., Fortin, D., Alavi, M., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., et al. (2013). Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *J Physiol* 591, 6017–6037.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* 41, 261–273.
- Delavallée, L., Mathiah, N., Cabon, L., Mazeraud, A., Brunelle-Navas, M.-N., Lerner, L.K., Tannoury, M., Prola, A., Moreno-Loshuertos, R., Baritaud, M., et al. (2020). Mitochondrial AIF loss causes metabolic reprogramming, caspase-independent cell death blockade, embryonic lethality, and perinatal hydrocephalus. *Molecular Metabolism* 40, 101027.
- Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acid Length. *Cell* 130, 663–677.
- Diaz, M.B., Herzig, S., and Vegiopoulos, A. (2014). Thermogenic adipocytes: From cells to physiology and medicine. *Metabolism* 63, 1238–1249.
- Frazier, A.E., Thorburn, D.R., and Compton, A.G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J. Biol. Chem.* 294, 5386–5395.
- Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., and Shindou, H. (2014). Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* 55, 799–807.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very

long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Letters* 582, 2435–2440.

Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 1156–1163.

Kelly, R.G. (2016). Cardiac development and animal models of congenital heart defects. In *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart: Clinical Features, Human Genetics and Molecular Pathways.*, (Springer-Verlag), pp. 3–9.

Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev. Biol.* 230, 230–242.

Krug, E.L., Runyan, R.B., and Markwald, R.R. Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation - ScienceDirect.

Lu, Y.-W., and Claypool, S.M. (2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet* 6, 3.

Maguire, J.J., Tyurina, Y.Y., Mohammadyani, D., Kapralov, A.A., Anthonymuthu, T.S., Qu, F., Amoscato, A.A., Sparvero, L.J., Tyurin, V.A., Planas-Iglesias, J., et al. (2017). Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 8–24.

Maldonado, E.M., Taha, F., Rahman, J., and Rahman, S. (2019). Systems Biology Approaches Toward Understanding Primary Mitochondrial Diseases. *Front Genet* 10, 19.

Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A.I., Lenaz, G., and Genova, M.L. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1469–1480.

McCormick, E.M., Zolkipli-Cunningham, Z., and Falk, M.J. (2018). Mitochondrial disease genetics update: recent insights into the molecular diagnosis and expanding phenotype of primary mitochondrial disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 30, 714–724.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-

osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.

Mohun, T.J., and Weninger, W.J. Embedding Embryos for High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM).

Moulin, M., Solgadi, A., Veksler, V., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., and Chaminade, P. (2015). Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol Sex Differ* 6, 20.

Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., Deluca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., et al. (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5229–5236.

Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., and Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *Journal of Human Genetics* 64, 113–125.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084.

Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 408–417.

Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1417–1427.

Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., Khadhraoui, N., Gallerne, C., Molinié, T., Courtin, G., Guillaud, L., Gressette, M., Solgadi, A., Dumont, F., Castel, J., Ternacle, J., Demarquoy, J., Malgoyre, A., Koulmann, N., Derumeaux, G., Giraud, M.-F., Joubert, F., Veksler, V., Luquet, S., Relaix, F., Tiret, L., Pilot-Storck, F. Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and

energetic efficiency in muscle (*Accepted in Science Advances*, 11/01/2020)

Rantakari, P., Lagerbohm, H., Kaimainen, M., Suomela, J.-P., Strauss, L., Sainio, K., Pakarinen, P., and Poutanen, M. (2010). Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 12 is essential for mouse organogenesis and embryonic survival. *Endocrinology* 151, 1893–1901.

Renne, M.F., and de Kroon, A.I.P.M. (2018). The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes. *FEBS Lett.* 592, 1330–1345.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. i, and Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126, 3437–3447.

Sassa, T., and Kihara, A. (2014). Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* 22, 83–92.

Toscano, A., Emmanuele, V., Savarese, M., Musumeci, O., Torella, A., Conca, E., Moggio, M., Nigro, V., and Rodolico, C. (2017). Pseudo-dominant inheritance of a novel homozygous HACD1 mutation associated with congenital myopathy: The first caucasian family. *Neuromuscular Disorders* 27, S173.

Vafai, S.B., and Mootha, V.K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374–383.

Vincent, A.E., Ng, Y.S., White, K., Davey, T., Mannella, C., Falkous, G., Feeney, C., Schaefer, A.M., McFarland, R., Gorman, G.S., et al. (2016). The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Scientific Reports* 6, 30610.

Vrbacký, M., Kovalčíková, J., Chawengsaksophak, K., Beck, I.M., Mráček, T., Nůsková, H., Sedmera, D., Papoušek, F., Kolář, F., Sobol, M., et al. (2016). Knockout of Tmem70 alters biogenesis of ATP synthase and leads to embryonal lethality in mice. *Hum Mol Genet* 25, 4674–4685.

Wang, B., Pelletier, J., Massaad, M.J., Herscovics, A., and Shore, G.C. (2004). The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* 24,

2767–2778.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 43553–43556.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 29403–29408.

Acknowledgements

The authors are grateful to Camille Laisne and Diana Gelperowic for taking care of mice; the Knock-Out Mouse Program (the “KOMP”) for initially providing the ES cell lines carrying the knockout allele of *Hacd2*; F. Langa-Vives (CIGM, Institut Pasteur) for the generation of *Hacd2*-knockout mice; Jean-Paul Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; Martine Letheule for electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); imaging platform from the Imagine Institute (Paris) for HREM analysis; Sigolène Meilhac and Lucile Miquerol for insightful discussions and mouse lines; Stéphane Zaffran and Marianne Gervais-Taurel for sharing reagents; Caroline Choquet, Christopher De Bono, Isabelle Lagrange, Sophie Chateau, Jean-Luc Servely, Edouard Reyes-Gomez, Pierre Deshuilliers, Nicolas Blanchard-Gutton and Julie Da Silva for technical help in histological and biochemical analyses; Geneviève Derumeaux for performing echocardiographic analysis; Roberto Motterlini, Roberta Foresti and Santos Susin (Cordeliers Institute) for providing access to Seahorse apparatus; Luisa Dandolo for providing access to the radioactivity platform of the Cochin Institute (Paris); Caroline Gilbert for sharing the infrared camera.

N.K.’s PhD fellowship has been financially supported by the French “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). The work was primarily supported by the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-12-JSV1-0005) and the “Association Française contre les Myopathies” (AFM 16143 and Translamuscle). The authors declare that they have no conflict of interest.

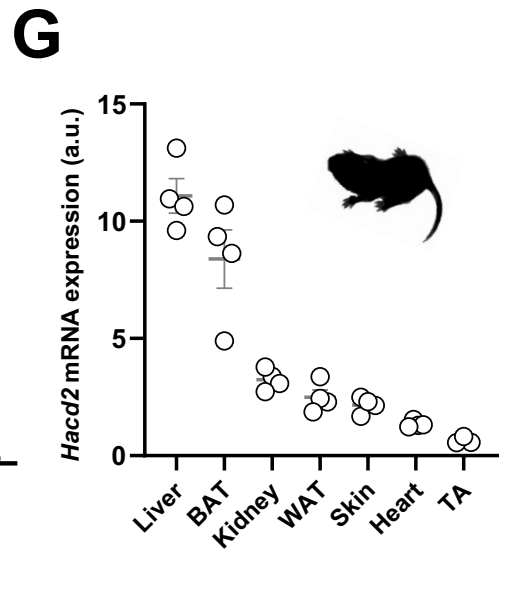
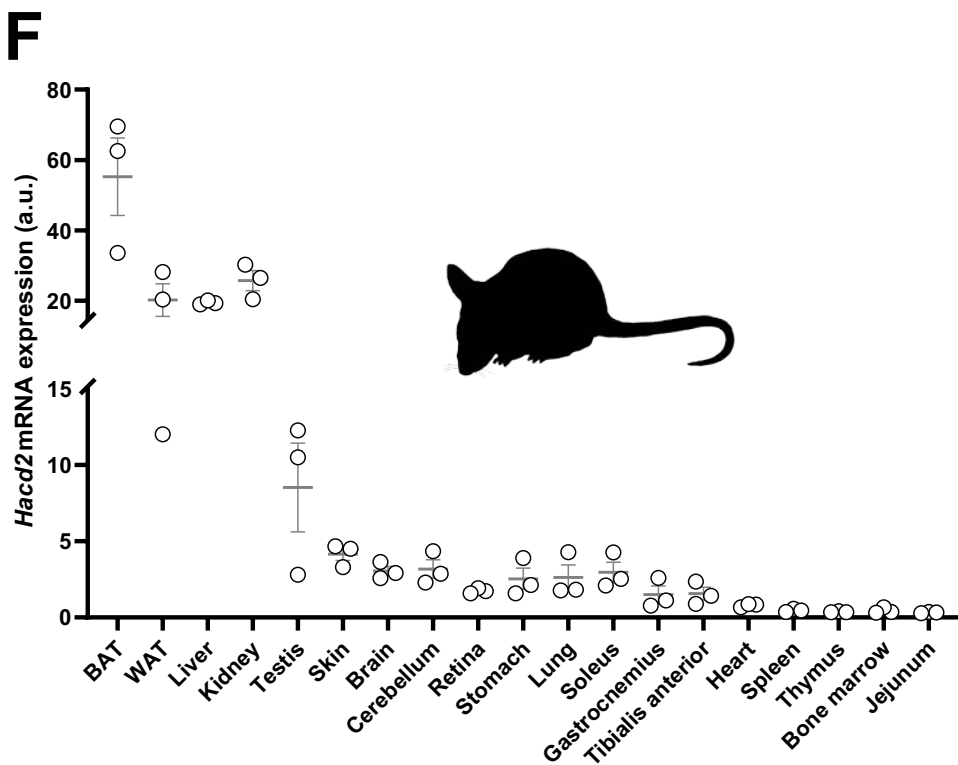
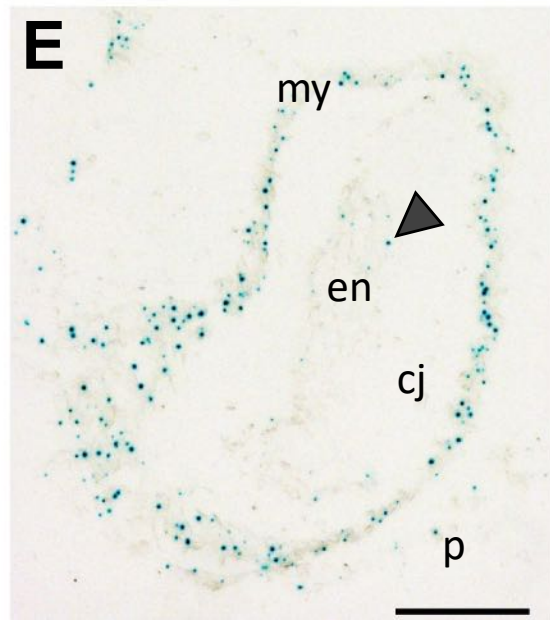
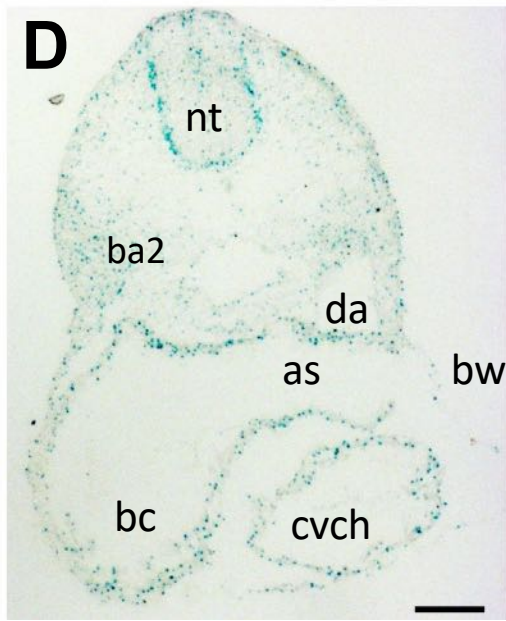
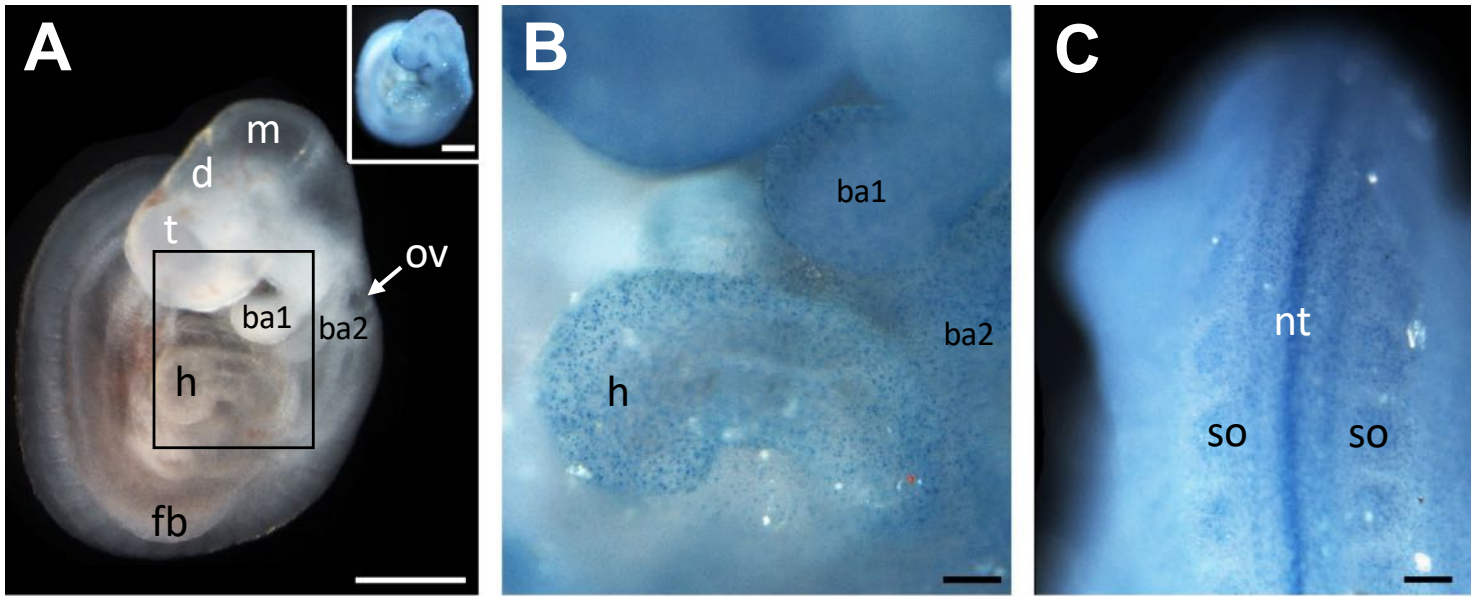


Figure 1

Figure 1 | *Hacd2* expression during embryonic development and adulthood.

(A-E) Expression pattern of *LacZ*-expressing cells on whole-mount **(A-C)** and transverse sections **(D,E)** of E9.5 *Hacd2*^{KO/+} embryos. **(A)** At this stage, embryos have 20-22 pairs of somites, they have turned, and two pharyngeal bars and the forelimb are clearly visible. After X-Gal staining, the embryo is uniformly blue (inset), reflecting ubiquitous expression of *Hacd2*. **(B)** Focus on the region outlined in (A), showing *Hacd2* expression in the embryonic heart and branchial arches. **(C)** Dorsal view of the embryo showing *Hacd2* expression in the neural tube and somites. **(D)** All cell layers of the embryo express *Hacd2*, here on a transverse section at the level of the heart. **(E)** In the heart, staining is clearly visible in the pericardium, myocardium and endocardium (arrowhead). **(F)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in adult WT mice, normalized to *Actin* mRNA. **(G)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in WT pups at postnatal day nine (P9), normalized to *Rpl32* mRNA. as is aortic sac; ba1, first branchial arch; ba2, second branchial arch; bc, *bulbus cordis*; bw, body wall, consisting in this region of pericardium and surface ectoderm; cj, cardiac jelly; cvch, common ventricular chamber of the heart; d, diencephalon; da, dorsal aorta; en, endocardium; h, heart; m, mesencephalon; my, myocardium; nt, neural tube; ov, otic vesicle; p, pericardium; so, somite and t, telencephalon. Scale bars are 500 μm in A and 100 μm in B-E. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean.

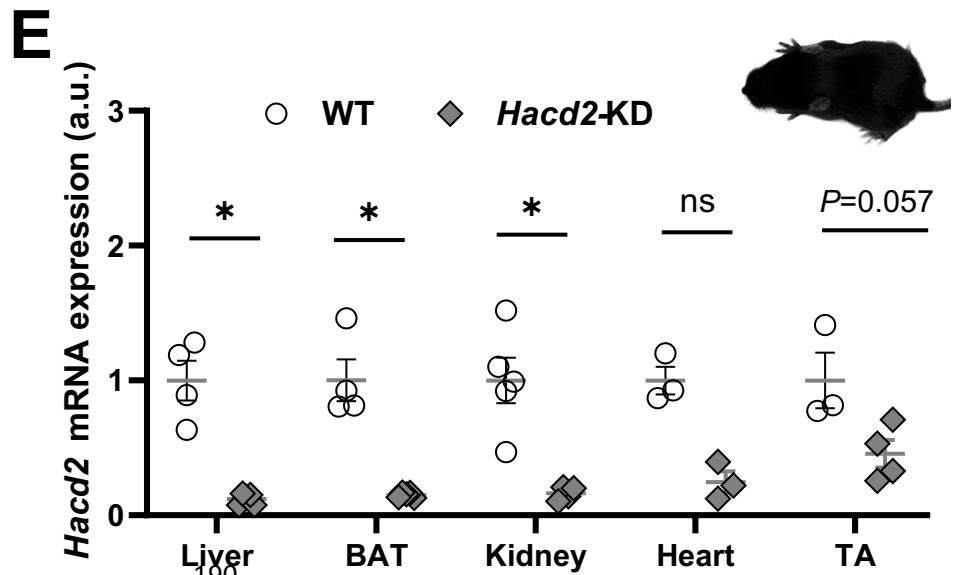
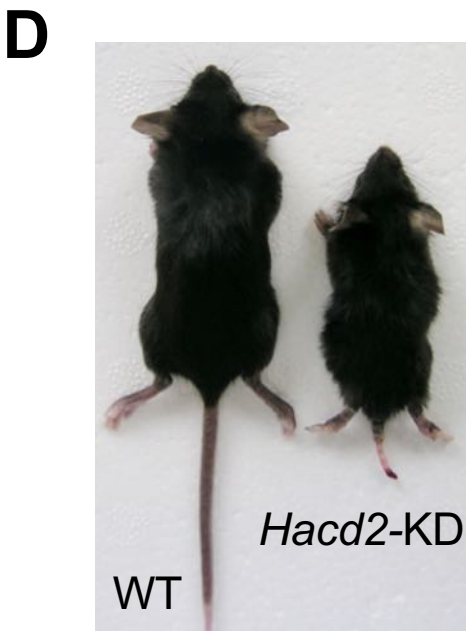
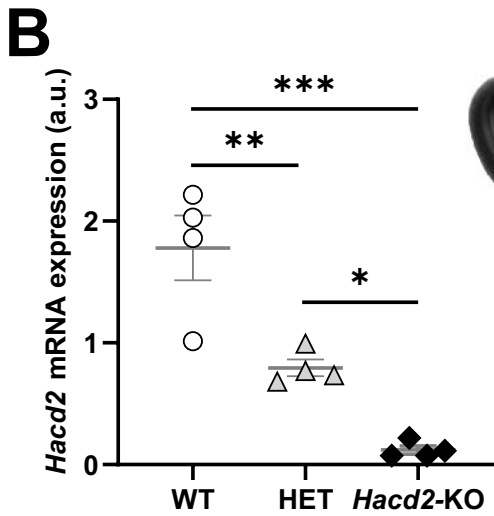
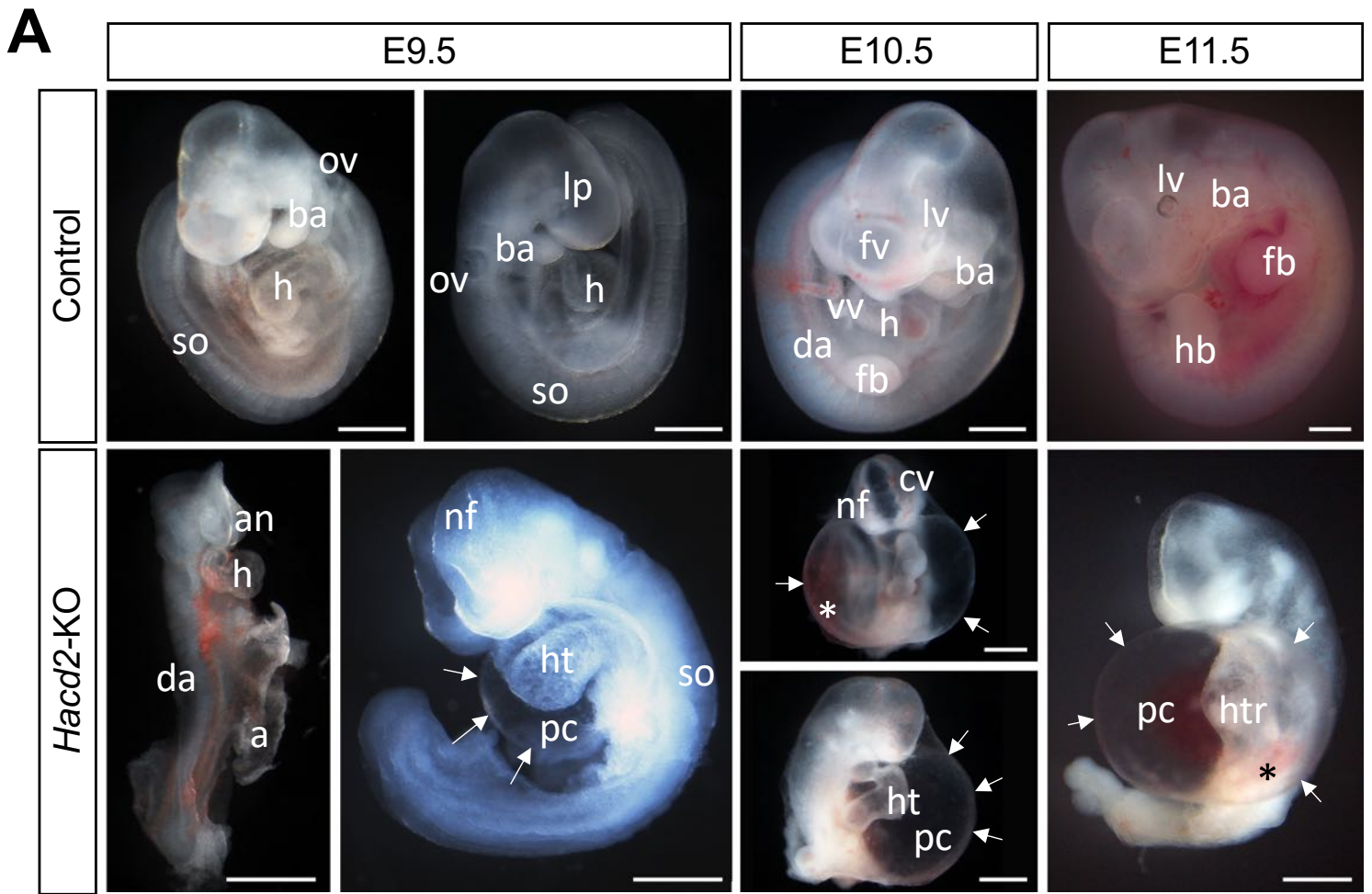


Figure 2

Figure 2 | Embryonic and postnatal lethality associated with *Hacd2* deficiency.

(A) Representative control and knockout (*Hacd2*-KO) embryos from E9.5 to E11.5. Note the reduced size of *Hacd2*-KO embryos, some of them exhibit a poorly defined tail and rudimentary head parts, with anterior and posterior neuropores still open. Most *Hacd2*-KO embryos display a pericardial edema (delimited by white arrows). Erythrocytes are visible in dorsal aorta, but they are seldom seen in head vessels and very often found sedimenting in the pericardial cavity (asterisk). In the most advanced embryos, the beating heart is not compartmentalized, in a U-shaped tubular form that contains no erythrocytes. **(B)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in WT, *Hacd2*^{+/*KO*} (HET) and *Hacd2*-KO embryos at E9.5, normalized to the expression of *Rpl32* mRNA. **(C)** Western blot for HACD2 protein (expected size is 37 kDa) in four WT and four *Hacd2*-KO embryos at E9.5. **(D)** Representative picture of WT (left) and *Hacd2*^{flox/flox} (*Hacd2*-KD) littermates at postnatal day 22 (P22). **(E)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in tissues from WT and *Hacd2*-KD pups at P14, normalized to *Rpl32* mRNA. In (A), a is amnion; an, anterior neuropore; ba, branchial arch; cv, cephalic vessel; da, dorsal aorta; fb, forelimb bud; fv, forebrain vesicle; h, heart; hb, hindlimb bud; ht, heart tube; htr, heart tube remnant; lp, lens placode; lv, lens vesicle; nf, neural folds; ov, otic vesicle; pc, pericardial cavity; so, somites and vv, vitelline vein. In (E), BAT, brown adipose tissue; TA, *tibialis anterior* muscle. Scale bars are 500 μ m in A. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$.

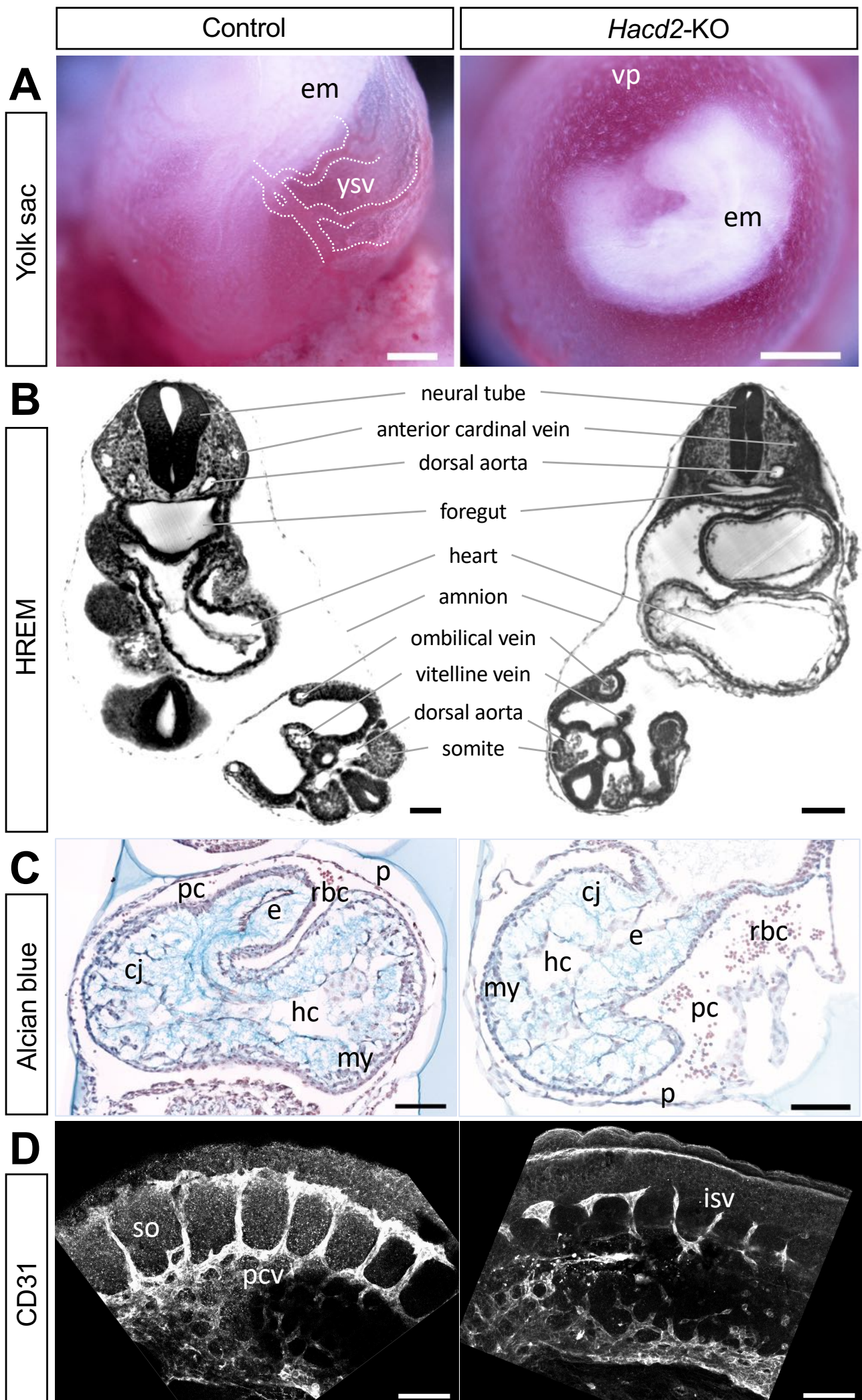


Figure 3

Figure 3 | Anomalies of cardiovascular development in E9.5 *Hacd2*-KO embryos.

(A) Representative pictures of the yolk sac surrounding the embryo (em). At this stage, yolk vascularization in the control is composed of vessels filled with red blood cells (ysv). These vessels form a tree-like network (part of which has been outlined by dotted lines) distributed over the entire surface of the sphere. In *Hacd2*-KO embryos, the early stage of a capillary plexus, formed of unconnected cell islands, is identifiable and no red blood cells are visible. **(B)** Cross-section allowing the visualization of the heart of embryos that have completed their turning, observed in high-resolution episcopic microscopy (HREM). In the *Hacd2*-KO embryo, the two cardiac cavities correspond to a stage of U-shaped heart tube arranged on the rostro-caudal axis. They are bordered by a myocardium of reduced thickness. The general organization of the embryo is similar to that of the control and all the anatomical structures are visible. In particular, all vessels are present, in the right place and lumenized. The diameter of the umbilical veins, filled with red blood cells, is increased while the diameter of the dorsal aorta is reduced. **(C)** Transverse histological cross-section stained with alcian blue, which reveals the presence in the *Hacd2*-KO embryo of cardiac jelly, present between the endocardium and the myocardium, which is less thick. The heart is not compartmentalized and barely returned. **(D)** Z-stack in confocal microscopy of blood vessels revealed by labelling of endothelial cells with an anti-CD31 antibody. Vascular projections between somites are poorly visible in *Hacd2*-KO embryo, whereas they are regular and interconnected in the control. cj is cardiac jelly ; e, endocardium ; em, embryo ; hc, heart chamber ; isv, intersomitic vessel; my, myocardium; p, pericardium ; pc, pericardial cavity ; pcv, posterior cardinal vein; rbc, red blood cells ; so, somite; vp, vascular plexus and ysv, yolk sac vessel. Scale bars are 500 nm (A) et 100 nm (B-D).

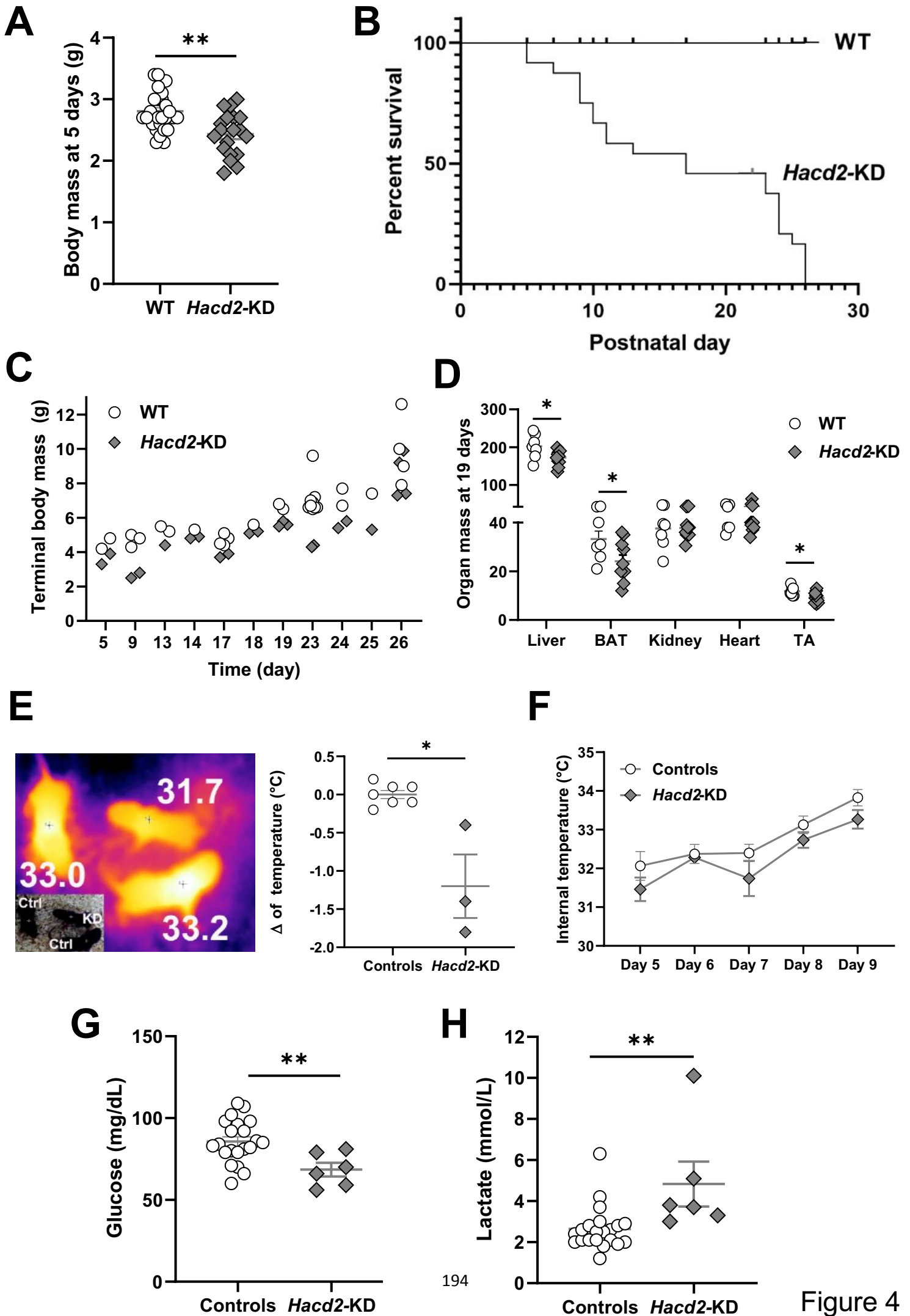


Figure 4

Figure 4 | Postnatal systemic disease of *Hacd2*-KD mice.

(A) Body mass of WT and *Hacd2*-KD pups at P5. **(B)** Percent survival of *Hacd2*-KD pups compared to WT. **(C)** Terminal body mass of *Hacd2*-KD pups compared to WT littermates. For each day, data correspond to *Hacd2*-KD pups euthanized at their terminal stage (humane endpoint), along with their control littermates that were euthanized the same day. **(D)** Mass of liver, brown adipose tissue (BAT), kidney, heart and tibialis anterior muscle (TA) in *Hacd2*-KD mice and their littermates at P19, corresponding to the terminal stage of *Hacd2*-KD mice (humane endpoint). **(E)** Representative thermographic image of the back of an *Hacd2*-KD pup (KD) and two control littermates (ctrl) at P7, and quantification of the deviation of *Hacd2*-KD pups at the highest temperature of the interscapular region compared to controls. **(F)** Internal temperature in control and *Hacd2*-KD mice (*Hacd2*-KD, n = 6 and controls, n = 11). **(G-H)** Glycemia **(G)** and lactatemia **(H)** in *Hacd2*-KD growing pups at P7 and control littermates. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

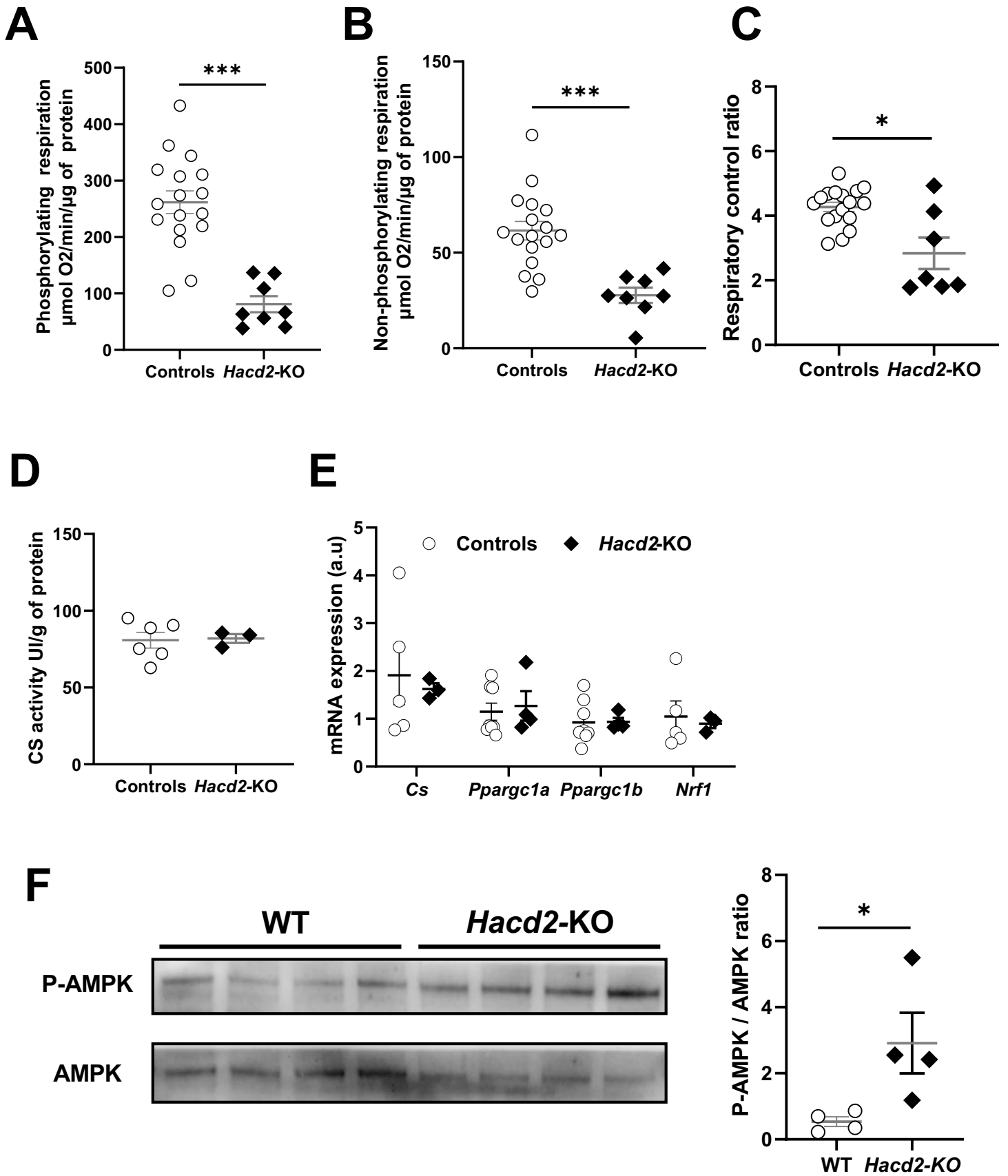


Figure 5 | Impaired mitochondrial function in *Hacd2*-KO embryos.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis of whole embryos homogenates at E9.5. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** Citrate synthase (CS) activity in whole embryos, as a marker of mitochondrial mass. **(E)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*), normalized to *Rpl32* mRNA. **(F)** Representative immunoblots and quantification of phospho-AMPK and total AMPK in WT and *Hacd2*-KO embryos. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

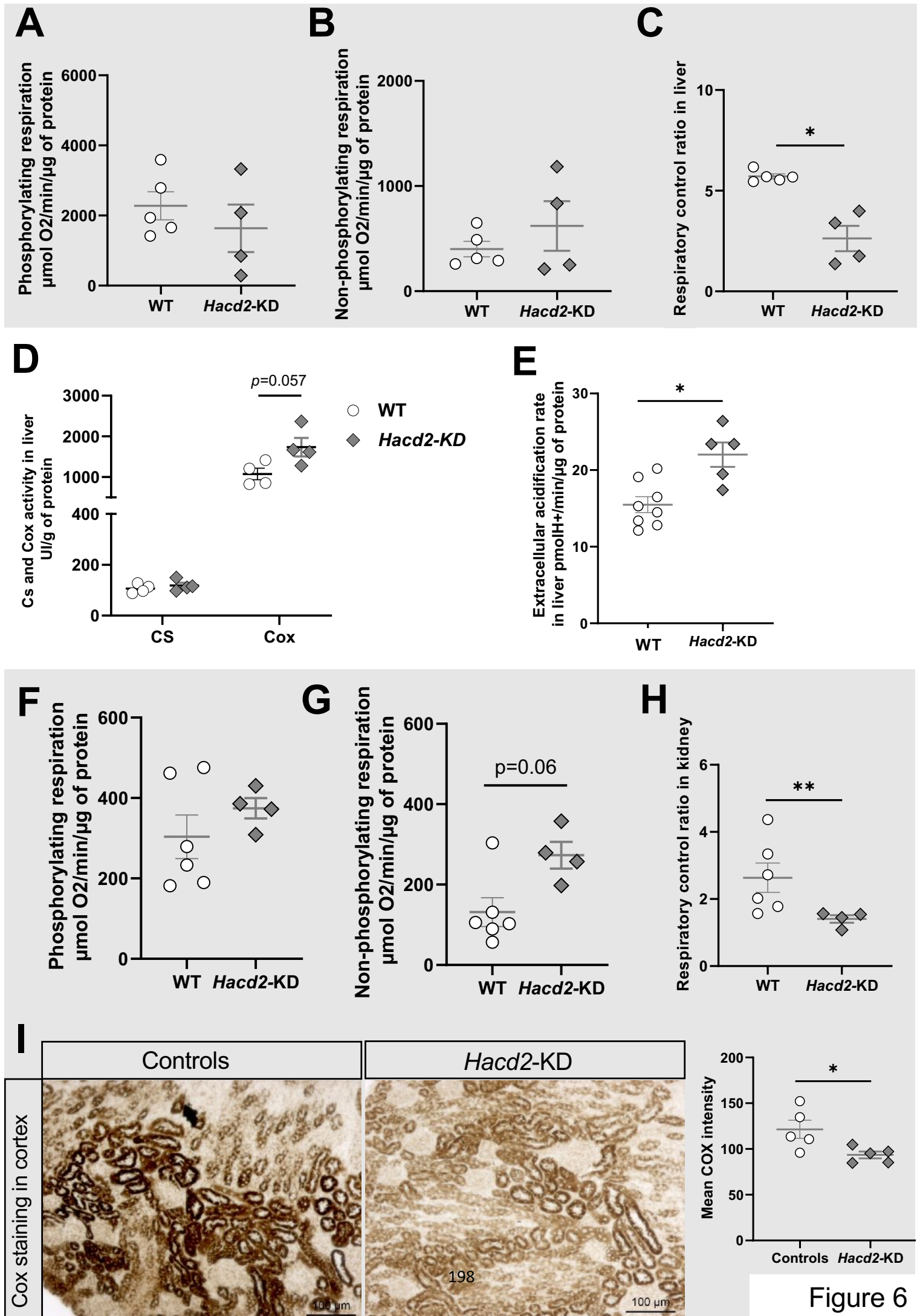
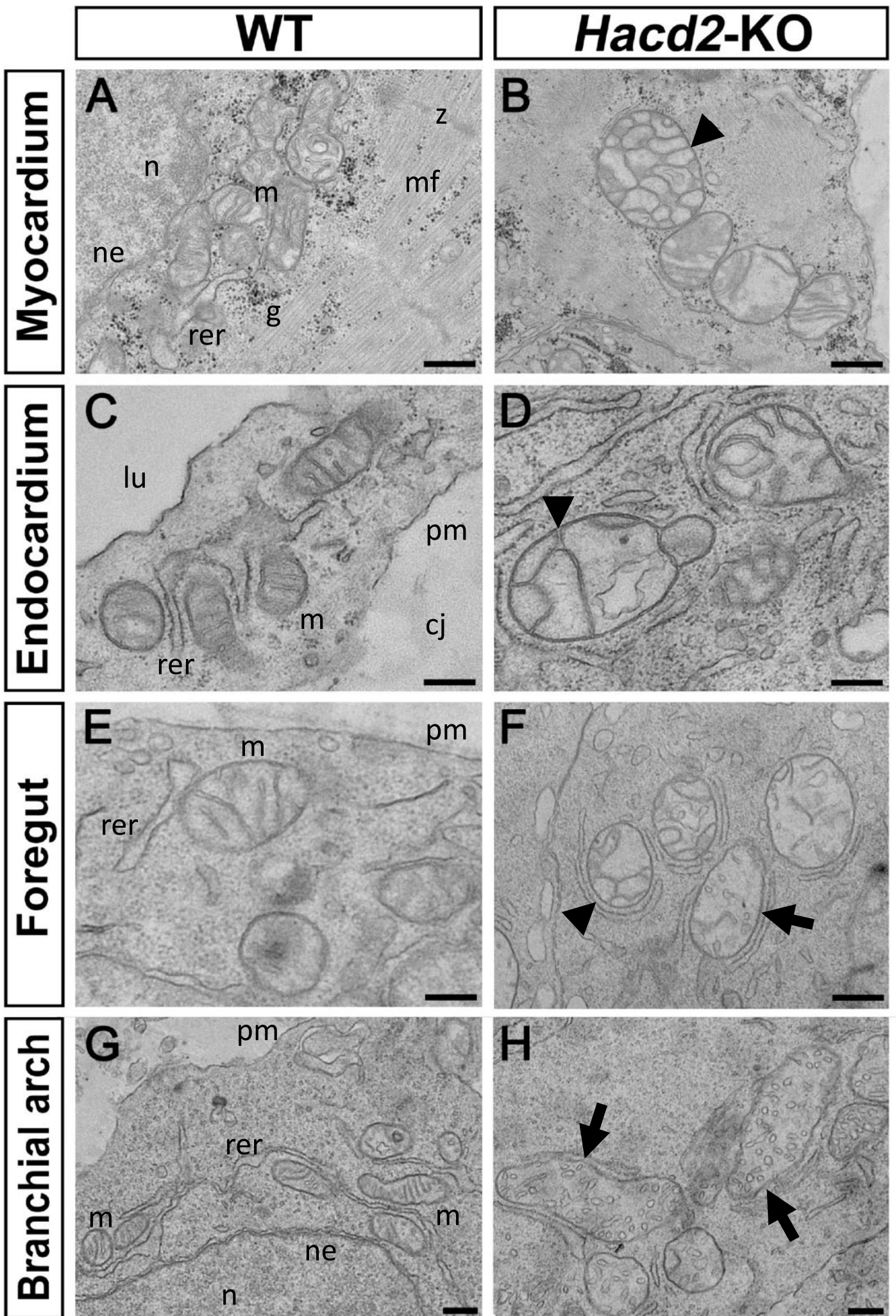


Figure 6 | Impaired mitochondrial function in liver and kidney of *Hacd2*-KD mice.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis on liver homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** Citrate synthase (CS) and COX activity in liver. **(E)** Extracellular acidification rate in liver extracts from *Hacd2*-KD pups and their control littermates. **(F-H)** Seahorse oxygraphy analysis on kidney homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(F)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(G)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **F** and **G**) **(H)**. **(I)** COX activity staining in kidney cortex. Data with a grey background (**A-C** and **F-I**) correspond to growing *Hacd2*-KD pups and control littermates while other data correspond to *Hacd2*-KD after growth arrest, and their control littermates (**A-C** and **F-H** at P9, **I** at P14, **E** at P21, **D** at P26). Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean.

*, $P < 0.05$.



200

Figure 7

Figure 7 | Impaired mitochondrial organization in *Hacd2*-KO embryos.

(A-H) Transverse sections from E9.5 wild-type (WT) and *Hacd2*-KO embryos were examined by transmission electron microscopy. Images are representative of cells from the myocardium (**A** and **B**), endocardium (**C** and **D**), foregut (**E** and **F**) and branchial arch (**G** and **H**). (**A, C, E** and **G**) Ultrastructural organization of WT cells reveals an active rough endoplasmic reticulum and fields of mitochondria with evidence of tubular-shaped invaginations (cristae) of their internal membrane, unambiguously identified on the same plane than the outer membrane. Myocardial cells are clearly identified by the presence of developing sarcomeres, organized between z-lines, adjacent to numerous glycogen rosettes. (**B, D, F** and **H**) All cell types from age-matched *Hacd2*-KO embryos display a rather normal global organization, with similar cytoplasm, nucleus and rough endoplasmic reticulum membrane systems. However, in all cell types, many mitochondria appear dilated and are abnormally compartmentalized (arrow heads) or present excessive vesiculation of cristae (arrows). cj, cardiac jelly; g, glycogen rosettes; lu, lumen; m, mitochondrion; mf, myofibrils; n, nucleus; ne, nuclear envelope; pm, plasma membrane; rer, rough endoplasmic reticulum and z, z-line. Scale bars are 250 nm.

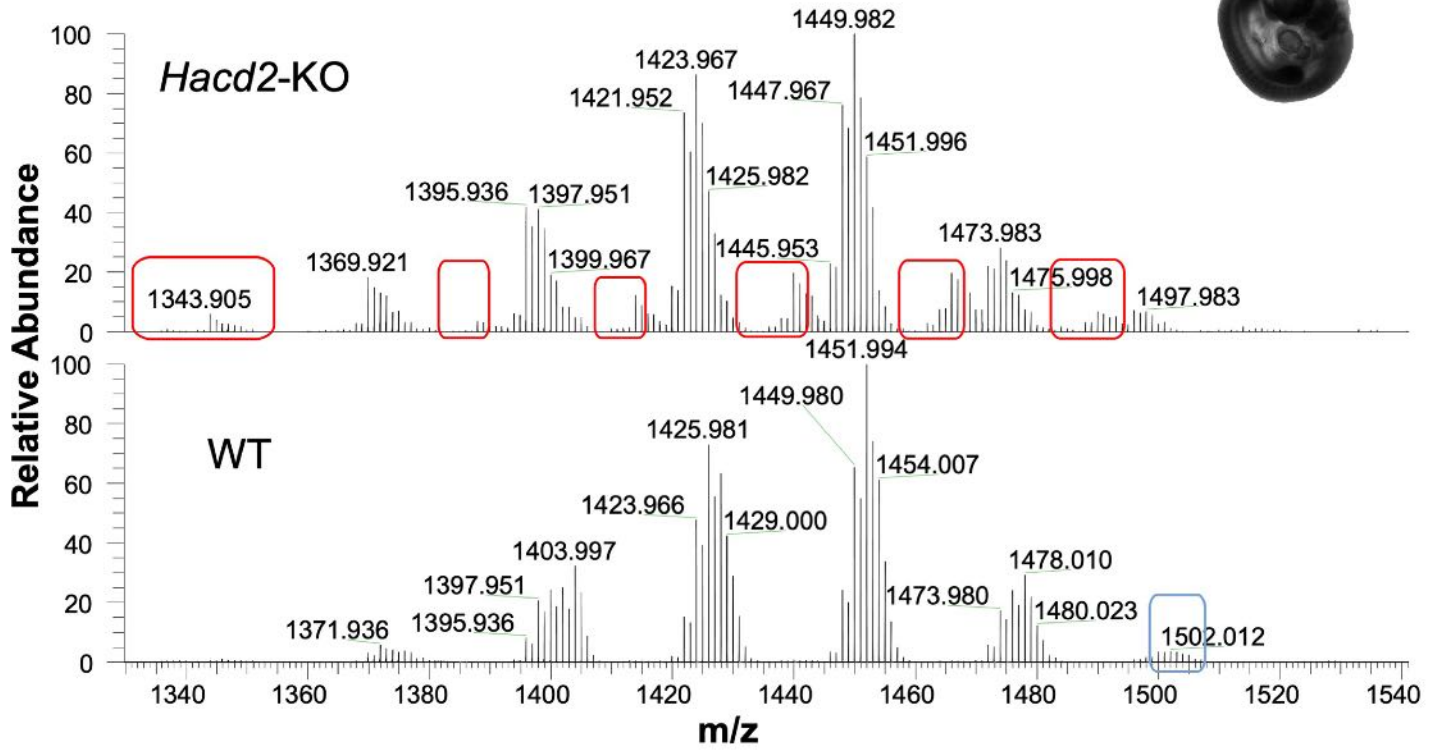
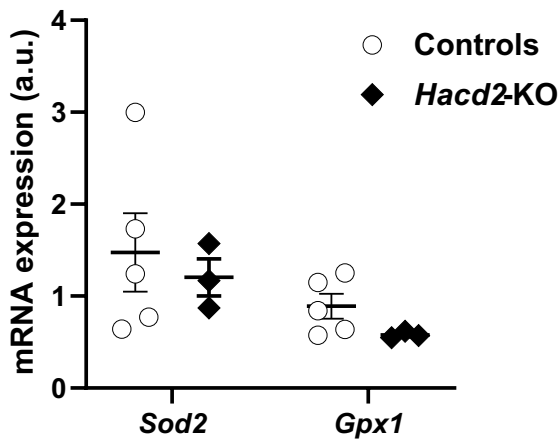
A**B**

Figure 8 | Qualitative remodeling of cardiolipin in E9.5 *Hacd2*-KO embryos.

(A) Representative spectral analysis of cardiolipin (CL) identified by LC/MSⁿ, normalized in each genotype to the highest peak set at 100. Each peak represents the relative abundance of the corresponding m/z related to a specific CL. On this profile, the spectrum of WT embryos is also found in *Hacd2*-KO embryos, but in *Hacd2*-KO the value of the dominant species is globally lowered by 2 m/z points (compare for example 1449.982 to 1451.994), which is explained by the loss of 2 hydrogen atoms during the unsaturation of a bond between two carbons. In addition, the spectrum of *Hacd2*-KO embryos shows additional CL, here outlined in red, very weakly present or undetectable in WT and identified as mono- or di-oxidized CL. Injected samples were extracted from a pool of four WT and four *Hacd2*-KO embryos. **(B)** mRNA expression of genes involved in oxidative stress response, normalized to *Rpl32* mRNA.

Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table S1 | Mitochondrial respiration rates of *Hacd2*-KO embryos at E9.5.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in control and *Hacd2*-KO embryos at E9.5. RCR: Respiratory Control Ratio. n = 4 WT and 13 *Hacd2*^{+/*KO*} for control embryos and n=8 for *Hacd2*-KO embryos.

Supplementary Table S2 | Mitochondrial respiration rates of WT *Hacd2*-KD mice.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in WT and *Hacd2*-KD littermates at P9 for the liver, kidney, *tibialis anterior* muscle (TA), heart, brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT). RCR: Respiratory Control Ratio. n = 5 for WT mice and n=4 for *Hacd2*-KD mice.

Table S3: Sequence of PCR primers for *Hacd2* alleles genotyping.

Related to Materials and methods.

Each pair of primers gives rise to a PCR product for the corresponding allele. *Hacd2*-KD pair of primers also gives a PCR product for *Hacd2*-KO and *Hacd2*-cKO alleles whereas all other pairs are specific of the corresponding allele.

Table S4: Sequence of other PCR and qPCR primers.

Related to Materials and Methods.

Supplementary Figure S1 | Recombined alleles at *Hacd2* locus.

(A) Organization of *Hacd2* locus after insertion of the targeting vector by homologous recombination, and structure of the resulting *Hacd2^{fllox}* allele. **(B)** Structure of *Hacd2^{KO}* allele after excision of the *Neo* cassette and exon 2 of *Hacd2* gene by a ubiquitous Cre recombinase. **(C)** Structure of *Hacd2^{cKO}* allele after excision of the LacZ and *Neo* cassettes by a ubiquitous Flippase. For each allele, the resulting mRNA and their approximate ratios are indicated. *: stop codon introduced by exon 2 excision and the resulting frameshift.

Supplementary Figure S2 | Expression of *LacZ* reporter gene in cardiac conduction system.

(A) Representative X-Gal staining in the heart from adult WT and *Hacd2^{KO/+}* (HET) mice. Note the diffuse staining in the atria, and the specific staining at the atrioventricular junction and in bundles in the septum consistent with the conduction system. Scale bar=1 mm. **(B)** Histological section in the region of the atrioventricular junction stained with X-Gal (left) or for acetylcholinesterase activity (right) showing a staining consistent with the atrioventricular node.

Supplementary Figure S3 | Recombination induced by *Tek-Cre* and *Mesp1-Cre* recombinases during embryonic development.

(A) Expression of a ubiquitous dual fluorescent protein encoded by the *ROSA^{mTmG}* allele in whole mount embryos at E10.5 for *Tek-Cre* and E9.5 for *Mesp1-Cre*. Without Cre-induced recombination (upper part), a diffuse RFP fluorescence is ubiquitously observed. In embryos expressing Cre recombinase, recombination of the *mTmG* locus shifts RFP to GFP fluorescence in the corresponding cells, *i.e.* in vascular structures

in embryos bearing the *Tek*-Cre transgene (middle part) and in the cardiac structures in embryos bearing the *Mesp1*-Cre transgene (lower part). **(B)** Whole mount pictures of WT and *Hacd2*^{ckO/KO}; *Tek*-Cre⁺ yolk sac and embryos at E10.5. **(C)** Residual mRNA expression of *Hacd2* in the heart of *Hacd2*^{ckO/KO}; *Mesp1*-Cre⁺ adult mice compared to controls.

Supplementary Figure S4 | Histological structure of the kidney, liver and *tibialis anterior* muscle from *Hacd2*-KD mice.

Representative pictures of histological section of kidney, liver and tibialis anterior (TA) muscle of *Hacd2*-KD growing pups and WT littermates at P14 stained with hematoxylin and eosin. Scale bars are 50 μ m for kidney and liver and 20 μ m for TA.

Supplementary Figure S5 | Impaired mitochondrial function in brown adipose tissue, liver and kidney of *Hacd2*-KD mice.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis on brown adipose tissue homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*, *Tfam*) in liver, normalized to *Rpl32* mRNA. **(E)** Citrate synthase (CS) and COX activity in kidney. **(F)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*, *Tfam*) in kidney, normalized to *Rpl32* mRNA. **(G)** Extracellular acidification rate in kidney extracts from *Hacd2*-KD pups and their control littermates. Data with a grey background **(A-C)** cor-

respond to growing *Hacd2*-KD pups and control littermates while others (D-G) correspond to *Hacd2*-KD after growth arrest, and their control littermates (A-C at P9, G at P21, D-F at P26). Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$.

Supplementary Movie S1 | Cardiovascular defects in a E10.5 *Hacd2*-KO embryo.

Representative *Hacd2*-KO embryo at E10.5 with delayed development and growth retardation. Compared to a control embryo, there is a very weak staining of the embryonic vessels by red blood cells, which can be seen sedimented in the edematous pericardial cavity. The heart, which still has the U-tube shape of a E8.5 embryo, is animated by rhythmic contractions and contains no blood cells either.

Table S1: Mitochondrial respiration rates of *Hacd2*-KO embryos at E9.5.

	Control embryos	<i>Hacd2</i>-KO embryos	<i>P</i>
Complex I	72,5 ± 6,4	39,7 ± 11,7	0,02
Complex I+II	261,6 ± 20,0	80,7 ± 14,3	<10 ⁻³
Complex II	194,0 ± 20,7	51,0 ± 12,3	<10 ⁻³
+ Oligomycin	61,5 ± 4,9	27,8 ± 4,0	<10 ⁻³
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	4,3 ± 0,1	2,8 ± 0,5	0,02

Table S2: Mitochondrial respiration rates of WT and *Hacd2*-KD mice.

Liver	WT	<i>Hacd2</i>-KD	<i>P</i>
Complex I	1424,8 ± 325,5	1641,4 ± 742,2	0,90
Complex I+II	2277,4 ± 401,8	1635,8 ± 676,4	0,555
Complex II	852,6 ± 312,5	-5,6±757,6	0,292
+ Oligomycin	400,6 ± 73,8	620,1 ± 236,2	0,999
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	5,7 ± 0,1	2,6±0,6	0,015
Kidney			
Complex I	178,8 ± 35,8	348,8 ± 35,5	0,038
Complex I+II	303,6 ± 54,2	374,3 ± 25,2	0,476
Complex II	124,8 ± 22,9	25,5 ± 52	0,083
+ Oligomycin	131,6 ± 35,8	273,1 ± 33,1	0,066
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,1	0,009
TA			
Complex I	4,2 ± 0,8	8,8 ± 3,9	0,196
Complex I+II	64,1 ± 10,7	69,5 ± 17,9	0,790
Complex II	60 ± 10,9	60,7 ± 17,1	0,969
+ Oligomycin	31,1 ± 5,3	32,2 ± 8	0,922
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,713
Heart			
Complex I	2344,2 ± 413,3	2022,3 ± 658,8	0,675
Complex I+II	3259,9 ± 681,8	2327,7 ± 252,1	0,353
Complex II	915,7 ± 446,1	304,7 ± 605,4	0,441
+ Oligomycin	1574,8 ± 329,1	1164,9 ± 412	0,470
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,6	0,673
BAT			
Complex I	6179,2 ± 1060,2	2819,4 ± 621	0,06
Complex I+II	8539,4 ± 1633,8	4100,3 ± 595,4	0,031
Complex II	2360,3 ± 878	1280,9 ± 211,2	0,322
+ Oligomycin	4598,2 ± 966,7	2241,9 ± 307,9	0,030
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	1,9 ± 0	1,8 ± 0	0,255
WAT			
Complex I	13,9 ± 5,4	19,9 ± 6,8	0,521
Complex I+II	29,5 ± 11,4	42,6 ± 17,8	0,541
Complex II	18,4 ± 6,7	22,7 ± 11,3	0,739
+ Oligomycin	17,1 ± 7,1	23 ± 8,5	0,607
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,832

Table S3: Sequence of PCR primers for *Hacd2* alleles genotyping.

Related to Materials and methods.

Each pair of primers gives rise to a PCR product for the corresponding allele.

Hacd2-KD pair of primers also gives a PCR product for *Hacd2*-KO and *Hacd2*-cKO alleles.

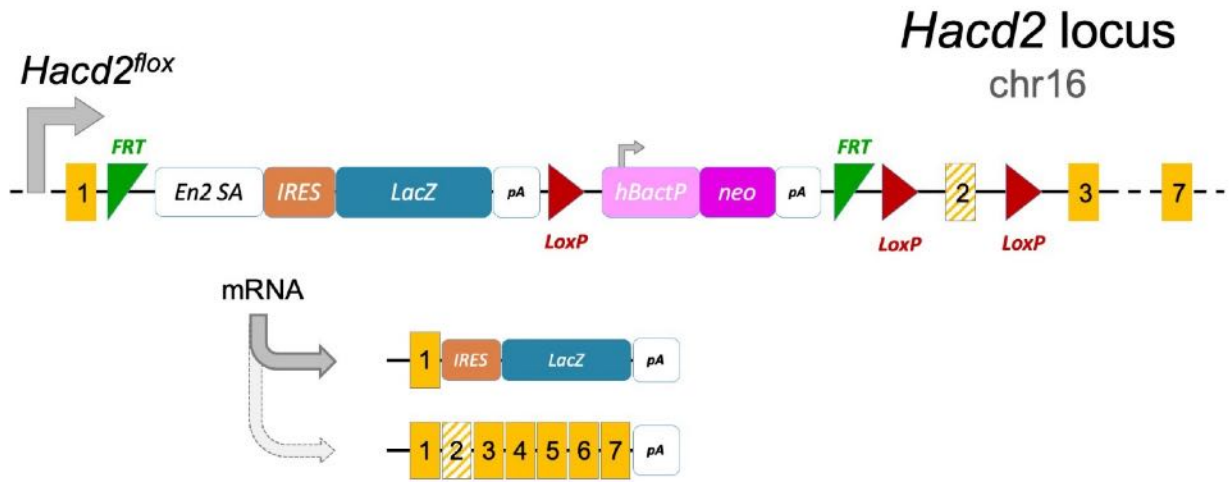
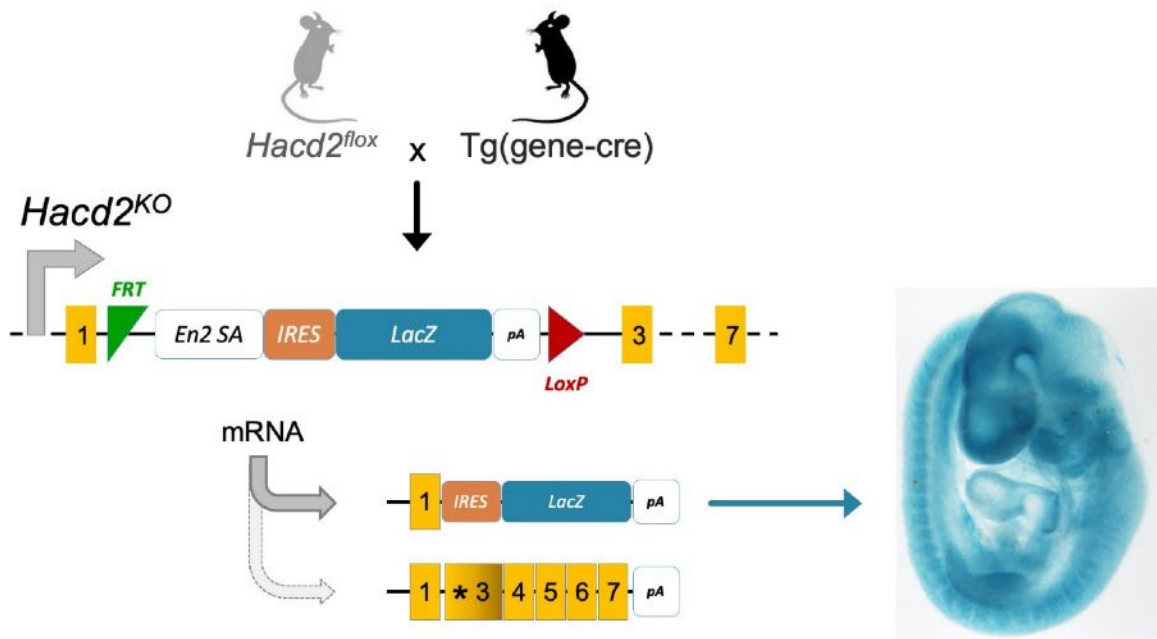
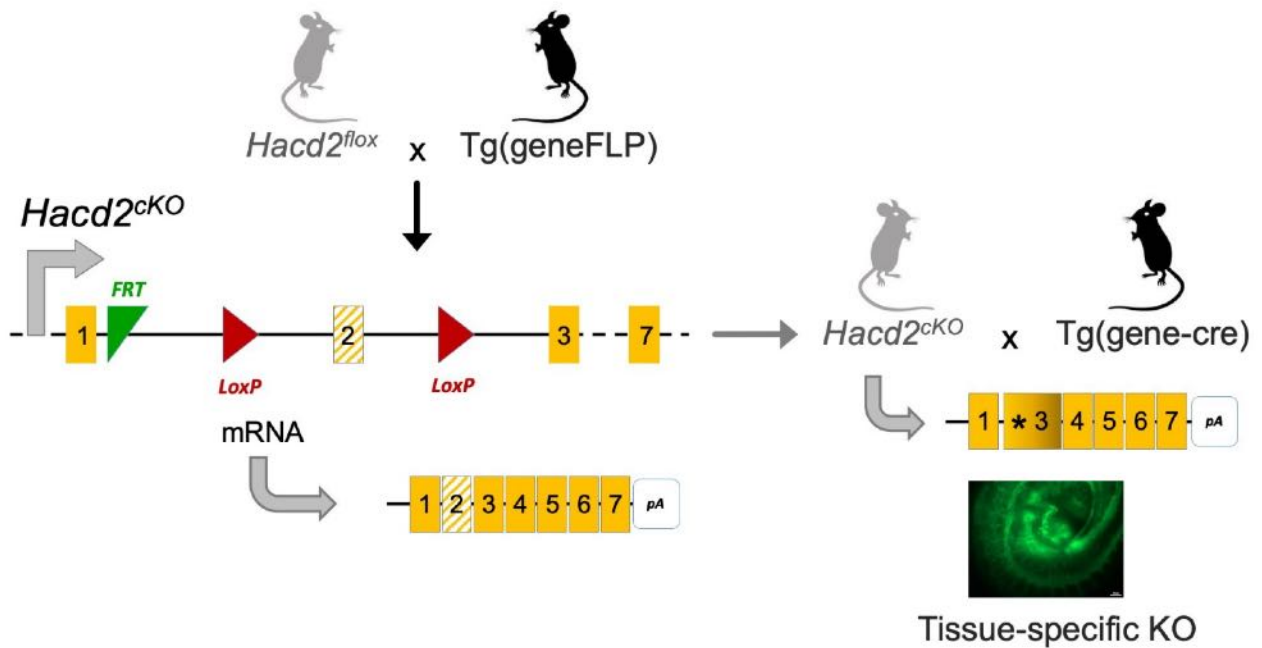
All other pairs are specific of the corresponding allele.

Allele	Forward primer	Reverse primer
<i>Hacd2</i> -WT	CTCCAGCTTTAAAGGAAATCAAATG	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -KD	ACGAAGTTATGGTCTGAGCTCGC	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -KO	CCACACCTCCCCCTGCAACCTG	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -cKO	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC	GCTGGGTCTATAGATATCTCGAC

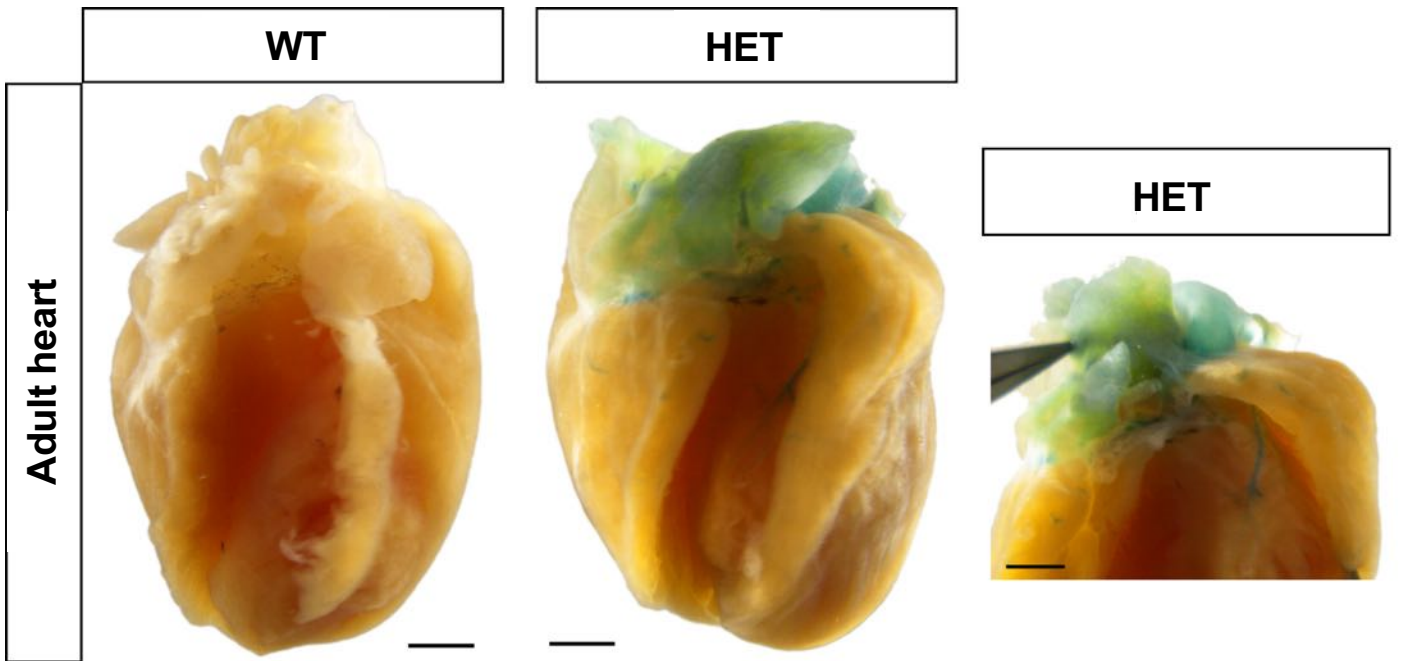
Table S4: Sequence of other PCR and qPCR primers.

Related to Materials and methods.

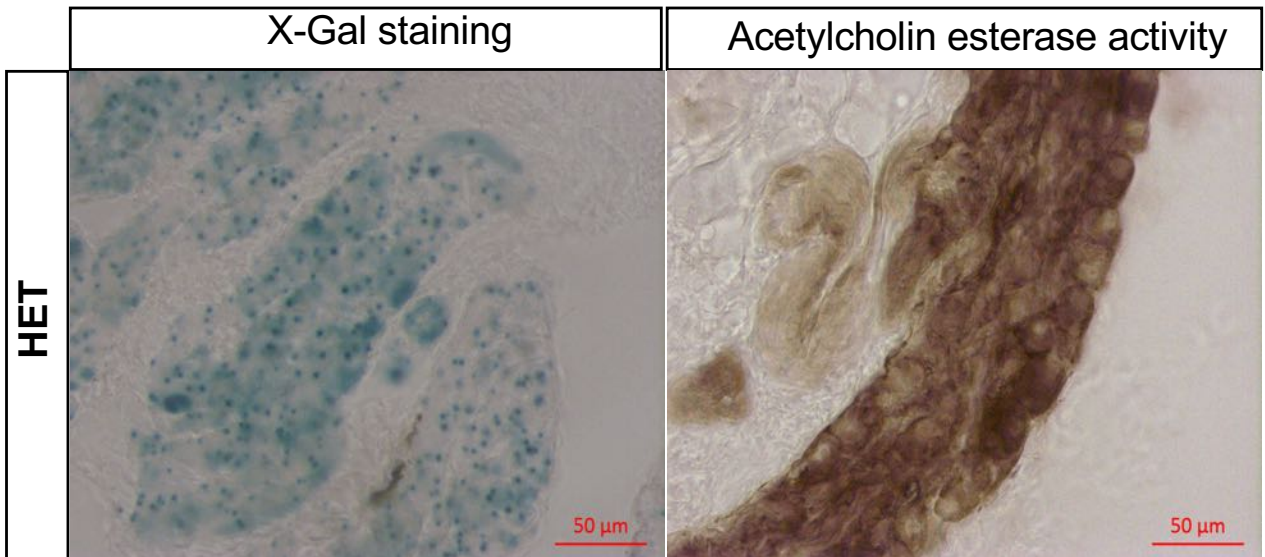
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Hacd2</i>	TGCTATAGGGATTGTGCCATC	ACGGATAATTTCCGTGATTGTCC
<i>Actin</i>	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTTCTCAAACATGATCTGGG
<i>CS</i>	CAAGATTGTGCCCAATATCCTC	TTCATCTCCGTCATGCCATA
<i>Ppargc1a</i>	AGACAGCTTTCTGGGTGGA	GCTAGCAAGTTTGCCTCATT
<i>Ppargc1b</i>	TGGAAAGCCCCTGTGAGAGT	TTGTATGGAGGTGTGGTGGG
<i>Nrf1</i>	TACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCCTCGTCT
<i>Tfam</i>	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Sod2</i>	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG	GTAGTAAGCGTGCTCCCACA
<i>Gpx1</i>	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC	TCACTTCGCACTTCTCAAACA
<i>Rpl32</i>	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A	GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG
<i>FLP</i>	CCAATTCCTCTTCTAGCTACTTTTCATCAATT GTG	GGTATTCCTGTTTGTGCTTGAAGAATTGC CGGTC
<i>Cre</i>	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG

A**B****C**

A



B



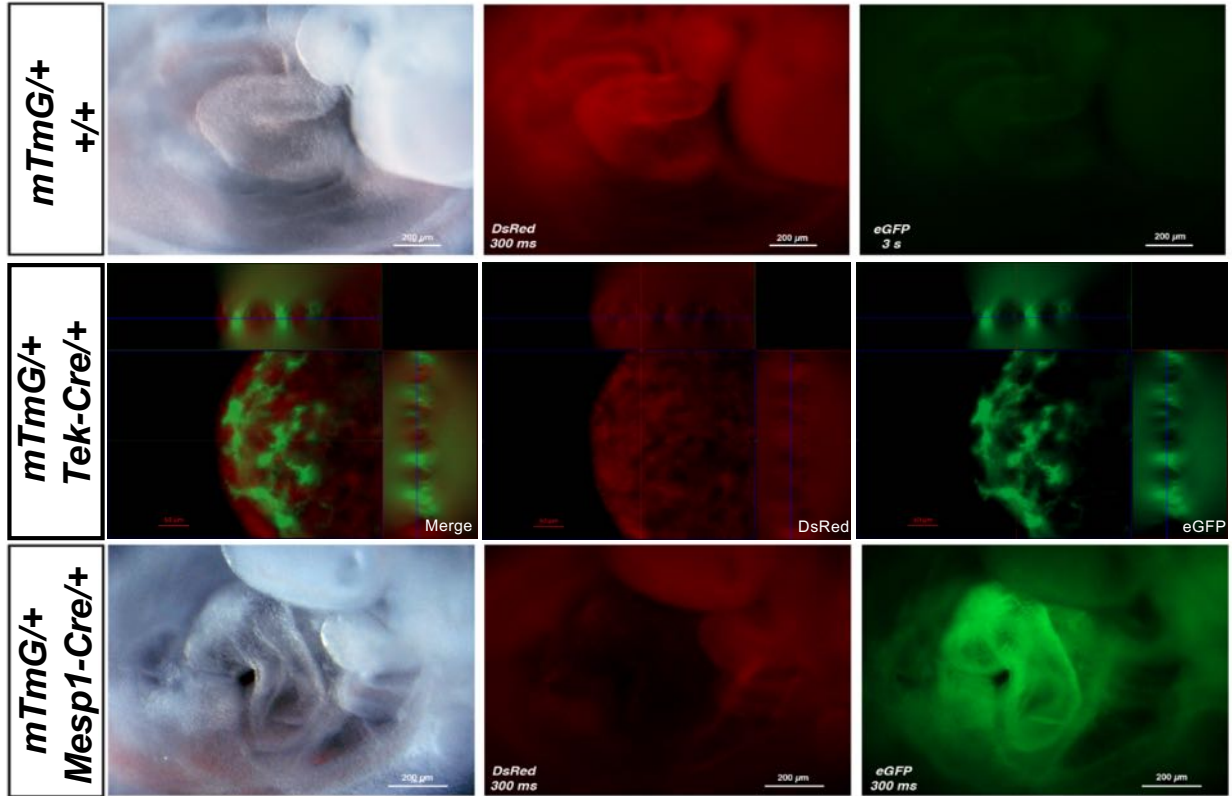
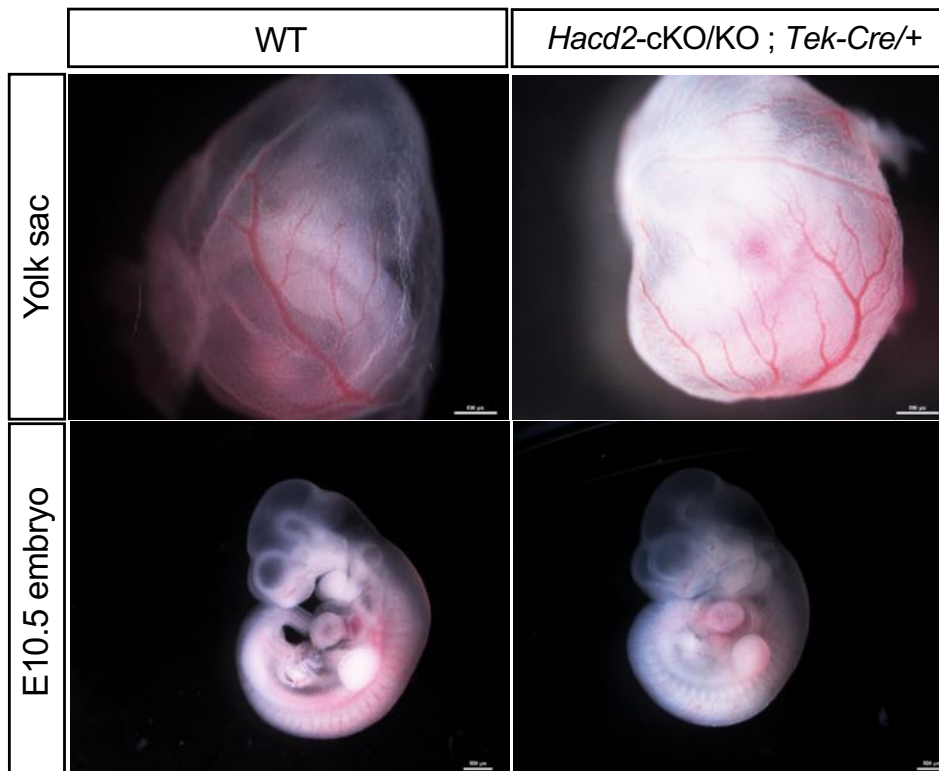
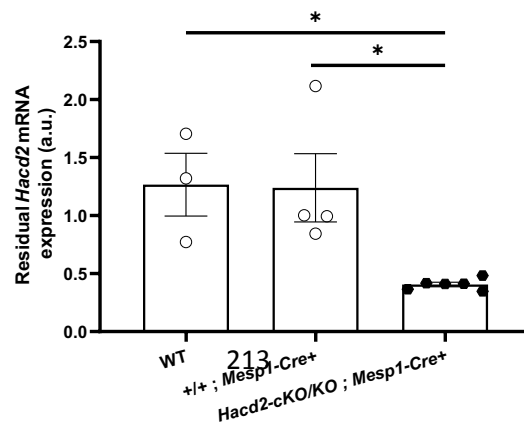
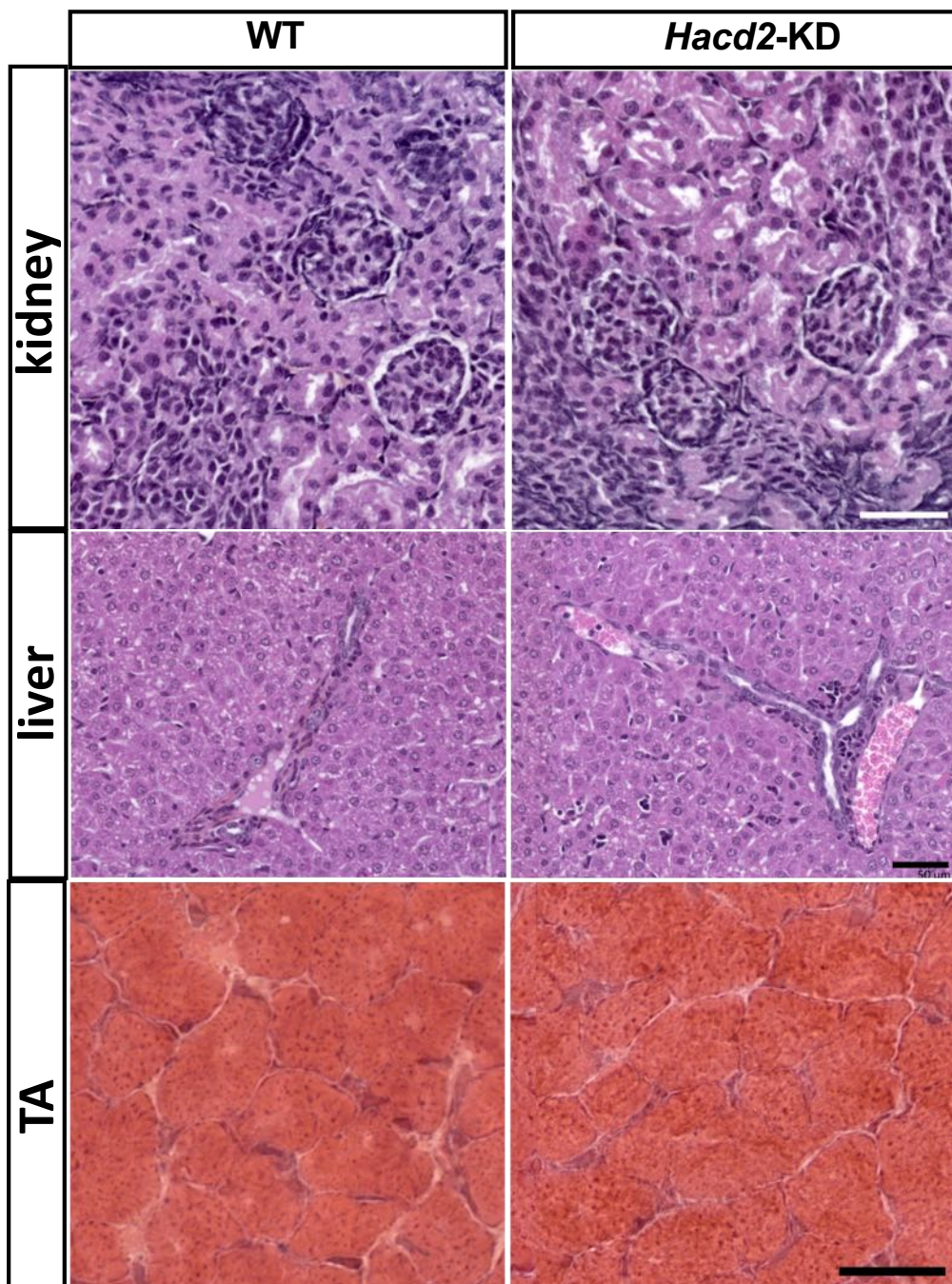
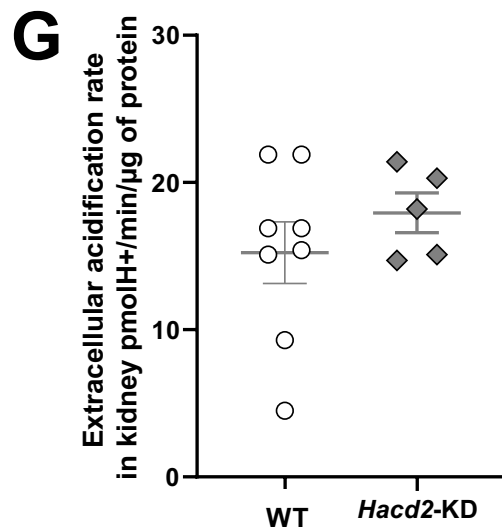
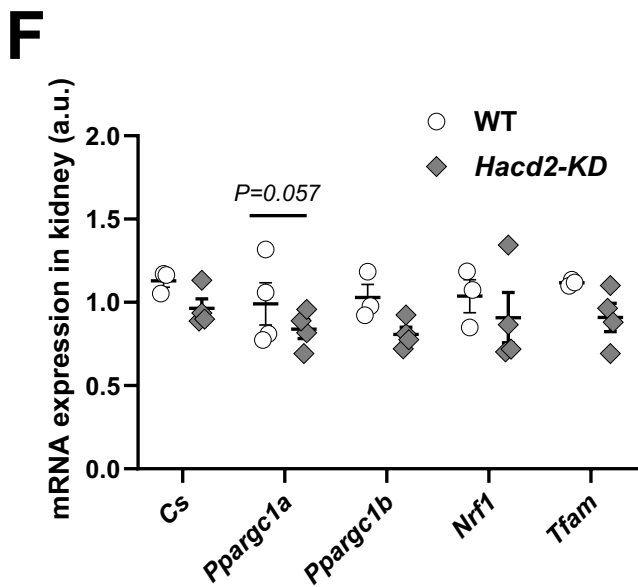
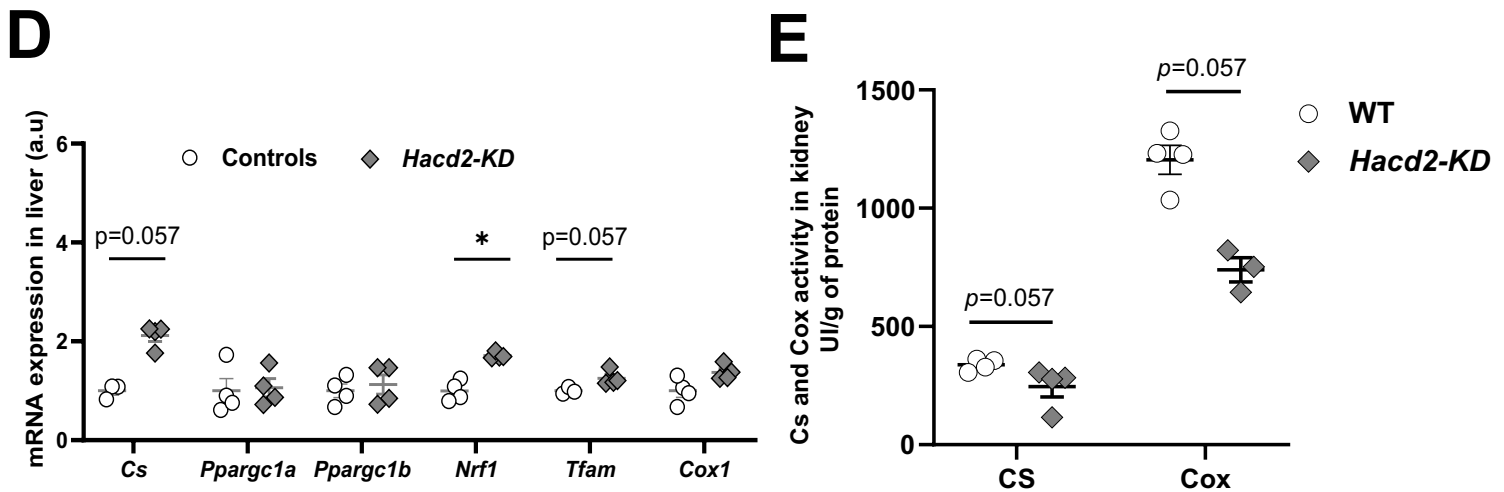
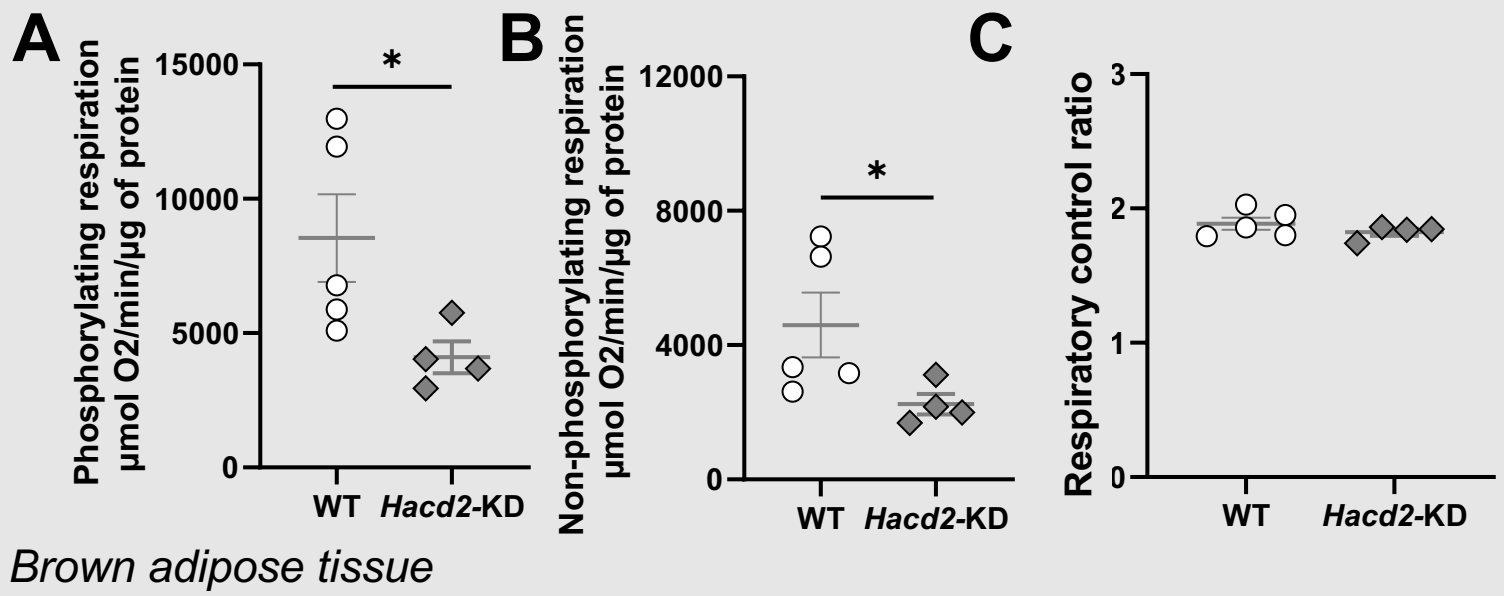
A**B****C**

Figure S3





Publication 3

Hacd2 deficiency in mice causes ichthyosis and atrophy of sebaceous glands

Article en préparation pour The Journal of Lipid Research.

Contexte de l'étude

Lors de l'étude des animaux *Hacd2*-KD, nous avons pu observer qu'au moment où ils connaissaient un arrêt de leur croissance, ils développaient une atteinte de la peau au niveau de la queue et des membres postérieurs, caractérisée par une sécheresse et un aspect squameux, évoquant une ichtyose.

Objectifs de l'étude

Le but de cette étude a été de caractériser le rôle du gène *Hacd2* dans l'homéostasie de la peau, qui met en jeu des lipides très particuliers, permettant à la peau d'assurer un rôle de barrière contre la dessiccation.

Résultats

✓ Nous avons pu montrer que le gène *Hacd2* est fortement exprimé dans la peau, en particulier au niveau des glandes sébacées qui sécrètent le sébum protecteur des poils. Nous avons pu mettre en évidence que chez les souriceaux *Hacd2*-KD, l'expression résiduelle du gène *Hacd2* dans la peau était quasiment nulle

✓ Nous avons pu montrer que les souriceaux *Hacd2*-KD au stade terminal ne présentaient pas de déshydratation centrale. Contrairement aux cas d'ichtyose sévère, conduisant à la mort

en quelques heures après la naissance, il s'agit donc ici d'une atteinte modérée, ne contribuant probablement pas à la mort des animaux.

✓ L'analyse histologique a permis de confirmer que l'atteinte de la peau correspondait à une ichtyose, c'est-à-dire à une hyperkératose réactionnelle à une atteinte du caractère imperméabilisant de la peau (« skin permeability barrier »). Elle a de plus révélé une atrophie des glandes sébacées, associée à une lésion des poils, devenus secs et cassants.

✓ Le rôle de barrière de la peau est assuré par des lipides très particuliers, en particulier des céramides et des O-acyl-céramides, assemblés en lamelles cohésives avec les cornéocytes.

Nous avons initié une analyse lipidomique avec la plateforme de Dijon pour analyser la peau des souriceaux *Hacd2*-KD. Une première partie de l'analyse a révélé des changements dans la répartition des trois classes de céramides et une réduction de leur teneur en acides gras mono- et polyinsaturés.

L'analyse des O-acyl-céramides a demandé un gros développement technique qui n'est pas encore tout à fait achevé. Nous sommes donc encore en attente des résultats de cette analyse qui devrait être très éclairante puisqu'il s'agit des lipides les plus impliqués dans le rôle de barrière de la peau.

Conclusion

Cette étude a permis de révéler que le gène *Hacd2* est nécessaire à l'homéostasie de la peau et lui fait rejoindre une grande famille d'enzymes impliquées dans la synthèse des lipides très particuliers de la peau. Le cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne était déjà connu pour son rôle dans cette synthèse puisque la perte de fonction du gène *Elovl1* ou *Elovl3* (1^{ère} étape du cycle) conduit chez la souris à une ichtyose sévère (Kihara, 2016). Ici, nous révélons que le gène *Hacd2* est nécessaire à la 3^e étape du cycle dans ce tissu. En plus de son implication dans le rôle de barrière de l'épiderme, visible par l'ichtyose des individus *Hacd2*-KD, nous avons mis en évidence le rôle du gène *Hacd2* dans les glandes sébacées, à l'origine là encore de lipides très hydrophobes, protecteurs des poils. Peu de gènes sont connus pour contrôler cette sécrétion et notre étude apporte donc une double contribution à la compréhension de la synthèse des lipides de la peau.

Contribution

J'ai contribué à cette étude en réalisant et en coordonnant l'ensemble des expériences. J'ai bénéficié de l'aide de plusieurs membres de l'équipe pour la réalisation de certaines analyses, ainsi que de l'aide de plusieurs personnes extérieures pour l'histologie (Edouard Reyes Gomez et Jean-Luc Servely) et la lipidomique (Jean-Paul Pais de Barros et Zandile).

***Hacd2* deficiency in mice causes ichthyosis and atrophy of sebaceous glands**

Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3*}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3*}, Edouard Reyes Gomez⁴, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Alexandre Prola^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Jean-Luc Servely⁴, Frédéric Relaix^{1,2,3}, Laurent Tiret^{1,2,3#}, Fanny Pilot-Storck^{1,2,3#}

* these two authors contributed equally

contact authors

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Creteil, France.

² EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³ EFS, IMRB, F-94010 Creteil, France.

⁴ Biopôle, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France

Abstract

Skin ensures an essential protective role towards desiccation that relies on a close interplay between cell layers and specific lipid structures. In particular, skin ceramides are indispensable to the skin permeability barrier and alterations in their synthesis lead to ichthyosis, a large group of diseases ranging from mild forms of scaly and dry skin to lethal forms of water loss at birth. Specific enzymes have been identified for skin ceramides synthesis and the involvement of the very long chain fatty acid (VLCFA) elongation cycle has been demonstrated by the fact that both ELOVL1 and ELOVL4 elongases, which participate to its first step, are necessary for proper skin ceramides synthesis. Here we provide evidence that deficiency in the *Hacd2* gene that encodes an enzyme for the third step of the VLCFA elongation cycle provokes an early ichthyosis in mice, along with an atrophy of sebaceous glands, resulting in fragile hair, scaly skin and eventually tail tip necrosis. We show that the *Hacd2* gene is strongly expressed in skin and that upon its deficiency, skin ceramides species display an altered repartition while their fatty acids are shifted towards saturated chains, at the expense of both monounsaturated and polyunsaturated chains. These results identify *Hacd2* as a new gene belonging to the lipid synthesis pathways as essential for skin homeostasis.

Keywords

SFA, MUFA, PUFA, hyperkeratosis, lipid lamellae, stratum corneum, O-acyl-ceramides

Introduction

Specialized organization of skin forms a permeability barrier that prevents water loss in terrestrial conditions (Breiden and Sandhoff, 2014; Kendall et al., 2017; Uchida and Holleran, 2008). Alteration of skin permeability barrier compromises this essential role, leading to ichthyosis, a heterogeneous group of diseases ranging from mild to life-threatening forms (Akiyama, 2017; Elias et al., 2012; Kihara, 2016). The most severe forms lead to death because of severe dehydration following trans-epidermal water loss whereas mild forms are accompanied by compensatory hyperkeratosis that manifests in a scaly and dry aspect of skin. Depending on the involved mutation, ichthyosis can be isolated or part of a syndromic disease (Elias et al., 2012). Functional skin permeability barrier relies on precise organization of the outermost part of the epidermis, the stratum corneum, in a stratified arrangement of corneocytes and lipid lamellae that contain cholesterol, free fatty acids and ceramides (Akiyama, 2017). Epidermal ceramides present a specific composition compared to non-skin ceramides, with abundant very long (VLCFA, $\geq C20$) and ultralong chain fatty acids (ULCFA, $\geq C28$) fatty acids that confer high hydrophobicity to the stratum corneum (Akiyama, 2017; Kihara, 2016). In addition, most ceramides comprising ULCFA are hydroxylated on ω position, esterified with linolenic acid (C18:2) and covalently bound to corneocyte envelope, further sealing the skin permeability barrier (Akiyama, 2017; Kihara, 2016).

The essential role of these specific lipids in skin permeability barrier is exemplified by the fact that apart from keratin-encoding genes, most genes involved in ichthyosis are part of lipid synthesis pathways (Akiyama, 2017; Vahlquist et al., 2018). In the upstream steps of ceramide synthesis stands the elongation of VLCFA and ULCFA. Synthesis of fatty acids from C18 requires a specific four-step process performed by ER-resident enzymes, forming the so-called VLCFA elongation cycle (Kihara, 2016; Sassa and Kihara, 2014). First step of this cycle is performed by

elongases called ELOVL proteins, which are encoded by seven different genes and exhibit individual specificities regarding substrate preferences and tissue expression pattern (Ohno et al., 2010). In particular, the ubiquitous ELOVL1 protein efficiently elongates fatty acids up to C26 whereas ELOVL4, which expression is restricted to skin, testis and brain, is the only elongase able to elongate \geq C26 FA, up to C38 FA (Kihara, 2016; Ohno et al., 2010). Both elongases are essential since their deletion in mice leads to neonatal death due to severe defect skin permeability barrier, and hence dehydration (Agbaga et al., 2008; Cameron et al., 2007; Li et al., 2007; McMahon et al., 2007; Sassa et al., 2013; Vasireddy et al., 2007). Interactions were shown with *CerS2* and *CerS3* genes that encode ceramide synthases (Kihara, 2016; Sassa et al., 2013). *CERS3* is exclusively required for synthesis of ceramides comprising ULCFA and its deficiency similarly leads to neonatal death due to skin permeability barrier defect (Jennemann et al., 2012). *Des1*, *Dgat2*, *Cyp4F22* and *PNPLA1* genes are further required for specific steps ultimately ending in acyl-ceramide synthesis and their deficiency also impairs skin permeability barrier (Grond et al., 2017; Holland et al., 2007; Ohno et al., 2015; Stone et al., 2004).

In parallel to epidermis-derived lipids, skin contains another specific pool of lipids secreted by sebaceous glands, made of cholesterol esters, triglycerides and wax esters (Pappas, 2009). Because of its high hydrophobicity, sebum participates to skin and fur protection. Accordingly, its depletion impairs water repulsion of fur and in the most severe cases, leads to hair break and loss in mice (Pappas, 2009). Of interest, several gene families involved in epidermis-derived lipid synthesis also participate to sebum synthesis. For example, deletion of *Elov3*, *Dgat1* and *CerS4* genes in mice compromises sebum secretion, resulting in progressive fur deterioration and hair loss (Chen et al., 2002; Ebel et al., 2014; Westerberg et al., 2004). In parallel, *Elov3* deletion was associated with skin permeability defect (Westerberg et al.,

2004), further suggesting combined roles of elongase family in synthesis of both sebaceous and epidermis-derived specific lipids.

Following elongation by ELOVL enzymes, VLCFA elongation cycle pursues with a second step of condensation by KAR enzyme, a third step of dehydration by HACD enzymes and a final step of condensation by TER enzyme (Sassa and Kihara, 2014). Contrarily to *Elovl1*, *Elovl3* and *Elovl4* genes which roles in skin lipid synthesis have been finely characterized (Kihara, 2016), involvement of *Hacd* genes in skin has not been assigned to date. *Hacd1* mutation leads to congenital myopathy in humans, dogs and mice and no skin defect has been reported in these conditions (Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005) (Prola *et al.*, *accepted in Science Advances*). No mutation in *Hacd2* gene, its closest paralog (Ikeda et al., 2008), has been described so far, nor for *Hacd3* and *Hacd4* genes. We decided to explore the roles of *Hacd2* in mouse by using two different constructs that allowed the generation of both complete knockout (KO) or partial deficiency (knockdown, KD) of *Hacd2* expression. We demonstrated that total KO of *Hacd2* is embryonic lethal around E9.5, with a major defect in cardiovascular development (Khadhraoui *et al.*, *in preparation*). On the contrary, *Hacd2*-KD pups are born viable but undergo growth arrest and cachexia within three weeks. This devastating syndrome was linked to defective mitochondrial function in several vital organs (Khadhraoui *et al.*). In parallel, this condition was associated with ichthyosis and sebaceous gland atrophy that develop one to three days following growth arrest. Lipid analysis revealed changes in ceramide repartition and a shift towards more saturated fatty acids in major ceramides species. Our study thus identifies *Hacd2* as a new gene involved in skin lipid synthesis, which deficiency caused syndromic ichthyosis and sebaceous gland atrophy.

Results

***Hacd2* deficiency leads to skin alteration**

In order to analyze the roles of *Hacd2* during mouse development, we developed two genetic constructs; a knockout allele (*Hacd2*-KO) abolished *Hacd2* expression whereas a knockdown allele (*Hacd2*-flox) allowed residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA (Figure 1A; Khadhraoui *et al.*). Heterozygous mice for each allele were viable and healthy but homozygosity for each allele was lethal, yet at different stages. *Hacd2*^{KO/KO} embryos died around E9.5 of embryonic development exhibiting severe cardiovascular malformation while *Hacd2*^{flox/flox} (hereafter *Hacd2*-KD) pups died in the first weeks after birth (Khadhraoui *et al.*). At birth, *Hacd2*-KD pups were often undistinguishable from their littermates although their body mass was slightly reduced (Khadhraoui *et al.*). However, at a variable stage between P5 and P22, they stopped growing and started to develop a few days later cachexia and lethargy, requiring euthanasia. In between, one to three days after growth arrest, their appearance changed, and skin alteration progressively developed on tail and hindlimbs (Figure 1B). On these extremities, skin became scaly and dry and within a couple of days, skin alteration worsened and extended to whole tail and hindlimbs. Eventually, tail tip necrotized in the most severe cases (Figure 1B). Among the 62 *Hacd2*-KD pups examined, only one survived beyond weaning and in addition to tail lesions, developed skin lesions on ears, with a thick skin, notches and scabs (Figure 1C).

Localized skin lesions of *Hacd2*-KD pups were not associated with dehydration, as shown by normal hematocrit and total serum protein content (Figure 1D-E).

Hacd2 gene is expressed in skin

Previous experiments reported early and broad expression of *Hacd2* gene, notably in skin (Khadhraoui *et al.*). We further analyzed *Hacd2* expression in skin in parallel to other *Hacd* genes. *Hacd2* gene was highly expressed compared to *Hacd3* and *Hacd4* genes, and expression of *Hacd1-fl* isoform, which encodes the functional HACD1 protein, was not observed (Figure 2A).

We previously show that *Hacd2*-flox allele gave rise to a residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA, with marked tissue variation (Khadhraoui *et al.*). Quantification of *Hacd2* wildtype mRNA in skin revealed a 95% reduction in *Hacd2* expression in *Hacd2*-KD pups compared to their wildtype littermates (Figure 2B), indicating that in skin, *Hacd2*-flox allele was close to a null allele. Western blot analysis confirmed the absence of HACD2 expression in skin of *Hacd2*-KD pups (Figure 2C).

X-Gal staining on skin section allowed the visualization of *LacZ* reporter expression under the control of *Hacd2* promoter in *Hacd2*-flox or *Hacd2*-KO allele-bearing mice. Both alleles gave rise to similar observations. Macroscopically, skin sections presented a punctuate staining (Figure 2D) that histological examination allowed to unambiguously attribute to sebaceous glands (Figure 2E).

Hacd2 deficiency leads to ichthyosis and sebaceous gland atrophy

Histological analysis performed on tail of *Hacd2*-KD pups exhibiting ichthyosis revealed that stratum corneum was markedly thicker and more compact compared to littermates. To a lesser extent, stratum spinosum and stratum granulosum were also thicker in *Hacd2*-KD pups (Figure 3A). Such hyperkeratosis is a common compensatory sign of defective skin barrier

permeability (Elias et al., 2012; Vahlquist et al., 2018) and defines skin lesions of *Hacd2*-KD pups as ichthyosis.

In parallel, histological examination revealed a severe atrophy of sebaceous glands in *Hacd2*-KD pups, with a nearly complete loss of the foamy sebum content observed in sebocytes from control pups (Figure 3A). Transmitted electron microscopy revealed the presence of small sebocytes containing very few lipid droplets in their cytoplasm, (Figure 3B). Scanning electron microscopy performed on skin surface highlighted the scaly aspect of skin (Figure 3C). Moreover, compared to the straight and smooth hairs of control pups, *Hacd2*-KD pups displayed short and bent hairs with irregular contours, in accordance with sebaceous gland dysfunction.

***Hacd2* deficiency alters skin lipid content**

Lipidomic analysis of skin ceramides revealed that the unchanged total ceramide content was associated with an altered repartition of the different ceramide species. More precisely, ceramides containing the sphingosine or the dihydro-sphingosine long-chain base (LCB) (further called Cer and DHCer, respectively) were slightly increased, at the expense of the 6-hydroxy-sphingosine-containing ceramides (HexCer) in *Hacd2*-KD pups compared to controls (Figure 4A).

Relative repartition of species among each type revealed modified proportions in both major and minor species (Figure S1A-C) that seemed to point to the saturated versus unsaturated status of the FA chain linked to the LCB, rather to FA chain length or LCB species. Accordingly, repartition of LCB was not markedly modified in total ceramides albeit C18:0 LCB were slightly increased (Figure S2A) and repartition of ceramides FA chain length on either side of the C18 threshold was preserved (Figure S2B). On the contrary, the saturated versus unsaturated

status of ceramides FA was significantly modified, with an increase in saturated FA (SFA) and a decrease in unsaturated FA (MUFA) for Cer and HexCer, as well as a decrease in polyunsaturated FA (PUFA) for Cer (Figure 4B-D), leading to a global increase in SFA and decrease in both MUFA and PUFA in total ceramides (Figure 4E).

[Pending results for O-acyl-ceramide content]

Discussion

Our study demonstrated that *Hacd2* gene is involved in skin lipid synthesis and sebaceous gland function. Its deficiency led to progressive ichthyosis on hindlimbs and tail of mice within three weeks following birth. Ichthyosis was part of a syndromic condition comprising a multiorgan mitochondrial disease (Khadhraoui *et al.*). Ichthyosis apparition was shortly preceded by growth arrest and followed within a couple of days by lethal cachexia and lethargy. Characterization of *Hacd2* role in skin was thus serendipitously allowed by a specific genetic construct that preserved mice from death in a narrow temporal window during which consequences of *Hacd2* deficiency became visible in skin. In this knockdown genetic context, *Hacd2* expression was reduced, albeit at variable level among tissues. In particular, embryonic development was normal, contrarily to the complete knockout of *Hacd2* expression (Khadhraoui *et al.*). Of note, expression of *Hacd2* wildtype mRNA was nearly abolished in skin, likely providing a faithful, yet short-living model to study *Hacd2* role in skin lipid synthesis. Ichthyosis was characterized by thickening of stratum corneum, stratum spinosum and stratum granulosum. In parallel, sebaceous glands, which present a strong expression of *Hacd2*, were found atrophic and in accordance, hairs were bent and displayed irregular contours. These histological alterations were associated with modifications in lipid composition. In particular,

Cer and DHCer were increased at the expense of HexCer and ceramides FA were shifted towards more saturated species, leading to reduced content in MUFAs and PUFAs.

[To be completed.]

Three ELOVL proteins, namely ELOVL1, ELOVL3 and ELOVL4 have been implicated in skin lipid synthesis (Akiyama, 2017; Kihara, 2016). ELOVL1 and ELOVL4 proteins are required for ceramide synthesis and, hence, formation of functional skin permeability barrier (Agbaga et al., 2008; Cameron et al., 2007; Li et al., 2007; McMahon et al., 2007; Sassa et al., 2013; Vasireddy et al., 2007). Deficiency of each of them leads to death in the first hours following birth because of severe water loss. ELOVL3 deficiency is viable but provokes sebaceous gland dysfunction that results in progressive hair loss (Westerberg et al., 2004). Interestingly, increased, albeit limited, trans-epidermal water loss was also observed in *Elov3* deficient mice, suggesting a parallel involvement of *Elov3* in epidermis lipid synthesis (Westerberg et al., 2004). Overlap in both sebum and epidermis lipid synthesis is further observed within other gene families, such as Ceramide synthases (CERS) and Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT)-encoding genes, for which some members were shown to be involved in sebum synthesis while others are involved in epidermis-derived ceramide synthesis (Chen et al., 2002; Ebel et al., 2014; Jennemann et al., 2012; Stone et al., 2004). Of course, this overlap might be wider than reported since early death linked to severe defect in epidermis-derived lipids and thus skin permeability barrier may preclude observation of progressive sebaceous gland defect and associated fur alteration.

Complementarily to the first step of VLCFA synthesis in skin that involves *Elov1*, *Elov3* and *Elov4* elongases, our results demonstrate that *Hacd2* is required for the third step of the VLCFA elongation cycle in this tissue. On the contrary, *Hacd1* is reportedly not required for skin lipid synthesis (Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005) (Prola et

al.) and deficient contexts for *Hacd3* or *Hacd4* genes have not been reported yet. The less severe phenotype observed in *Hacd2*-knockdown context compared to early lethality due to *Elov1* or *Elov4* deletion may suggest partial compensation by other *Hacd* genes. Alternatively, it could reflect that weak residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA (5% compared to wildtype littermates) might be sufficient to avoid early lethality. This latter hypothesis would be in line with the fact that epidermis-restricted expression of *Elov4* rescues from early lethality although it only increases acylceramide content from 0.1 to 0.3 compared to wildtype (McMahon et al., 2011). This suggests that very low level of *Hacd2* expression in skin might also protect from severe ichthyosis and early lethality.

We previously demonstrated that *Hacd2* deficiency compromises mitochondrial function in liver, kidney and brown adipose tissue (Khadhraoui *et al.*). Mitochondrial disease was accompanied by hyperlactatemia that likely precipitated lethality. Although mitochondrial function could not be assessed in skin for technical limitations, defective mitochondrial ATP production following *Hacd2* deficiency, if present, would likely not participate to the observed skin phenotype since complete depletion in respiratory complex components does not perturb skin differentiation, indicating that skin mostly depends on anaerobic metabolism (Baris et al., 2011). Nevertheless, mitochondrial functions unrelated to ATP production are yet required in skin to avoid severe inflammation (Weiland et al., 2018). However, inflammation was not observed in skin sections from *Hacd2*-deficient pups, likely excluding mitochondrial dysfunction as causative for the observed skin phenotype. Nevertheless, decreased mitochondrial efficiency in skin might participate to hyperlactatemia and systemic deterioration of *Hacd2*-deficient pups.

Together, our results characterize *Hacd2* gene as an additional contributor to skin lipid synthesis and suggest that *Hacd2* mutations could be involved in syndromic ichthyosis accompanying mitochondrial diseases.

- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Measurement of total serum protein content and hematocrit
 - X-Gal staining of skin
 - Histological staining
 - Transmission electron microscopy
 - Scanning electron microscopy
 - Extraction of total RNA, and RT-qPCR analyses
 - Western blot experiments
 - Lipidomic analyses
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA – 16; approval number 20/12/12-17 and 17-031) and all care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on animals that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7am to 7pm. Food and water were given *ad libitum*. *Hacd2*-knockout (*Hacd2*-KO) and *Hacd2*-knockdown (*Hacd2*-KD; *Hacd2*^{flox/flox}) mice were generated as previously described (Khadhraoui *et al.*). Food was breeding diet for rats and mice (C1314, Altronim) for pregnant and lactating females or maintenance diet (C1324, Altronim) for weaned animals. Animals were euthanized by head section for pups up to 3 weeks and by cervical dislocation for animals older than 3 weeks, in accordance with the principles of good laboratory animal practice.

METHODS DETAILS

Measurement of total serum protein content and hematocrit

Blood was collected at the head section site from *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (ranging from P5 to P26) and their control littermates. For total serum protein content, blood was collected in an Eppendorf vial, incubated for 30 min at room temperature (RT) and centrifuged at 1000g for 10 min. BCA protein assay reagent kit (Pierce) was used to measure the amount of total proteins in the serum. For hematocrit calculation, blood was collected in a capillary tube and centrifuged of 2000g for 10 min. The ratio of the capillary length containing blood cells to the total blood length indicated the hematocrit.

X-Gal staining of skin

A piece of skin was cut from the most caudal part of the back of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, or from WT and *Hacd2*^{+/^{KO} mice (3 months of age). It was fixed in formol for 30 min and rinsed in PBS. Samples were protected from light and immersed overnight at 33°C in a X-Gal solution (4mM potassium ferrocyanide, 4mM potassium ferricyanide, 2mM MgCl₂, 1% *sodium deoxycholate*, 1% Nonidet P40, 4% 5-Bromo-4-chloro-3-india-BD-Galactopyranoside (X-Gal) in PBS). The next day, the samples were rinsed in PBS and observed using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope. Images were acquired using NIS (Nikon) software.}

Histological staining

X-Gal stained tissues from *Hacd2*^{KO/+} and WT animals or formol-fixed tail pieces from *Hacd2*-KD and WT mice were processed for paraffin inclusion, section and

hematoxylin-eosin staining. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Transmission electron microscopy

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, tails were cut transversally in small pieces and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 overnight at 4°C. Samples were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer, postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate, then gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Scanning electron microscopy

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, tails were cut transversally in small pieces and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 overnight at 4°C. Postfixation was performed by immersing the surfaces in a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate for 1h at 4°C in the dark. The samples were then placed in ethanol baths of increasing concentration (70, 90, 95 and 100%) at a rate of three baths of 10 min per concentration, dried to critical point with CO₂ and coated with gold-palladium in an automatic sputter. High-magnification imaging was performed at an operating voltage of 2kV under a S-4500 Hitachi FESEM.

Extraction of total RNA, and RT-qPCR analyses

Skin samples from WT mice (3 months of age) or *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P9) and their WT littermates were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNAs were isolated using TRIzol reagent (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm to 230 nm > 1.8. RNA quality was checked on agarose gel. 200ng (Figure 2A) and 500ng (Figure 2B) of RNA were used for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNAs were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). All qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All presented RT-qPCR results were normalized to β -*actin* or *Rpl32* housekeeping genes expression. Primer sequences are available in Table S1.

Western blot experiments

Frozen skin samples from *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P10) and their WT littermates were lysed in lysis buffer (300 mM KCl, 30 mM PIPES pH6.6, 10 mM Na-Butyrate, 0.5% IGEPAL), supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce), and homogenised in Bertin homogenizer (3 cycles x 20 seconds). The samples were sonicated for 10 seconds and centrifuged at 15,000g for 10 min at 4°C. The supernatants were transferred into a new vial and protein content was measured using a BCA quantification kit (ThermoFisher Scientific). 10 µg of proteins were mixed with blue loading dye 5X (Tris-HCl 300 mM, SDS 500 mM, 100mM DTT, glycerol 50%, and a pinch of bromophenol blue) and incubated for 1h at RT. The samples were then incubated with 50 mM of iodoacetamide for 1h at RT in the dark.

Samples were then loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred on PVDF membrane using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Blots were blocked for 1h in 5% BSA, 0.1% Tween20 in TBS pH 7.4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl) at RT and then incubated with primary antibodies (anti-HACD2 (Biorbyt) or Anti-beta-tubulin (Santa Cruz), 1:1000) overnight at 4°C in TBS-Tween. After three washings of 10 min in TBS-Tween, blots were incubated with a HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 1h at RT and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH).

Lipidomic analyses

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P6 to P10) and their WT littermates, tiny pieces of tail skin were removed, protected from oxidation by argon gas-replacement and stored at -80°C until analysis.

Targeted quantitation of ceramides dihydroceramides and hexosylceramides by LCMS² was performed as follows. Lipids were extracted according to the method of Bligh and Dyer (Reis et al., 2013). Briefly, tail homogenates (3 mg in 150 µL saline) were mixed with 500 ng of d18:1-12:0 Cer (Avanti Polar Lipids, Coger SAS, Paris, France), used as internal standard, and extracted with 750 µL of chloroform/methanol 2/1 for 10 min. Chloroform (250 µL) was then added and extraction followed for 10 min. Distilled water (250 µL) was added and extraction continued for 10 more min. After centrifugation (10000g, 10 min, 4°C) the organic phase was collected. The aqueous phase was acidified with hydrochloric acid (8 µL, 3 mol/L) and further extracted with

chloroform (600 μ L) for 10 min. After centrifugation (10000g, 10 min, 4°C) the organic phase was collected and combined to the previous one.

Pooled organic phases were washed with 800 μ L of authentic upper phase of Chloroform/Methanol/distilled water (96.7/93.3/90). Organic phase was evaporated under vacuum. Extracts were finally dissolved with 100 μ L of Chloroform/Methanol/distilled water 60/30/4.5 and 2 μ L were injected on a 1200 6460-QqQ LC-MS/MS system equipped with an ESI source (Agilent technologies). Separation was achieved on a Zorbax Eclipse C8 2.1x100 mm, 1.8 μ m column (Agilent technologies) at a flow rate of 0,3 ml/min, 50°C, with a linear gradient of (solvent A) formic acid/ammonium formate (0,2% /1mM final concentrations) and (solvent B) methanol containing formic acid/ammonium formate 1mM as follows : 85% B for 1 min, up to 100% B in 8 min, and maintained at 100 % for 4 min. Acquisition was performed in positive Single Reaction Monitoring (SRM) mode (source temperature : 325°C, nebulizer gas flow rate was 10 L/min, sheath gas flow 11 L/min, temperature 350°C, capillary 3500 V, VCharging 600 V). Fragmentor voltage and collision energy voltage were set up as follows: 140/40, 130/30, 150/25 and 115/20 for lactosyl-ceramides, hexosyl-ceramides, dihydro-ceramides and ceramides respectively. Transitions used for quantitation of d18:2-, d18:1- and d18:0- long chain base containing molecules were [M-18] $^{+}$ \rightarrow 262.2, [M-18] $^{+}$ \rightarrow 264.2 and [M-18] $^{+}$ \rightarrow 266.2, respectively.

Relative quantitation of ceramide related compounds was performed by calculating the response ratio of the considered ceramide to d18:1/12:0 Ceramide, used as internal standard.

Chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). LCMSMS quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as mean \pm s.e.m.. Data were analyzed using GraphPad Prism. Differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Multiple pair wise tests were corrected using Holm-Bonferroni method. Differences between groups were considered significant when P value was less than 0.05. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

References

- Agbaga, M.-P., Brush, R.S., Mandal, M.N.A., Henry, K., Elliott, M.H., and Anderson, R.E. (2008). Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *PNAS* *105*, 12843–12848.
- Akiyama, M. (2017). Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *Journal of Dermatological Science* *88*, 3–9.
- Baris, O.R., Klose, A., Kloepper, J.E., Weiland, D., Neuhaus, J.F.G., Schauen, M., Wille, A., Müller, A., Merkwirth, C., Langer, T., et al. (2011). The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells. *Stem Cells* *29*, 1459–1468.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol* *7*, 429–440.
- Breiden, B., and Sandhoff, K. (2014). The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 441–452.
- Cameron, D.J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L., and Zhang, K. (2007). Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci.* *111*–119.
- Chen, H.C., Smith, S.J., Tow, B., Elias, P.M., and Farese, R.V. (2002). Leptin modulates the effects of acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase deficiency on murine fur and sebaceous glands. *J Clin Invest* *109*, 175–181.
- Ebel, P., Imgrund, S., Vom Dorp, K., Hofmann, K., Maier, H., Drake, H., Degen, J., Dörmann, P., Eckhardt, M., Franz, T., et al. (2014). Ceramide synthase 4 deficiency in mice causes lipid alterations in sebum and results in alopecia. *Biochem J* *461*, 147–158.
- Elias, P.M., Williams, M.L., and Feingold, K.R. (2012). Abnormal barrier function in the pathogenesis of ichthyosis: Therapeutic implications for lipid metabolic disorders. *Clinics in Dermatology* *30*, 311–322.
- Grond, S., Eichmann, T.O., Dubrac, S., Kolb, D., Schmuth, M., Fischer, J., Crumrine, D., Elias, P.M., Haemmerle, G., Zechner, R., et al. (2017). PNPLA1 Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-O-Acylceramides. *Journal of Investigative Dermatology* *137*, 394–402.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metabolism* *5*, 167–179.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very

long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Letters* 582, 2435–2440.

Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., et al. (2012). Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* 21, 586–608.

Kendall, A.C., Kiezel-Tsugunova, M., Brownbridge, L.C., Harwood, J.L., and Nicolaou, A. (2017). Lipid functions in skin: Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859, 1679–1689.

Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research* 63, 50–69.

Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B.C.-H., Proia, R.L., and Deng, C.-X. (2007). Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* 120–128.

McMahon, A., Butovich, I.A., Mata, N.L., Klein, M., Ritter, R., Richardson, J., Birch, D.G., Edwards, A.O., and Kedzierski, W. (2007). Retinal pathology and skin barrier defect in mice carrying a Stargardt disease-3 mutation in elongase of very long chain fatty acids-4. *Mol Vis* 13, 258–272.

McMahon, A., Butovich, I.A., and Kedzierski, W. (2011). Epidermal expression of an Elov14 transgene rescues neonatal lethality of homozygous Stargardt disease-3 mice. *J. Lipid Res.* 52, 1128–1138.

Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., Deluca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., et al. (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5229–5236.

Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *PNAS* 107, 18439–18444.

Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., et al. (2015). Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *PNAS* 112, 7707–7712.

Pappas, A. (2009). Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* 1, 72–76.

Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1417–1427.

Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., Khadhraoui, N., Gallerne, C., Molinié, T., Courtin, G., Guillaud, L., Gressette, M., Solgadi, A., Dumont, F., Castel, J., Ternacle, J., Demarquoy, J., Malgoyre, A., Koulmann, N., Derumeaux, G., Giraud, M.-F., Joubert, F., Veksler, V., Luquet, S., Relaix, F., Tiret, L., **Pilot-Storck, F.** Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle (*Science Advances*, *in press*)

Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G.J., Fauzi, N.M., Pitt, A.R., and Spickett, C.M. (2013). A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* *54*, 1812–1824.

Sassa, T., and Kihara, A. (2014). Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* *22*, 83–92.

Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., et al. (2013). Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol* *33*, 2787–2796.

Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Farese, R.V. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* *279*, 11767–11776.

Uchida, Y., and Holleran, W.M. (2008). Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *Journal of Dermatological Science* *51*, 77–87.

Vahlquist, A., Fischer, J., and Törmä, H. (2018). Inherited Nonsyndromic Ichthyoses: An Update on Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol* *19*, 51–66.

Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Kim, S.Y., Mandal, M.N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., et al. (2007). Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet* *16*, 471–482.

Weiland, D., Brachvogel, B., Hornig-Do, H.-T., Neuhaus, J.F.G., Holzer, T., Tobin, D.J., Niessen, C.M., Wiesner, R.J., and Baris, O.R. (2018). Imbalance of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in the Epidermis Induces Severe Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* *138*, 132–140.

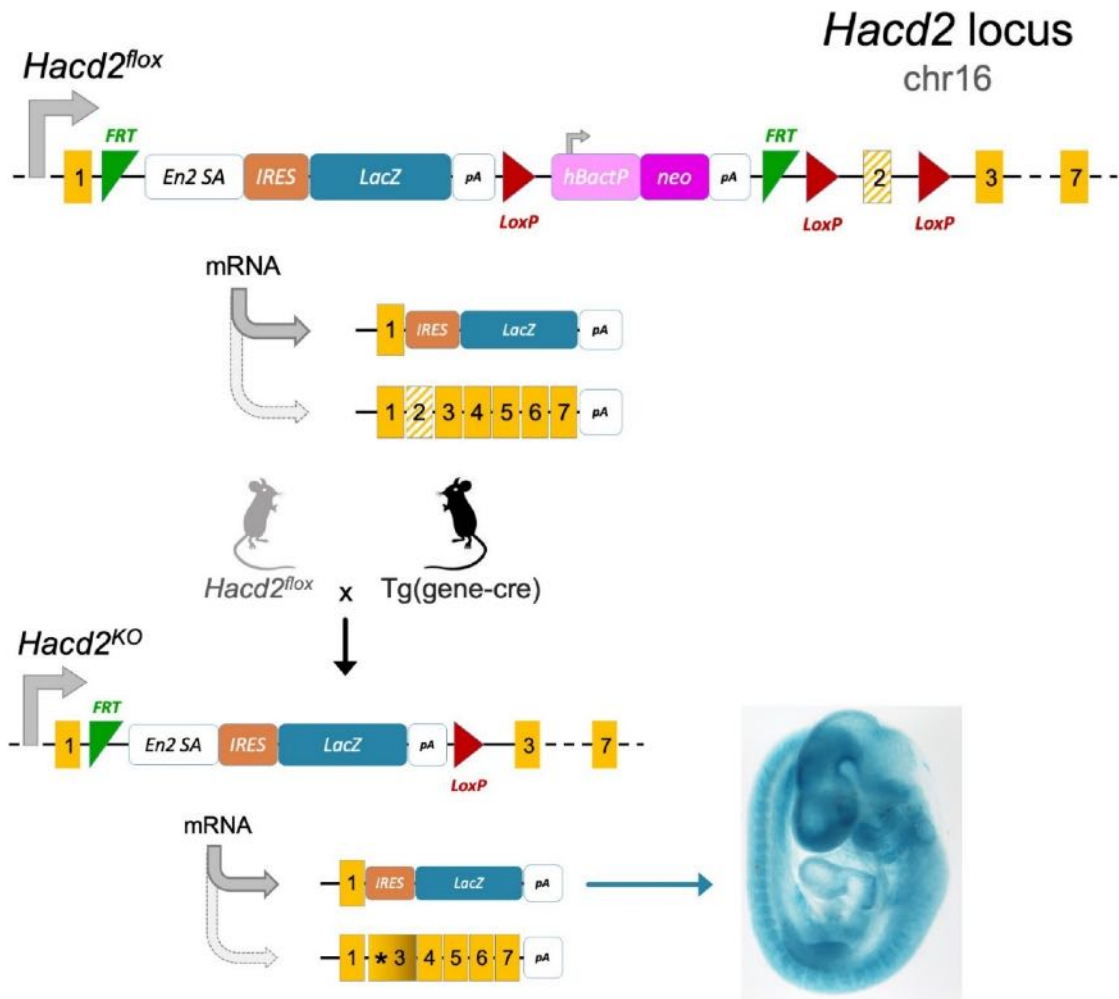
Westerberg, R., Tvrdik, P., Undén, A.-B., Månsson, J.-E., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W.H., Elias, P.M., Asadi, A., Flodby, P., et al. (2004). Role for ELOVL3 and Fatty Acid Chain Length in Development of Hair and Skin Function. *J. Biol. Chem.* *279*, 5621–5629.

Acknowledgments

The authors are grateful to Camille Laisne and Diana Gelperowic for taking care of mice; Jean-Paul Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; Christine Longin and Martine Letheule for transmission electron microscopy and Thierry Meylheuc for scanning electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); Karine Reynaud for providing reagents and Sophie Chateau for technical help in histological analyses.

N.K.'s PhD fellowship has been financially supported by the French "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM). The work was primarily supported by the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-12-JSV1-0005) and the "Association Française contre les Myopathies" (AFM 16143 and Translamuscle). The authors declare that they have no conflict of interest.

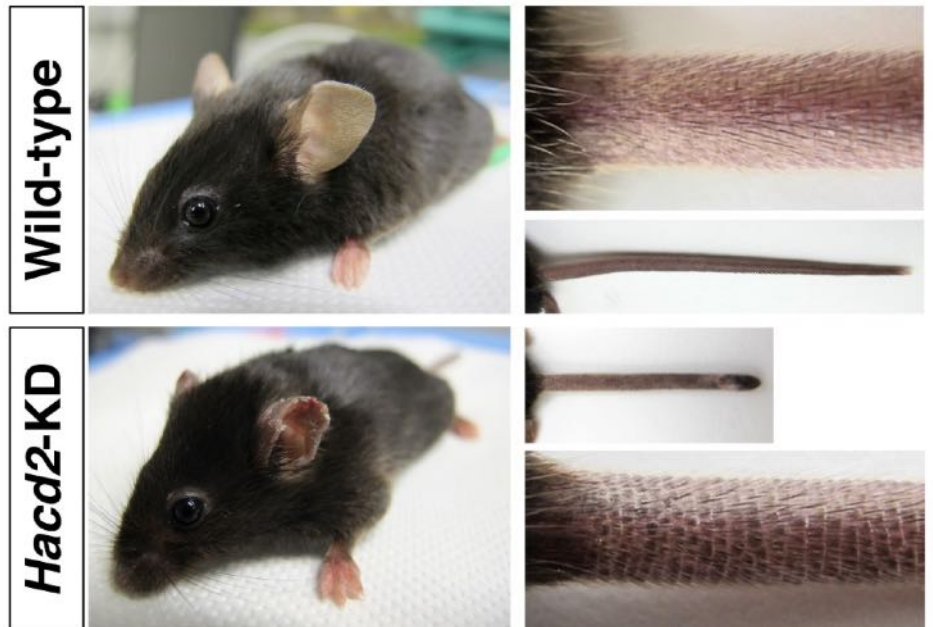
A



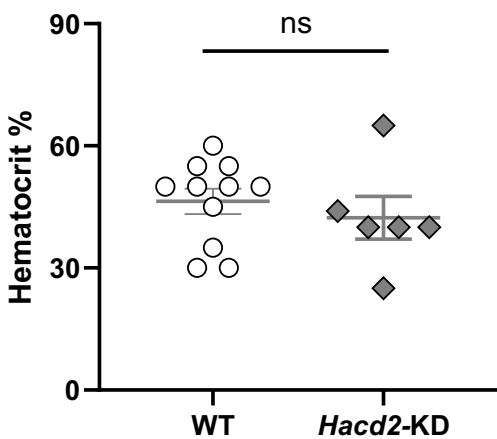
B



C



D



E

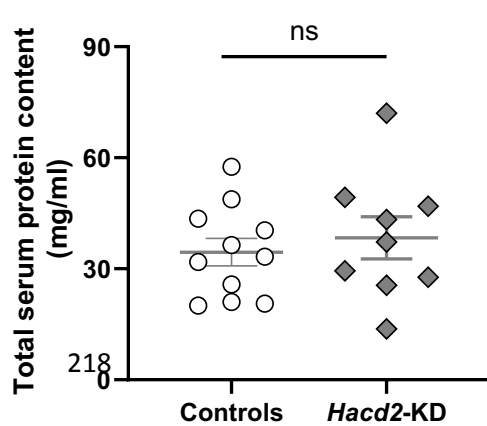


Figure 1

Figure 1 | *Hacd2* knockdown provokes skin alteration in early postnatal life.

(A) Structures of *Hacd2* targeting constructs. *Hacd2* targeting vector was inserted by homologous recombination and comprised a *LacZ* reporter gene and FRT and LoxP recombination sites (upper part). The resulting *Hacd2*-floxed allele gives rise to the expression of the *LacZ* reporter construct, along with residual *Hacd2* wildtype mRNA. Recombination by a ubiquitous Cre recombinase generated *Hacd2*-KO allele (lower part), which gives rise to the expression of the *LacZ* reporter construct, along with a mutant *Hacd2* mRNA that presents an early stop codon. In both cases, the strong splicing acceptor of *En2* gene (*En2SA*) favours transcription of *LacZ* mRNA over *Hacd2* transcript. IRES: Internal Ribosome Entry Site; pA: polyadenylation site; FRT: recombination site for flippase recombinase; LoxP: recombination site for Cre recombinase; hBactP: promoter of the human *beta-actin* gene; neo: resistance gene to neomycin. **(B)** Representative photograph of a *Hacd2*-KD pup at P14 compared to wildtype (WT) littermate. Note the scaly and dry skin of *Hacd2*-KD pup on tail and hindlimb. Spontaneous scab is visible at tail tip. **(C)** Photograph of a unique *Hacd2*-KD mouse that survived beyond weaning (here, 3-month old), compared to WT littermate. Serous deposits are visible on ear contours and progressive necrosis of tail was responsible for the observed shortening of tail. Scaly aspect of tail is clearly visible. **(D-E)** Dehydration level was evaluated by measurement of hematocrit (D) and total serum protein content (E) in *Hacd2*-KD mice at terminal stage, and control littermates.

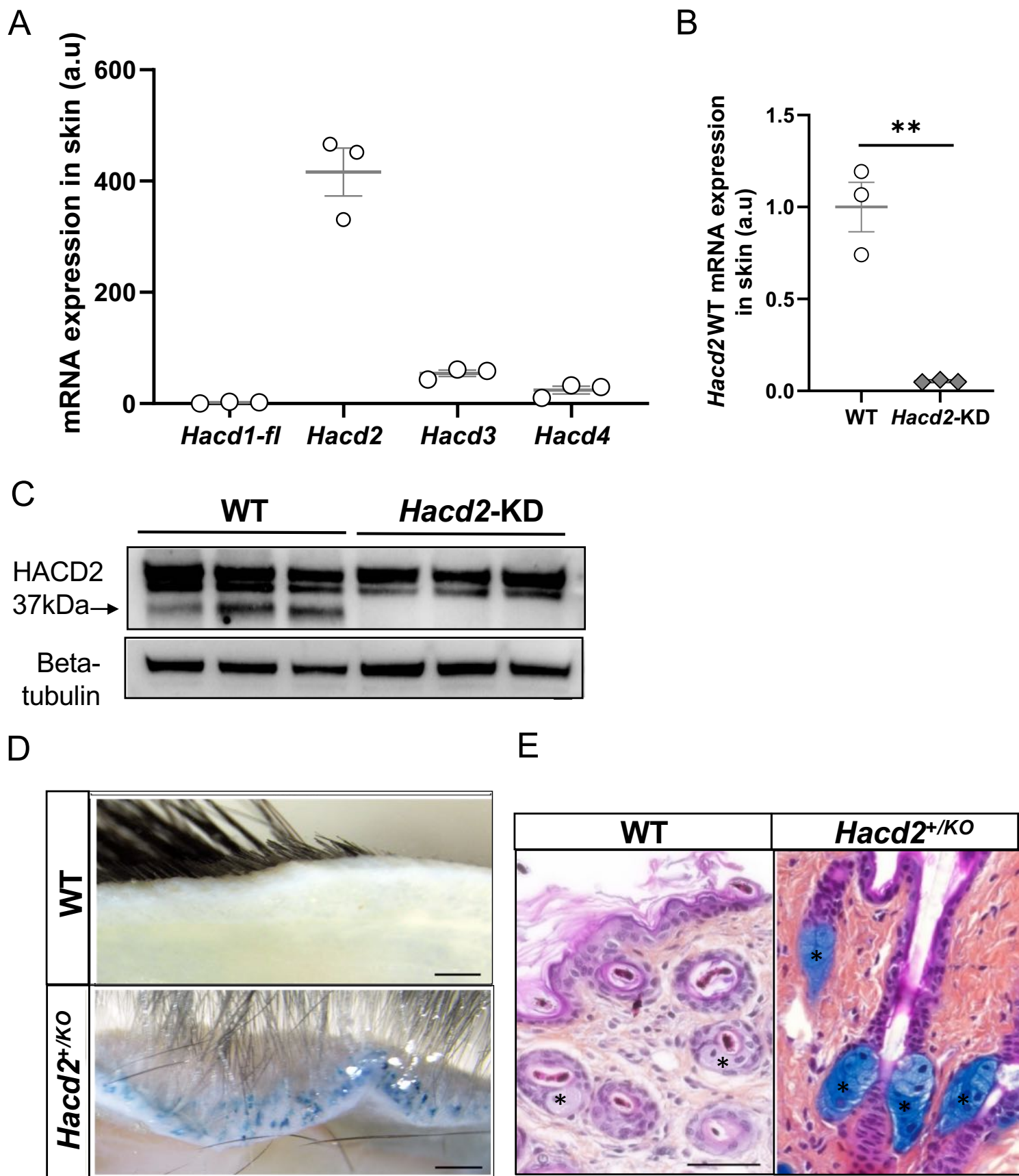


Figure 2 | *Hacd2* expression in skin.

(A) mRNA expression of *Hacd2* gene and paralogs in skin of WT mice, normalized to β -actin mRNA. Comparison of the different gene expression was done after correction on qPCR efficiency. *Hacd1*-fl mRNA encodes HACD1 active isoform. **(B)** Expression of *Hacd2* wildtype mRNA was assessed in skin from *Hacd2*-KD and WT littermates and normalized to Rpl32 mRNA. **(C)** Western blot analysis of HACD2 expression in skin from *Hacd2*-KD and WT littermates. Note the absence of a band at the expected size for HACD2 protein in *Hacd2*-KD samples. **(D-E)** X-Gal staining of skin macroscopically revealed a punctate staining in *Hacd2*^{KO/+} mice (scale bar: 500 μ m) (D) that corresponded on histological sections counter-stained by hematoxylin and eosin to a strong staining of sebaceous glands (scale bar: 50 μ m) (E). **, $P < 0.01$.

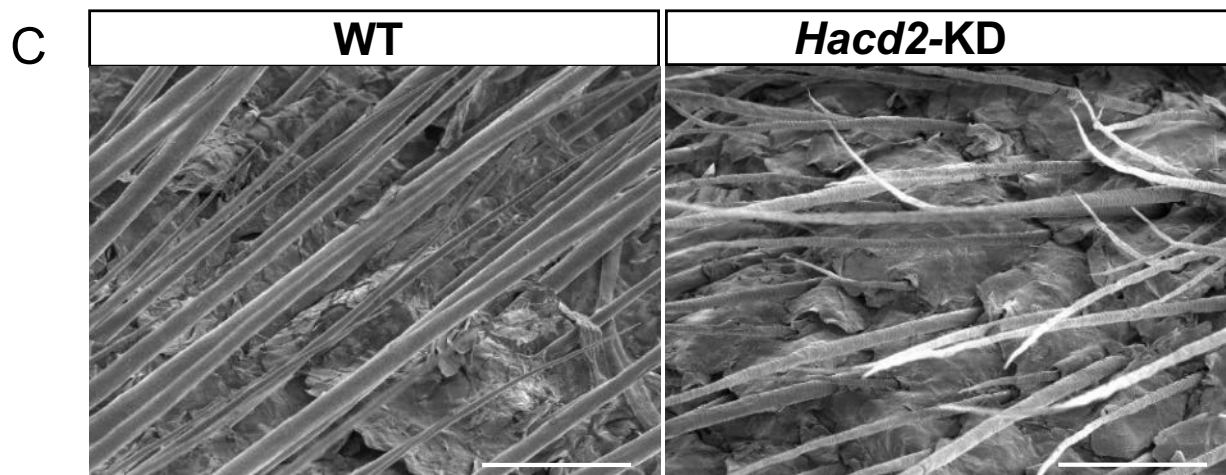
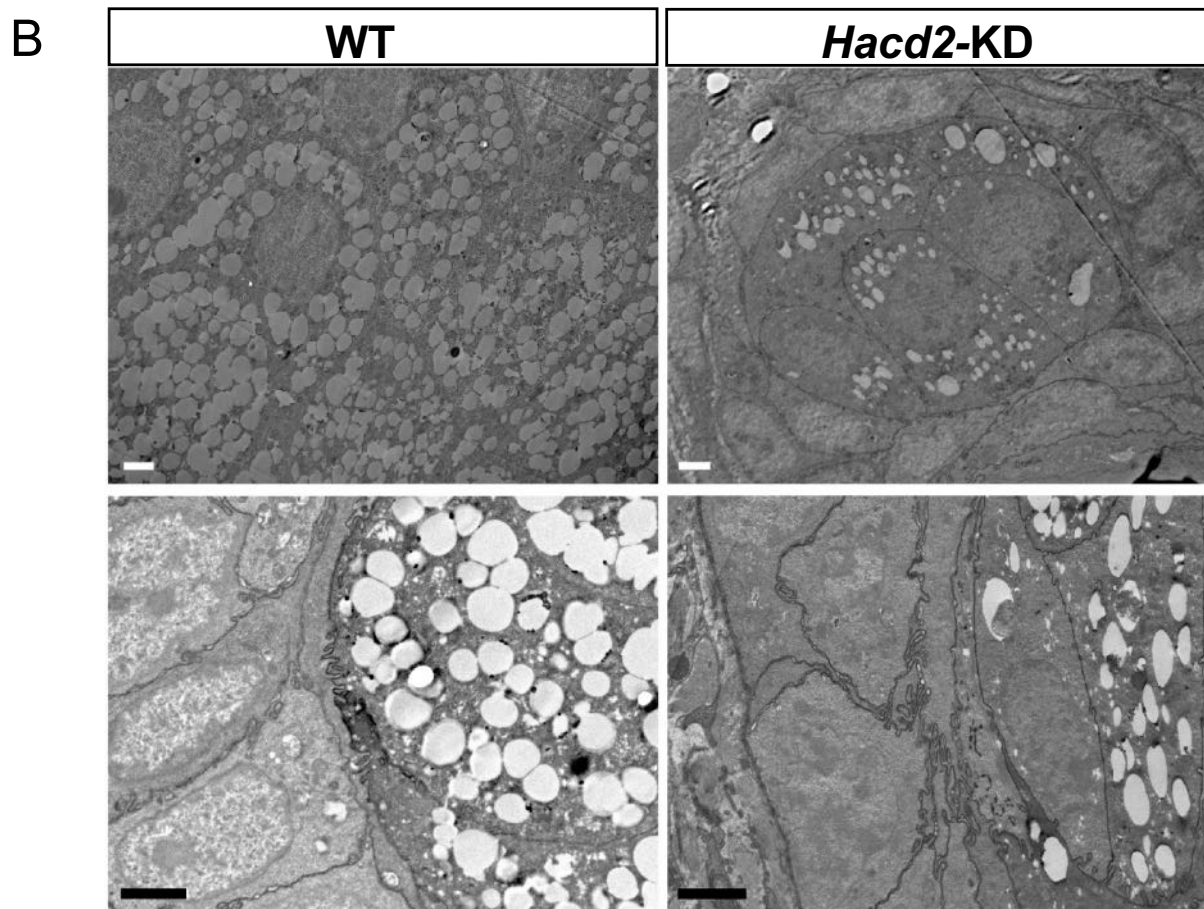
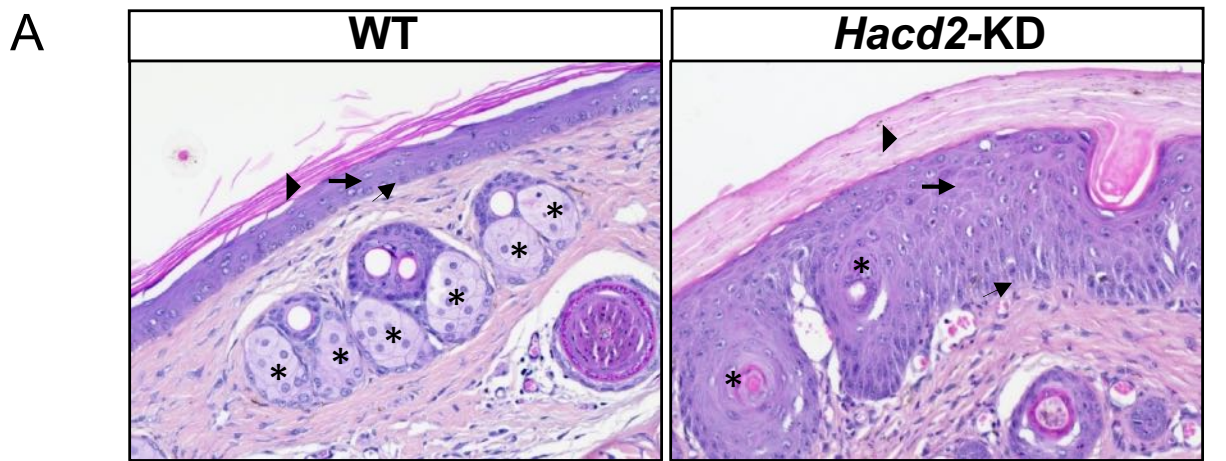


Figure 3 | Ichthyosis and sebaceous gland atrophy of skin from *Hacd2*-KD mice.

(A) Tail skin sections from *Hacd2*-KD and WT littermates at P14 stained with hematoxylin and eosin in optic microscopy, showing thicker and more condensed stratum corneum (arrow head) and stratum granulosum (bold arrow), increased number of cell layers in the stratum spinosum (arrow) and atrophy of sebaceous glands (asterisks) on *Hacd2*-KD section (magnification: 20X). **(B)** Transmission electron microscopy on skin show reduced lipid content and reduced size of sebaceous cells in *Hacd2*-KD compared to WT skin sections. **(C)** Scanning electron microscopy on skin surface reveals scaly epidermis, with a dense sheath of cornified cells around emerging hairs in *Hacd2*-KD, compared to WT. Note the short and bent hairs with irregular contours in *Hacd2*-KD, compared WT.

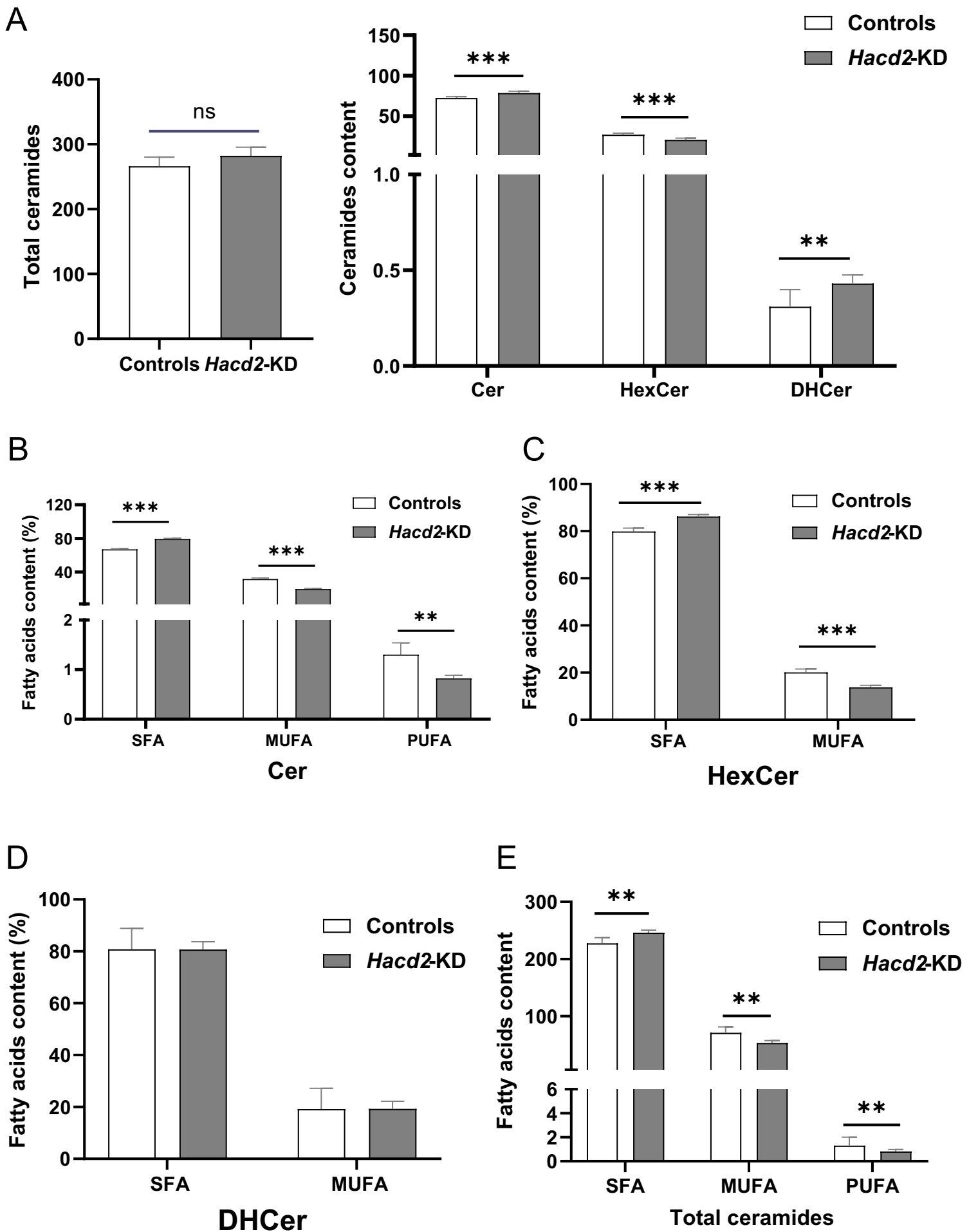


Figure 4 | Ceramide analysis in *Hacd2*-KD skin

(A) Absolute content of sphingosine-containing ceramides (Cer), 6-hydroxy-sphingosine-containing ceramides (HexCer), dihydro-sphingosine-containing ceramides (DHCer) and total ceramides in skin of *Hacd2*-KD versus control mice (pmol/mg). **(B-E)** Relative content of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids in Cer **(B)**, HexCer **(C)**, DHCer **(D)** and total ceramides **(E)** in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$.

Supplementary Figures and Tables

Figure S1 | Relative content of ceramides in *Hacd2*-KD skin

(A-C) Relative content of Cer (A), HexCer (B) and DHCer (C) species in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$.

Figure S2 | Ceramide repartition in *Hacd2*-KD skin

(A-B) Relative content of total ceramide species depending on their long chain base (LCB) **(A)** or on the length of their fatty acid **(B)** in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; **, $P<0.01$.

Table S1 | Sequence of qPCR primers.

Related to Materials and methods.

Hacd2-12F and -34R pair was used to quantify residual WT *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD skin and *Hacd2*-34F and -5R pair to quantify total *Hacd2* mRNA in WT mice.

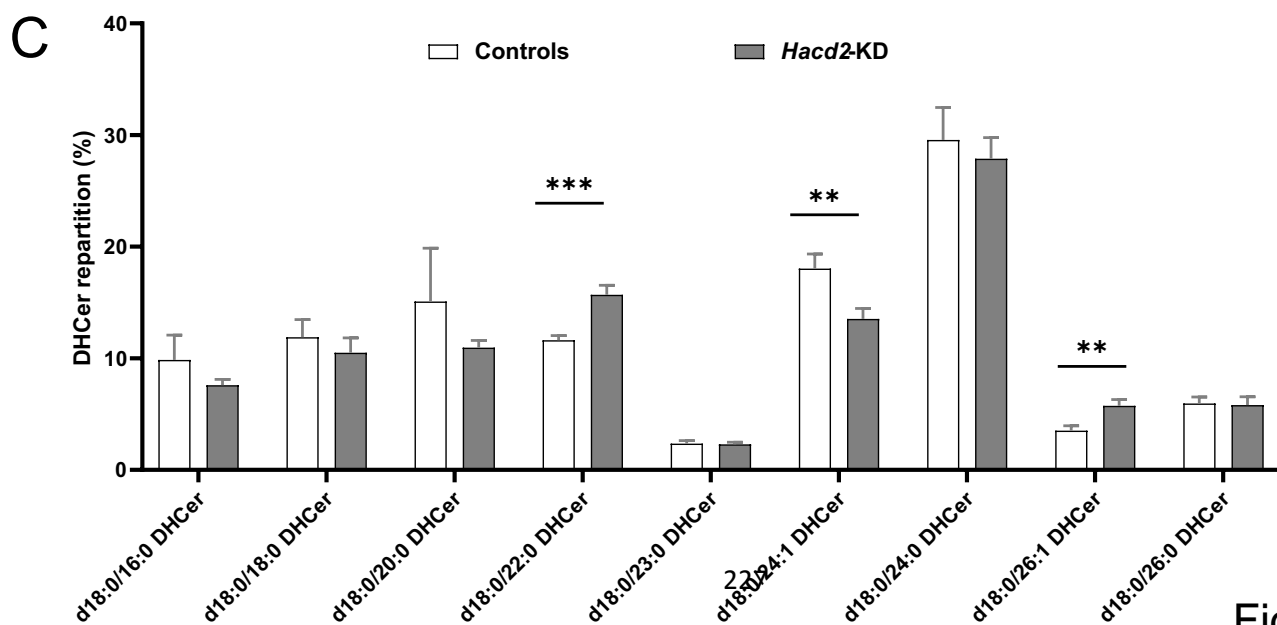
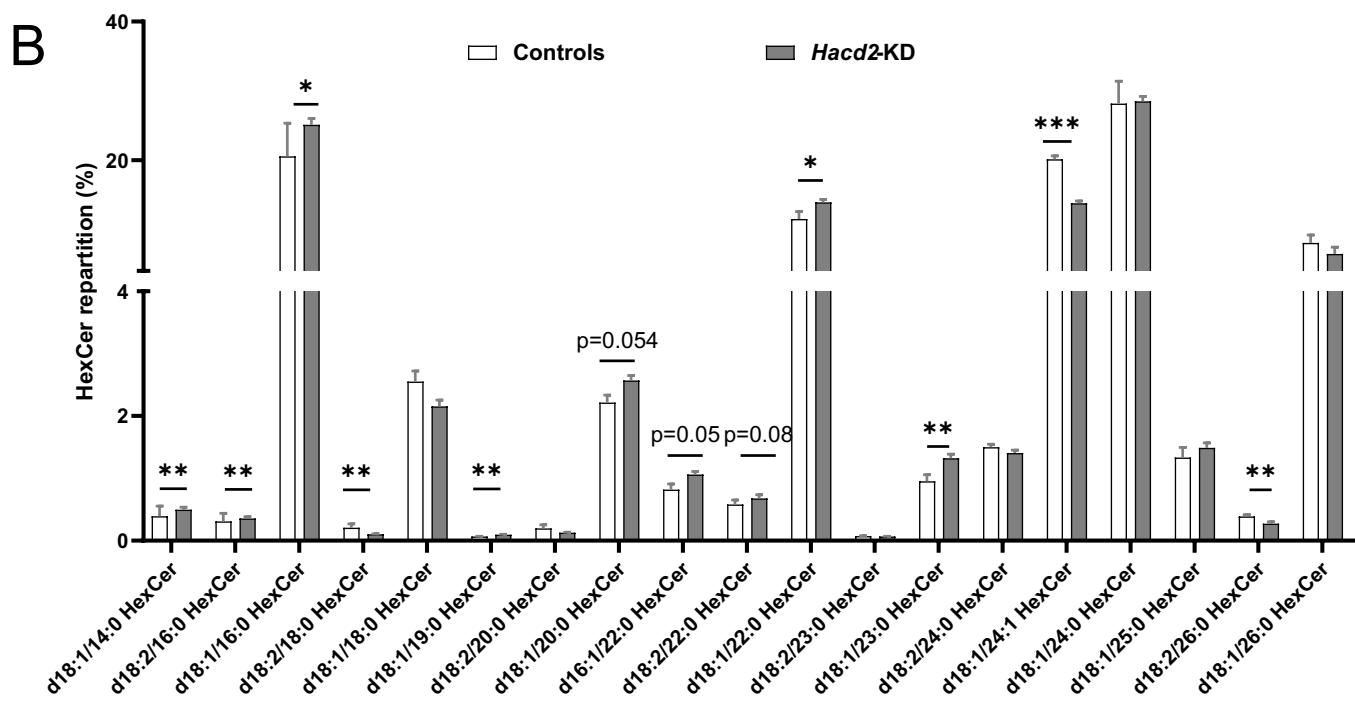
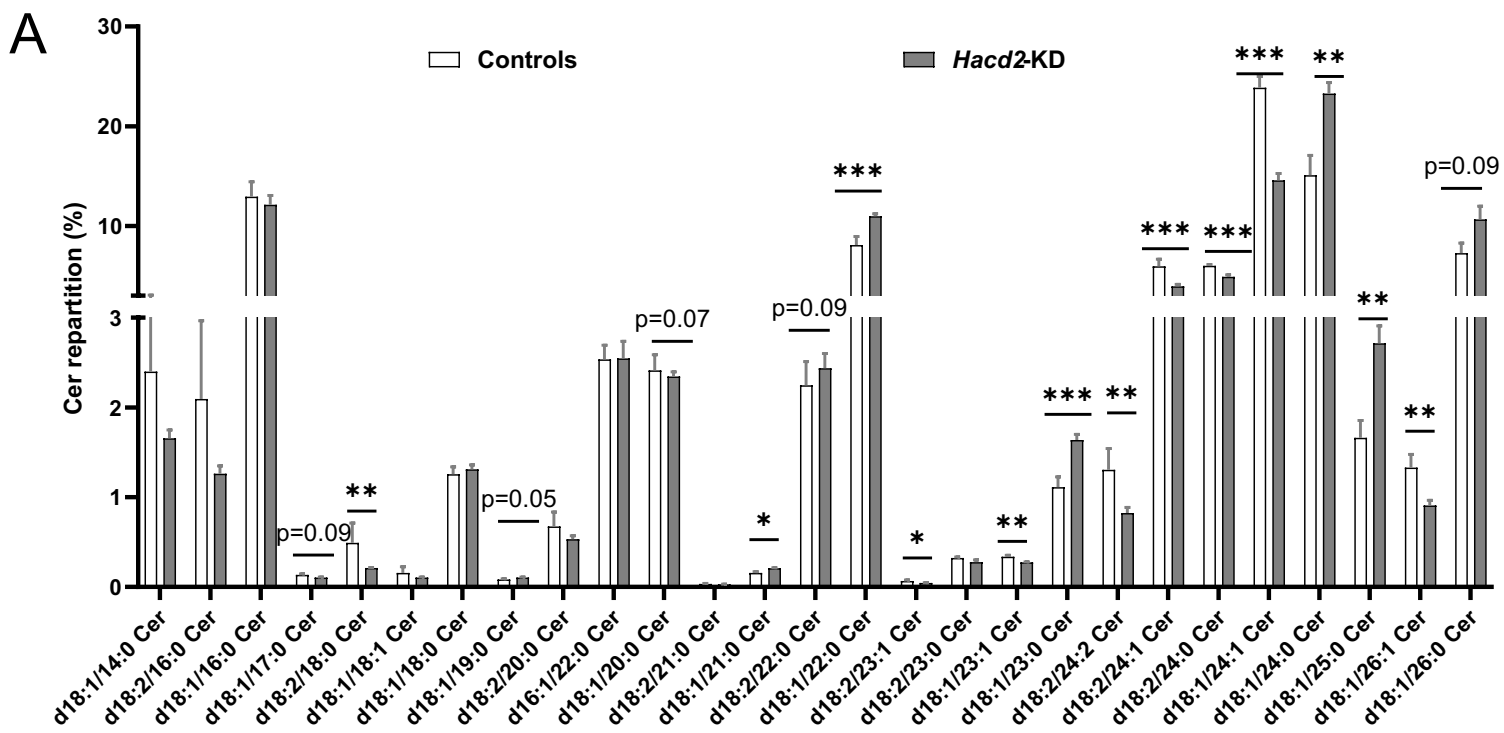


Figure S1

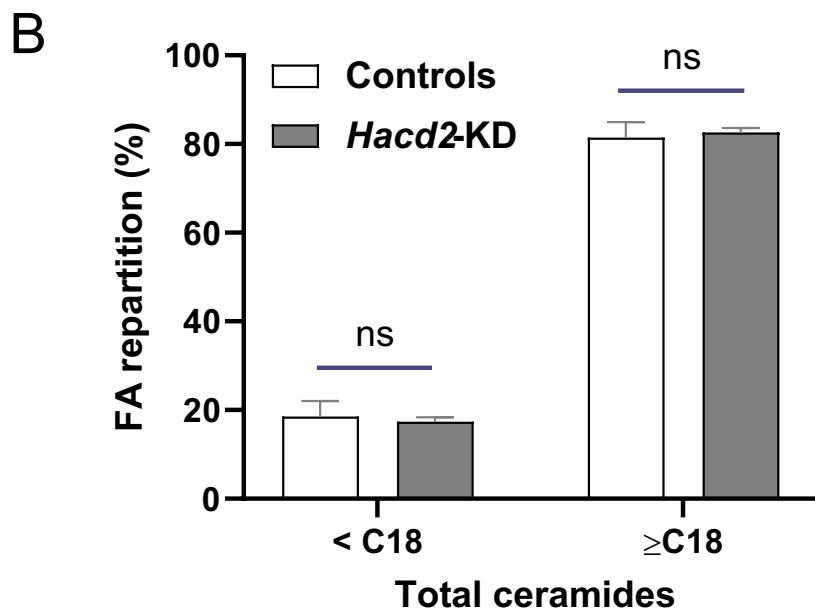
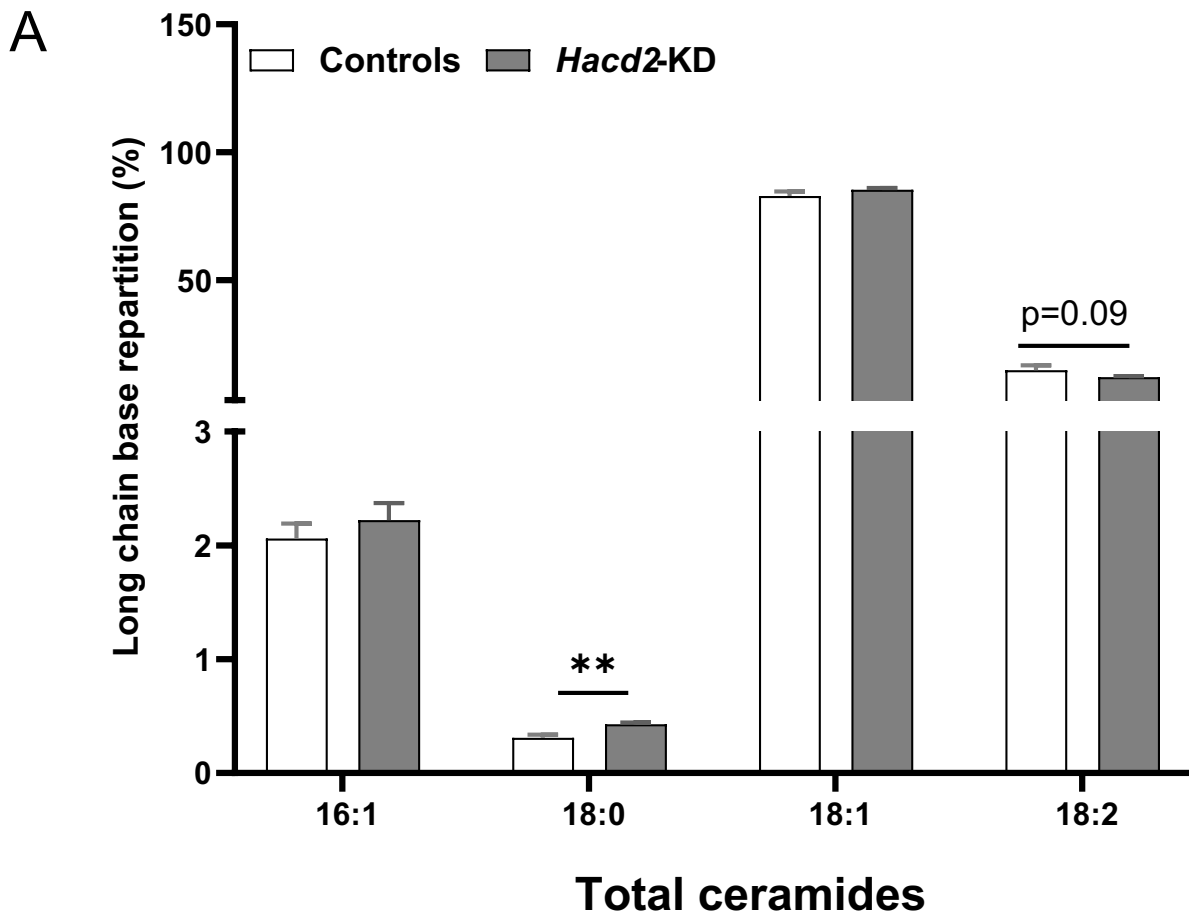


Table S1: Sequence of qPCR primers.

Related to Materials and methods.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Actin</i>	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTTCTCAAACATGATCTGGG
<i>Hacd1-fl</i>	ATGAAGAGAGCGTGGTGCTT	AAGGCGGCGTATATTGTGAG
<i>Hacd2 (residual)</i>	12F: GGTGATGACGGCGGGGTGGCT	34R: GATGGCACAATCCCTATAGCAC
<i>Hacd2 (total)</i>	34F: TGCTATAGGGATTGTGCCATC	5R: ACGGATAATTTCCGTGATTGTCC
<i>Hacd3</i>	GACGTGCAGCAGAACCCTGCTATC	CTTCTGGACTGTGATGTTCCACC
<i>Hacd4</i>	CAGCTCACAGAGAGAGTGATC	GAGTGTTTGACTGAGCCATGTC
<i>Rpl32</i>	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTGACTCTGATGG

Discussion générale et perspectives

***Hacd1*, métabolisme musculaire et prévention de l'obésité**

Nous avons prouvé que *Hacd1* joue deux grands rôles successifs. Premièrement, pendant le développement musculaire, il régule les modifications lipidiques de la membrane des myoblastes, favorisant leur fusion en myotubes et assurant ainsi une taille optimale des fibres musculaires (Blondelle *et al.*, 2015). Deuxièmement, *Hacd1* est essentiel pour l'efficacité du couplage mitochondrial dans le muscle à l'âge adulte, grâce à la régulation fine de la composition de sa membrane (Prola *et al.*, *in press*). Ainsi, en cas de déficience en *Hacd1*, le diamètre des fibres musculaires est réduit (en raison du défaut de développement) et la production d'ATP par le muscle est réduite pendant un exercice aérobie intense (en raison du défaut de couplage mitochondrial). Combinées aux anomalies structurales des tubules t caractérisées chez les chiens déficients en *HACD1* (Walmsley *et al.*, 2017), ces deux modifications induisent une perte de performance musculaire, une réduction de l'activité locomotrice spontanée et une plus grande fatigabilité musculaire.

Cependant, en même temps, les souris *Hacd1*-KO sont protégées contre l'obésité induite par l'alimentation en raison du défaut de couplage mitochondrial dans le muscle qui entraîne une dépense énergétique plus élevée au niveau de l'organisme entier (Prola *et al.*, *in press*). Un défaut de couplage finement réglé et limité au muscle squelettique pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique pour prévenir ou traiter les patients atteints d'obésité ou d'un syndrome métabolique. Il serait donc intéressant de bénéficier de l'effet métabolique thérapeutique déclenché par un déficit en *HACD1* tout en empêchant l'apparition de l'effet délétère sur le développement.

À ce stade, il est essentiel que nous récapitulions par une invalidation conditionnelle le défaut de couplage mitochondrial dans le muscle squelettique adulte, dans un contexte où la croissance musculaire qui dépend de la fusion des myoblastes est achevée. Tout d'abord, cela nous permettra de clarifier précisément la contribution spécifique du dysfonctionnement mitochondrial au défaut de locomotion des souris *Hacd1*-KO. Dans l'hypothèse d'une prévention de l'obésité induite par le régime alimentaire suite à la perte de fonction d'*Hacd1* initiée à l'âge adulte, nous testerons si l'on peut aussi guérir les animaux déjà obèses en réduisant chez eux l'expression musculaire d'*Hacd1*.

L'inactivation conditionnelle dans le muscle adulte a été obtenue en croisant l'allèle conditionnel (*Hacd1*-cKO) avec une souris portant une recombinase Cre sous le contrôle du

promoteur de l'actine squelettique humaine (*ACTA1*, ou *HSA*), inductible par le tamoxifène. La recombinaison a été initiée au sevrage à un mois (fin de la période de croissance musculaire par fusion de myoblastes) avec de la nourriture enrichie en tamoxifène. L'efficacité de recombinaison dans le muscle, quantifiée à trois mois, a été de 80%.

De façon surprenante, les souris de génotype *Hacd1*^{cko/bko} ; ACTA1-cre n'ont présenté aucune des anomalies des souris *Hacd1*-KO, ni perte de masse musculaire ni anomalie mitochondriale. Les animaux étaient phénotypiquement indistinguables de leurs congénères WT de portée. Nous avons donc émis l'hypothèse que le traitement au tamoxifène, connu pour induire une correction thérapeutique dans des modèles murins de myopathie de Duchenne (Dorchies *et al.*, 2013) et de myopathie centronucléaire MTM (Gayi *et al.*, 2018; Maani *et al.*, 2018), a également corrigé le phénotype des souris *Hacd1*-KO. Le tamoxifène pourrait donc être un traitement pour la déficience en HACD1 et nous allons poursuivre ce travail en testant la molécule administrée à partir de deux mois d'âge à des animaux *Hacd1*-KO.

Cependant, nous n'avons pas répondu à notre besoin initial de clarifier la contribution relative de l'hypotrophie et de l'anomalie mitochondriale dans la faiblesse musculaire. Pour contourner l'effet thérapeutique du tamoxifène, nous sommes contraints d'utiliser un système de recombinaison Cre inducible par la doxycycline et les souris sont en cours d'importation à partir du *Jackson Laboratory* (lignée B6;C3-Tg(ACTA1-rtTA,tetO-cre)102Monk/J). Enfin, en cas de succès de la preuve de concept génétique, une stratégie d'utilisation d'oligonucléotides antisens (OAS, ASO en anglais), plus proche d'une stratégie translationnelle (Tasfaout *et al.*, 2018), sera appliquée aux souris *Hacd1*-KO. Pour mémoire, le gène *Hacd1* est transcrit sous deux isoformes, une forme complète (*Hacd1-fl*) comprenant les sept exons, presque uniquement exprimée dans le muscle squelettique, traduite sous la forme enzymatique active et la seconde forme sans exon 5 (*Hacd1-d5*), exprimée de manière quasi-ubiquitaire et codant une protéine tronquée sans fonction enzymatique. Les OAS à tester seront dessinés pour induire l'épissage systématique de l'exon 5 des transcrits *Hacd1-fl*, avec pour objectif de produire une protéine non fonctionnelle correspondant à une délétion pharmacologique d'*Hacd1* dans le muscle squelettique.

Déficience partielle en *Hacd2* : un modèle de syndrome mitochondrial

La protéine HACD2 a été très peu étudiée. Chez l'homme, une expression quasi ubiquitaire du gène *Hacd2* a été rapportée (Wang *et al.*, 2004), cependant aucune étude fonctionnelle sur ce gène n'a été rapportée.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu montrer qu'*Hacd2* est un gène essentiel à la survie des animaux. Les souriceaux *Hacd2*-KD se distinguaient dès la naissance par leur masse corporelle légèrement réduite par rapport à leurs frères et sœurs de portée et qui évoluait avec le temps vers une cachexie fatale. Ce rôle pléiotrope du gène *Hacd2* est en accord avec la définition des syndromes mitochondriaux, c'est-à-dire des troubles multi-systémiques avec une grande variété de problèmes touchant surtout les organes qui ont une forte demande énergétique comme le cœur, le muscle, le foie et le rein (Loublier *et al.*, 2009). Nous avons émis l'hypothèse que les phénotypes observés en cas de perte de fonction du gène *Hacd2* sont évocateurs d'un syndrome mitochondrial. De manière générale, plus la maladie apparaît tôt chez les souriceaux, plus leur phénotype est sévère et ce phénotype s'aggrave généralement avec le temps, avec une évolution des symptômes déjà présents ou l'apparition de nouveaux symptômes. La perte de fonction d'*Hacd2* entraîne donc une forme grave de syndrome mitochondrial.

En cas de suspicion de syndrome mitochondrial, le plus souvent chez les enfants, le bilan métabolique représente l'exploration de première intention. Il peut montrer des anomalies évocatrices des maladies mitochondriales, comme une hyperlactatémie (>2.5 mM), une élévation du rapport lactate/pyruvate (>20 mM) (Chausseot and Paquis-Flucklinger, 2012). L'analyse sanguine réalisée sur des prélèvements sanguins a révélé un doublement de la lactatémie chez les souriceaux *Hacd2*-KD. Un tel trouble systémique vient ainsi renforcer l'hypothèse d'une atteinte mitochondriale.

Nous avons démontré un dysfonctionnement mitochondrial dans le tissu adipeux brun, le foie et les reins des souriceaux *Hacd2*-KD, caractérisé par une respiration mitochondriale réduite. La biogenèse mitochondriale a tendance à augmenter dans le foie et elle a tendance à diminuer dans les reins. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de la masse mitochondriale dans le foie pourrait être liée à un phénomène de compensation comme dans le modèle *Hacd1*-KO (Prola *et al.*, *in press*), cependant que la réduction de la masse mitochondriale dans le rein reflèterait une altération plus grave qui ne pourrait pas se compenser.

Chez les souriceaux *Hacd2*-KD, on trouve dans le tissu adipeux brun des valeurs de respiration mitochondriale réduites, comme pour le rein et le foie. Les mitochondries de ce tissu possèdent une protéine que l'on appelle thermogénine (UCP1), un canal ionique qui permet de découpler l'oxydation des substrats de la production d'ATP en favorisant la sortie des protons vers la matrice, les empêchant donc de faire tourner l'ATP synthase. L'oxydation des acides gras permet ainsi une production de chaleur (Diaz *et al.*, 2014). Chez les souris *Hacd2*-KD, on a en effet observé par thermographie infrarouge une réduction de la chaleur

émise par le tissu adipeux brun interscapulaire, défaut sans doute compensé initialement par la thermorégulation sociale permise par les frères et sœurs de portée au sein du nid.

Lors des syndromes mitochondriaux, les organes qui ont une forte demande énergétique comme le cœur et les muscles squelettiques sont souvent les plus touchés, mais de manière surprenante les paramètres respiratoires de ces organes sont normaux chez les souris *Hacd2*-KD. Ceci pourrait être expliqué par un rôle non essentiel du gène *Hacd2* dans ces organes pendant la période postnatale, ou bien par le fait qu'une expression résiduelle de 30% et 60% respectivement pour le cœur et les muscles squelettiques est suffisante pour avoir une fonction mitochondriale normale. Chaque organe aurait un seuil d'expression minimale de l'expression d'*Hacd2* pour fonctionner au minimum.

Au bilan, les souriceaux *Hacd2*-KD sont touchés par un dysfonctionnement mitochondrial, caractérisé par une atteinte du couplage mitochondrial, attesté par une hyperlactatémie qui constitue le biomarqueur associé aux syndromes mitochondriaux sévères (McCormick *et al.*, 2018; Murayama *et al.*, 2019). La cause probable de la mortalité des souriceaux *Hacd2*-KD est donc l'acidose lactique.

Élongation des acides gras à très longue chaîne : une fonction essentielle, conservée et pléiotrope

Perte de fonction des protéines du complexe, létalité et défaut de production de lipides essentiels

La fonction essentielle de la protéine Phs1p de levure a été mise en évidence par la létalité ou le défaut de croissance de souches génétiquement invalidées ou mutées pour certains acides aminés (Denic and Weissman, 2007; Kihara *et al.*, 2008). Le phénotype de létalité a été associé au défaut d'élongation des acides gras à très longue chaîne mais aussi au défaut de production des céramides et sphingolipides dont les précurseurs s'accumulent dans les levures *PHS1* Δ (Kihara *et al.*, 2008; Schuldiner *et al.*, 2005).

Chez les mammifères, l'invalidation du gène codant la HSD17B12, unique enzyme responsable de la première étape de réduction et seconde étape du cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne, conduit à la mort précoce des embryons entre les stades E8.5 et E9.5 (Rantakari *et al.*, 2010), comparable dans ce phénotype extrême à ce que nous avons observé chez les embryons *Hacd2*-KO. Dans le détail, il semble que l'arrêt de morphogénèse des embryons déficients en HSD17B12 est plus précoce mais les auteurs de l'étude ne montrent aucun embryon KO hors du sac vitellin, il est donc difficile de l'affirmer. Même éventuellement un peu plus tardive, la létalité embryonnaire causée par la déficience

en *Hacd2* montre que parmi les quatre gènes paralogues, *Hacd2* a hérité de la fonction essentielle jouée par le complexe d'élongation à ce stade de développement, au contraire d'*Hacd1* dont les embryons KO se développent et naissent sans anomalie détectée (Blondelle *et al.*, 2015). Nous ignorons si les gènes *Hacd3* et *Hacd4* sont exprimés précocement au cours de l'embryogenèse et le cas échéant, s'ils pourraient jouer un rôle également essentiel. Ce que l'on peut en revanche dire, c'est qu'au milieu de la gestation chez la souris, la fonction d'*Hacd2* qui contribue de façon ultrastructurale à l'intégrité et à l'efficacité de la mitochondrie et de façon morphologique au développement du système cardiovasculaire et à la croissance de l'embryon, n'est pas compensée par les autres gènes *Hacd*.

Grâce à l'allèle *Hacd2^{fllox}* qui, de façon inattendue, a révélé qu'il produit à l'état homozygote un phénotype hypomorphe, nous avons également pu montrer que les embryons touchés par une déficience partielle du gène *Hacd2* se développent et naissent sans anomalie morphologique remarquable. Nous n'avons pas quantifié le pourcentage de transcrits *Hacd2* exprimés dans les embryons *Hacd2*-KD mais les résultats obtenus dans les souris *Hacd2*-KD ont permis d'établir une gamme d'expression résiduelle comprise entre 5% et 30% dans la plupart des organes. En extrapolant ces résultats, on peut suggérer qu'une faible expression d'*Hacd2* ne dépassant pas 30% de la valeur normale suffit à assurer la fonction essentielle qu'il exerce au cours du développement. Cette extrapolation est compatible avec le fait que les embryons hétérozygotes pour l'allèle *Hacd2^{KO}*, dont on peut suspecter qu'ils expriment 50% des transcrits sauvages, se développent normalement.

L'analyse des mutants hypomorphes *Hacd2*-KD a permis de révéler une létalité postnatale précoce, intervenant dans le premier mois de vie du souriceau, ce qui montre que le niveau résiduel d'expression d'*Hacd2* n'est plus suffisant pour maintenir l'animal en vie. La fonction essentielle du cycle d'élongation à partir de la naissance a été préalablement mise en évidence avec la létalité des nouveau-nés déficients en ELOVL1 (Sassa *et al.*, 2013) ou ELOVL4 (Vasireddy *et al.*, 2007), causée par un dysfonctionnement de la barrière cutanée, lui-même causé par un défaut de production des céramides essentielles de la peau (Vasireddy *et al.*, 2007). Ces données confirment l'évidence que chez les mammifères, les onze protéines ELOVL et HACD du complexe d'élongation des AGTLC ne sont pas redondantes entre elles mais ont acquis une spécificité dépendante de leur niveau d'expression dans un organe, d'un profil d'expression restreint (par exemple, HACD1 dans le muscle squelettique) ou dans leur capacité à prendre en charge certains substrats (par exemple, ELOVL4 dans l'œil ; Agbaga *et al.*, 2010). Dans la peau, on peut ainsi supposer que la fonction de barrière cutanée est majoritairement assurée par des complexes associant ELOVL1/4+HSD17B12+HACD2/[3/4 ?]+TECR. Il serait intéressant de pouvoir quantifier les

différents complexes et de voir s'ils fonctionnent dans des combinaisons indépendantes ou dans des combinaisons mélangeant les différentes ELOVL et HACD.

Au-delà d'anomalies dans l'élongation des AGTLC, l'analyse des mutants perte de fonction de levure pour Phs1p a révélé des anomalies de production des céramides et sphingolipides (Kihara *et al.*, 2008; Schuldiner *et al.*, 2005). Chez les mutants perte de fonction pour HACD1 ou HACD2, nous avons également mis en évidence que l'absence totale ou partielle de ces protéines induisait une série de défauts lipidiques qui ne se limite pas strictement à réduire la quantité d'AGTLC, mais inclut aussi un défaut d'insaturation des acides gras, un moindre appauvrissement des membranes en lysophosphatidylcholine (LPC ; Blondelle *et al.*, 2015, une réduction du contenu en cardiolipine (Prola *et al.*, *in press*) et dans le travail présenté ici sur les embryons *Hacd2*-KO, un défaut d'intégrité des cardiolipines dont une partie est oxydée. Les protéines HACD et peut-être d'autres du complexe d'élongation, interagissent donc fonctionnellement avec les désaturases et les voies métaboliques des cardiolipines et de la LPC, ce qui les place au cœur d'un hub moléculaire d'ajustement fonctionnel de la composition en phospholipides des membranes cellulaires, par un jeu d'interactions qui reste à découvrir. Ce relais fonctionnel vers l'homéostasie lipidique, incluant mais non limité à l'allongement des AGTLC, accroît sans doute la pléiotropie d'action des protéines HACD.

Au bilan, le complexe d'élongation des AGTLC est essentiel à la survie de la levure et de la souris, ce dès le développement embryonnaire. Chez les mammifères, il est formé d'un groupe de 13 protéines dont quatre ont été à ce jour démontrées comme étant individuellement essentielle à la survie de la souris et révélant pour certaines d'entre elles l'absence de redondance pour des fonctions qui se sont diversifiées au cours de l'évolution.

Performance mitochondriale : contenu et intégrité des cardiolipines

La baisse d'efficacité énergétique quantifiée chez les souris *Hacd1*-KO a pu être comprise à l'échelle de la cellule musculaire. Nous avons mis en évidence une baisse significative du contenu en cardiolipine de la membrane mitochondriale et prouvé que l'enrichissement secondaire en cardiolipine de cette membrane dans les mitochondries musculaires de souris *Hacd1*-KO permettait de restaurer le couplage respiratoire abaissé suite à la déficience en *Hacd1*. Le déficit de contenu en cardiolipine est donc central dans le dysfonctionnement mitochondrial identifié.

Chez les embryons *Hacd2*-KO, nous avons retrouvé des anomalies des cardiolipines dont une partie est mono- ou dioxydée et qui sont majoritairement porteuses d'une insaturation supplémentaire en comparaison avec les embryons WT. Ceci représente une donnée préliminaire qui reste à confirmer par des analyses plus fines et plus poussées, en particulier sur les conséquences fonctionnelles que peuvent induire les formes oxydées des cardiolipines. Comme chez les souris *Hacd1*-KO, cette altération des cardiolipines est accompagnée de modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries de tous les lignages embryonnaires analysés, en relation avec le profil d'expression étendu d'*Hacd2* dans l'embryon. Nous attendons les résultats d'une analyse lipidomique du foie et du rein des souris *Hacd2*-KD dont le couplage respiratoire est également significativement abaissé. Ces résultats sont cohérents avec la létalité embryonnaire précoce à un stade très proche, induite par le défaut d'assemblage de l'ATP synthase résultant de la perte de fonction de la protéine TMEM70 (Vrbacký *et al.*, 2016). Il serait donc particulièrement intéressant d'évaluer le fonctionnement mitochondrial et de réaliser une analyse lipidomique des embryons déficients pour le gène *Hsd17B12*, dont l'arrêt de croissance intervient dans la même période du développement précoce, avant E9. Ceci permettrait de relier la mort de ces embryons à une cause similaire de dysfonctionnement mitochondrial, peut-être en lien avec des anomalies lipidiques convergentes. Au contraire, cela pourrait permettre d'attribuer à HACD2 un rôle singulier et indépendant du complexe d'élongation.

Là encore, l'identification des interactions entre les protéines HACD et les autres protéines impliquées dans le métabolisme des phospholipides est une perspective importante de ce travail. Pour réduire la complexité induite par l'existence de nombreux gènes paralogues chez les mammifères, cette question sera dans un premier temps abordée chez la levure en réalisant sur des souches déficientes en *PHS1* des analyses lipidomiques et fonctionnelles. Des expériences de complémentation génétique ou directement d'ajout de lipides sur ces souches déficientes, aideront à identifier parmi les voies modifiées celles qui jouent un rôle majeur dans les phénotypes d'intérêt.

Une autre question en cours d'investigation consiste à comprendre le rôle joué par la cardiolipine dans le couplage mitochondrial. Chez les souris *Hacd1*-KO, nous avons montré que les mitochondries dont le contenu en cardiolipine est abaissé ont un couplage réduit en l'absence d'anomalie d'assemblage ou de fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons et de l'ATP synthase. Notre modèle révèle donc un mécanisme qui n'est pas le même que celui des embryons déficients en *Tmem70* (Vrbacký *et al.*, 2016) évoqués plus haut, mais pointe sur une anomalie entre l'étape d'enrichissement en protons de l'espace intermembranaire et leur rôle moteur pour faire tourner l'ATP synthase. Deux possibilités sont explorées : une première hypothèse est fondée sur une perméabilité aux protons de la

membrane mitochondriale interne qui serait accrue lorsqu'elle est appauvrie en cardiolipine, révélant un possible rôle physiologique « d'isolant moléculaire » ; une seconde hypothèse repose sur un rôle de piège à protons de la cardiolipine, lipide polaire, qui favoriserait le transfert latéral des protons de la chaîne de transfert des électrons vers l'ATP synthase. Ces deux hypothèses sont à l'étude en collaboration avec des collègues biophysiciens de Sorbonne Université.

Vasculogenèse et angiogenèse : un autre exemple de fusion membranaire défectueuse ?

L'événement anormal le plus précoce dans le développement de l'embryon *Hacd2*-KO est l'absence de développement du réseau vasculaire de sa principale annexe à ce stade, le sac vitellin. Ainsi que nous l'avons décrit dans l'introduction (chapitre 3.2.2.), ce réseau a pour origine des cellules du mésoderme extraembryonnaire appelées hémangioblastes, apparaissant dès E7.0. Les hémangioblastes sont les précurseurs des cellules endothéliales qui préfigurent la mise en place initiale (vasculogenèse) et le développement (angiogenèse) des vaisseaux sanguins (Fish and Wythe, 2015) ainsi que des premiers globules rouges. Bien que nous n'ayons pas exploré précisément cet aspect du phénotype, nous pouvons dire qu'une partie du développement des hémangioblastes en îlots sanguins se déroule correctement dans les embryons *Hacd2*-KO. Les îlots formés à partir des hémangioblastes à partir du stade E7.5, sont visibles chez les embryons KO et ponctuent la surface du sac vitellin. Bien sûr, une observation à échelle histologique serait précieuse pour confirmer cette observation. En revanche, nous n'avons jamais observé de plexus capillaire à la surface du sac vitellin des embryons *Hacd2*-KO, révélant un évident défaut de connexion entre elles des cellules endothéliales. Il est possible d'imaginer plusieurs scénarios pour expliquer ce défaut majeur de vasculogenèse, à partir de mécanismes chronologiques non exclusifs les uns des autres. Par exemple, les hémangioblastes pourraient ne pas s'être différenciés en globules rouges et cellules endothéliales ou chacun de ces deux lignages pourrait ne pas avoir proliféré. Cette hypothèse est soutenue par l'implication indirecte du gène *HACD2* et plus directe du gène *ELOVL2* dans le processus cancéreux chez la femme (Kang *et al.*, 2019), suggérant que l'activité d'élongation des AGTLC et des protéines du complexe est importante dans le contrôle des propriétés de la membrane cellulaire pour la prolifération ou l'apoptose, deux mécanismes très importants pendant la croissance de l'embryon. Un marquage *whole-mount* ou sur coupe d'un sac vitellin avec un jeu d'anticorps spécifique des lignages précoces des hémangioblastes (KDR+), des cellules endothéliales (TEK+), des globules rouges (Hbb-bH1+) et de cellules en prolifération (Ki67+) permettrait de progresser. On pourrait également mettre en culture des

hémangioblastes triés à partir du sac vitellin d'un unique embryon au stade E8.5-E9.5 et observer *in vitro* la capacité de prolifération et de différenciation de ces cellules KDR+/cKIT+/CD45- (Fang *et al.*, 2016) ainsi que des précurseurs qui en dérivent.

On sait par ailleurs que la formation du plexus à partir des îlots est assurée par la fusion des cellules endothéliales et un possible défaut de fusion nous rappelle celui que nous avons révélé pour les myoblastes déficients en *Hacd1*, à l'origine de la réduction du diamètre des fibres musculaires noté chez les souris *Hacd1*-KO, les chiens *cnm* (Blondelle *et al.*, 2015) et chez les patients homozygotes mutés pour les allèles perte de fonction d'*HACD1* (Al Amrani *et al.*, 2020 ; Muhammad *et al.*, 2013 ; Toscano *et al.*, 2017). L'analyse des lipides du sac vitellin pourrait être informative, en ciblant dans un premier temps les acides gras saturés et mono-insaturés et la lysophosphatidylcholine (LPC). Il a été montré que la fusion des cellules endothéliales du sac vitellin ne peut se faire sans les signaux provenant des cellules adjacentes de l'endoderme primitif qui composent la couche externe du feuillet viscéral du sac vitellin (Palis *et al.*, 1995). La présence de nombreuses villosités à la face apicale de ces cellules endodermiques, en connexion directe avec la cavité vitelline, permet d'assigner à ces cellules une fonction privilégiée d'absorption de nutriments, seule zone d'échange à ce stade précoce avec le sang maternel (Batten et Haar, 1979). Les cellules qui embrassent une fonction d'absorption le font au prix d'une forte dépense énergétique permise par une importante densité mitochondriale. Une possibilité que nous n'avons pas explorée serait par exemple que la déficience en *Hacd2* affecte l'efficacité mitochondriale des cellules de l'endoderme primitif, limitant ainsi le transfert de molécules signalisantes de la mère vers le sac vitellin puis vers l'embryon, avec pour conséquence le défaut de vasculogénèse vitelline et d'angiogénèse embryonnaire. C'est une hypothèse qui pourrait d'être appréhendée en vérifiant d'abord l'expression d'*Hacd2* dans les cellules de l'endoderme primitif à partir d'un marquage β Gal d'un embryon *Hacd2*^{KO/+} au stade E7.5 puis en observant les mitochondries de ces cellules en microscopie électronique. En cas d'anomalie, le KO conditionnel d'*Hacd2* dans ce lignage pourrait être réalisé, par exemple via la lignée permettant l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur de *Sox17*, exprimé dans ce lignage (Artus *et al.*, 2011).

Nous nous sommes finalement posé la question suivante : le défaut de vasculogénèse vitelline peut-il à lui seul expliquer les défauts observés chez l'embryon, par défaut de perfusion à un stade où la placentation n'est pas encore fonctionnelle et où le sac vitellin est l'unique intermédiaire entre la mère et l'embryon ? C'est une hypothèse attirante mais elle ne peut être totalement validée. En effet, l'inactivation du gène codant l'un des récepteurs du VEGF, le KDR (alias VRGFR2 ou FLK1) induit une absence totale de vascularisation vitelline et en effet,

provoque une létalité embryonnaire précoce (Shalaby *et al.*, 1995). Cependant, les embryons *Kdr*-KO récupérés à E9.5 ont une morphologie normale et ont achevé leur retournement, démontrant que cette étape, non franchie par 19% des embryons *Hacd2*-KO, est indépendante de la mise en place de la vascularisation vitelline. Par ailleurs, il semble sur l'image publiée que le volume céphalique des embryons *Kdr*-KO à E9.5 est similaire à celui de l'embryon contrôle, ce qui conforte que le phénotype des embryons *Hacd2*-KO n'est pas le seul fait du défaut de vascularisation vitelline mais découle très probablement, comme nous l'avons noté, d'un dysfonctionnement mitochondrial global des cellules de l'embryon lui-même.

Barrière cutanée : *Hacd2* et ω -o-acylcéramides ?

La peau, organe le plus externe du corps humain, représente 10% de la masse totale d'un individu adulte et possède de multiples fonctions. Elle représente entre autres une barrière essentielle à notre survie. L'observation des souris mutantes dépourvues à 95% du gène *Hacd2* dans la peau a révélé un phénotype d'ichtyose, initialement localisée au niveau des membres postérieurs et de la queue mais avec une extension rostrale progressive pouvant toucher les membres antérieurs et les oreilles lorsque les animaux survivent. L'examen microscopique de la peau des souriceaux partiellement invalidés pour *Hacd2* a révélé son rôle dans le fonctionnement normal de l'épiderme et des glandes sébacées.

Chez l'homme ou le chien, les ichtyoses constituent un groupe hétérogène de trouble de la cornification, principalement caractérisé par un épaissement de la couche cornée sujette à une desquamation anormale et généralisée. La plupart des ichtyoses connues sont non syndromiques et la manifestation clinique se limite à la peau (Takeichi and Akiyama, 2016; Traupe *et al.*, 2014). Contrairement à ce qui est connu dans la littérature, les signes de l'ichtyose chez les souris déficientes en *Hacd2* ne sont pas isolés mais contribuent à un syndrome marqué par une atteinte multi-organes dominée par un dysfonctionnement mitochondrial et une acidose lactique. Ces défauts entraînent chez les souriceaux un arrêt de la croissance, suivie en quelques jours d'une cachexie et d'un manque de vitalité amenant les souriceaux à la mort en trois à quatre semaines. Histologiquement, les souris mutantes présentent un épaissement des trois couches superficielles de l'épiderme, les glandes sébacées sont quasi-vides de sébum et les poils ont un contour irrégulier, écaillé et des extrémités fourchues ou cassées.

La plupart des ichtyoses sont des processus pathogènes liés aux défauts de la barrière de la couche cornée en raison de la synthèse, du métabolisme et du transport aberrant des lipides fonctionnels de la barrière cutanée (Akiyama, 2017; Kihara, 2016). Ces lipides cutanés sont

principalement composés de céramides (50%) (Feingold and Elias, 2014). Pour cette raison et en collaboration avec la plateforme de lipidomique de Dijon, nous avons montré que ces altérations histologiques étaient associées à des modifications de la composition lipidique de la peau, caractérisée principalement par une augmentation des céramides. Les souriceaux *Hacd2*-KD présentent une augmentation des céramides à base de sphingosine (appelées Cer dans l'article) et des céramides contenant de la dihydro-sphingosine (DHCer), tandis que les céramides contenant de la 6-hydroxy-sphingosine (HexCer) étaient légèrement diminuées. Nos données de lipidomique restent cependant insuffisantes pour expliquer le rôle de ces lipides complexes dans le fonctionnement normal de la barrière cutanée et du maintien des glandes sébacées intacte, nous sommes donc en train de réaliser des analyses plus poussées en dosant notamment les cires et les ω -O-acylcéramides, essentielles au lien entre les cornéocytes et les lamelles lipidiques (kihara).

Parmi les sept gènes d'élongation, les déficits en *Elovl 1* et *4* sont connus pour provoquer une ichtyose chez la souris (Cameron *et al.*, 2007; Sassa *et al.*, 2013). Le phénotype lié à la perte de fonction de ces gènes entraîne une mort prématurée quelque heures après la naissance, suite à une déshydratation importante, due à un défaut de la barrière cutanée et un déficit en céramides comportant au moins 26 carbones et en particulier les ω -O-acylcéramides. Les souris mutantes pour *Elovl3* présentent des défauts de pilosité et de barrière épidermique, dus à des anomalies dans la composition des triglycérides, esters de cire des poils et du sébum (Westerberg *et al.*, 2004).

La deuxième et la quatrième réaction de réduction sont catalysées respectivement par des gènes uniques nommés respectivement *Hsd17B12* et *Tecr* (Kihara, 2012). Aucun variant hypomorphe de ces gènes en lien avec un éventuel dysfonctionnement de la barrière cutanée n'a été décrit dans la littérature. Nos résultats montrent qu'*Hacd2* est nécessaire pour le fonctionnement de la peau. En effet, l'expression d'*Hacd2* est quasi ubiquitaire avec notamment une forte expression dans la peau. De la même manière, nous avons montré que les gènes *Hacd3* ou *Hacd4* présentaient une expression quasi ubiquitaire avec notamment une plus au moins forte expression dans la peau

Le phénotype moins sévère observé dans le contexte d'une inactivation partielle de *Hacd2* par rapport à la létalité précoce due à la délétion *Elovl1* ou *Elovl4* peut suggérer soit une compensation partielle par d'autres gènes *Hacd*, notamment *Hacd3*, ou bien que l'expression résiduelle de 5% peut être suffisante pour sauver la létalité précoce. Cette dernière hypothèse serait en accord avec le fait que l'expression restreinte dans l'épiderme d'*Elovl4*, donnant une teneur en acylcéramide allant jusqu'à 0,1 à 0,3 par rapport au type sauvage, sauve les

nouveau-nés de la létalité précoce (McMahon *et al.*, 2011). Ceci suggère qu'un niveau très bas d'expression d'*Hacd2* dans la peau pourrait également protéger d'une ichtyose sévère et d'une létalité précoce. La réalisation d'un knockout conditionnel serait intéressante pour limiter l'invalidation d'*Hacd2* au territoire cutané afin de mieux comprendre le phénotype spécifique dans cet organe. Cependant, en tenant compte de la thématique de notre laboratoire, ce projet ne pourra être fait qu'en collaboration.

Au bilan, Nous avons précédemment démontré que la déficience en *Hacd2* compromet la fonction mitochondriale dans le foie, les reins et le tissu adipeux brun. La maladie mitochondriale a été accompagnée d'une hyperlactatémie qui a probablement précipité la létalité. Aucun défaut n'a été observé dans les coupes de peau des souriceaux déficients en *Hacd2*, ce qui exclut probablement le dysfonctionnement mitochondrial comme cause du phénotype cutané observé. Bien que les mitochondries n'ont pas été évaluées dans la peau en raison de limitations techniques, un défaut de l'ATP mitochondrial à la suite d'un déficit en *Hacd2*, s'il est présent, ne participerait probablement pas au phénotype de la peau, car l'épuisement complet des composants du complexe respiratoire ne perturbent pas la différenciation de la peau, ce qui indique que la peau dépend principalement du métabolisme anaérobie (Baris *et al.*, 2011). Néanmoins, il n'est pas exclu que la diminution de l'efficacité mitochondriale de la peau puisse participer à l'hyperlactatémie chez les mutants déficients en *Hacd2*.

Nos résultats caractérisent le gène *Hacd2* comme un contributeur supplémentaire aux lipides de la peau et suggèrent que les mutations *Hacd2* pourraient être impliquées dans l'ichtyose syndromique accompagnant les maladies mitochondriales.

Bibliographie

- Aberdam, D. (2007). Réparer ou régénérer, il faut choisir.... *Médecine/sciences* 23, 791–793.
- Agbaga, M.-P., Brush, R.S., Mandal, M.N.A., Henry, K., Elliott, M.H., and Anderson, R.E. (2008). Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12843–12848.
- Agbaga, M.-P., Mandal, M.N.A., and Anderson, R.E. (2010). Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J. Lipid Res.* 51, 1624–1642.
- Ahmed, S.T., Craven, L., Russell, O.M., Turnbull, D.M., and Vincent, A.E. (2018). Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies. *Neurotherapeutics* 15, 943–953.
- Akiyama, M. (2014). The roles of ABCA12 in epidermal lipid barrier formation and keratinocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 435–440.
- Akiyama, M. (2017). Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *J. Dermatol. Sci.* 88, 3–9.
- Akiyama, M., Sugiyama-Nakagiri, Y., Sakai, K., McMillan, J.R., Goto, M., Arita, K., Tsuji-Abe, Y., Tabata, N., Matsuoka, K., Sasaki, R., *et al.* (2005). Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J. Clin. Invest.* 115, 1777–1784.
- Al Amrani, F., Gorodetsky, C., Hazrati, L.-N., Amburgey, K., Gonorazky, H.D., and Dowling, J.J. (2020). Biallelic LINE insertion mutation in HACD1 causing congenital myopathy. *Neurol. Genet.* 6, e423.
- Andrés-Delgado, L., and Mercader, N. (2016). Interplay between cardiac function and heart development. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1707–1716.
- Ansari, M.N.A., Nicolaidis, N., and Fu, H.C. (1970). Fatty acid composition of the living layer and stratum corneum lipids of human sole skin epidermis. *Lipids* 5, 838–845.
- Artus, J., Piliszek, A., and Hadjantonakis, A.-K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: Sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev Biol* 350, 393–404.
- Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, J.-P., Miquel, M., Tellier, F., *et al.* (2008). The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14727–14731.
- Baris, O.R., Klose, A., Kloepper, J.E., Weiland, D., Neuhaus, J.F.G., Schauen, M., Wille, A., Müller, A., Merkwirth, C., Langer, T., *et al.* (2011). The Mitochondrial Electron Transport Chain Is Dispensable for Proliferation and Differentiation of Epidermal Progenitor Cells. *STEM CELLS* 29, 1459–1468.
- Barry, A. (1948). The functional significance of the cardiac jelly in the tubular heart of the chick embryo. *Anat. Rec.* 102, 289–298.

- Batten, B.E., and Haar, J.L. (1979). Fine structural differentiation of germ layers in the mouse at the time of mesoderm formation. *Anat. Rec.* *194*, 125–141.
- Bénit, P., Lebon, S., and Rustin, P. (2009). Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 181–185.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., *et al.* (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J. Mol. Cell Biol.* *7*, 429–440.
- Blot, S., Tiret, L., Devillaire, A.C., Fardeau, M., and Dreyfus, P.A. (2002). Phenotypic description of a canine centronuclear myopathy. In *Journal of the Neurological Sciences*, (Elsevier Science), pp. S9–S9.
- Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2010). The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *11*, 25–44.
- Cameron, D.J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L., and Zhang, K. (2007). Essential role of Elov14 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci.* *3*, 111–119.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 328–340.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine Complex I is a Complex of 45 Different Subunits. *J. Biol. Chem.* *281*, 32724–32727.
- Carter, A.M., and Enders, A.C. (2016). Early studies of placental ultrastructure by electron microscopy. *Placenta* *41*, 10–13.
- Cecchini, G. (2003). Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 77–109.
- Chaussonot, A., and Paquis-Flucklinger, V. (2012). Stratégie diagnostique des maladies mitochondriales. *MISE AU POINT* *6*.
- Chechi, K., Carpentier, A.C., and Richard, D. (2013). Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 408–420.
- Chong, D.C., Koo, Y., Xu, K., Fu, S., and Cleaver, O. (2011). Stepwise arteriovenous fate acquisition during mammalian vasculogenesis. *Dev. Dyn.* *240*, 2153–2165.
- Curry, S., Brick, P., and Franks, N.P. (1999). Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1441*, 131–140.
- Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acid Length. *Cell* *130*, 663–677.
- Dequéant, M.-L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A., and Pourquié, O. (2006). A Complex Oscillating Network of Signaling Genes Underlies the Mouse Segmentation Clock. *Science* *314*, 1595–1598.
- Diaz, M.B., Herzig, S., and Vegiopoulos, A. (2014). Thermogenic adipocytes: From cells to physiology and medicine. *Metabolism* *63*, 1238–1249.

- Di Gregorio, E., Borroni, B., Giorgio, E., Lacerenza, D., Ferrero, M., Lo Buono, N., Ragusa, N., Mancini, C., Gaussen, M., Calcia, A., *et al.* (2014). ELOVL5 Mutations Cause Spinocerebellar Ataxia 38. *Am. J. Hum. Genet.* *95*, 209–217.
- Dorchies, O.M., Reutenauer-Patte, J., Dahmane, E., Ismail, H.M., Petermann, O., Patthey-Vuadens, O., Comyn, S.A., Gayi, E., Piacenza, T., Handa, R.J., *et al.* (2013). The Anticancer Drug Tamoxifen Counteracts the Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.* *182*, 485–504.
- Downie, M.M.T., and Kealey, T. (2004). Human sebaceous glands engage in aerobic glycolysis and glutaminolysis. *Br. J. Dermatol.* *151*, 320–327.
- Dzierzak, E., and Bigas, A. (2018). Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* *22*, 639–651.
- Ekblom, P., and Thesleff, I. (1985). Control of kidney differentiation by soluble factors secreted by the embryonic liver and the yolk sac. *Dev. Biol.* *110*, 29–38.
- Elias, P.M., and Wakefield, J.S. (2014). Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 781–791.e1.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., Meer, G. van, Wakelam, M.J.O., and Dennis, E.A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* *50*, S9–S14.
- Fang, J.S., Gritz, E.C., Marcelo, K.L., and Hirschi, K.K. (2016). Isolation of Murine Embryonic Hemogenic Endothelial Cells. *J Vis Exp*.
- Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 280–294.
- Fish, J.E., and Wythe, J.D. (2015). The molecular regulation of arteriovenous specification and maintenance. *Dev. Dyn.* *244*, 391–409.
- Francou, A., Saint-Michel, E., Mesbah, K., Théveniau-Ruissy, M., Rana, M.S., Christoffels, V.M., and Kelly, R.G. (2013). Second heart field cardiac progenitor cells in the early mouse embryo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 795–798.
- Frazier, A.E., Thorburn, D.R., and Compton, A.G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J. Biol. Chem.* *294*, 5386–5395.
- Frisdal, A., and Trainor, P.A. (2014). Development and Evolution of the Pharyngeal Apparatus. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *3*, 403–418.
- Frum, T., and Ralston, A. (2015). Cell signaling and transcription factors regulating cell fate during formation of the mouse blastocyst. *Trends Genet.* *31*, 402–410.
- Gayi, E., Neff, L.A., Massana Muñoz, X., Ismail, H.M., Sierra, M., Mercier, T., Décosterd, L.A., Laporte, J., Cowling, B.S., Dorchies, O.M., *et al.* (2018). Tamoxifen prolongs survival and alleviates symptoms in mice with fatal X-linked myotubular myopathy. *Nat. Commun.* *9*, 4848.
- Gray, M.W., and Burger, G. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *5*.

- Greene, R.S., Downing, D.T., Pochi, P.E., and Strauss, J.S. (1970). Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid. *J. Invest. Dermatol.* *54*, 240–247.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 139–150.
- Haslam, T.M., and Kunst, L. (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci.* *210*, 93–107.
- Hirabayashi, T., Anjo, T., Kaneko, A., Senoo, Y., Shibata, A., Takama, H., Yokoyama, K., Nishito, Y., Ono, T., Taya, C., *et al.* (2017). PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* *8*.
- Horvath, R. (2012). Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ10). *J. Inherit. Metab. Dis.* *35*, 679–687.
- Hu, D., and Cross, J.C. (2010). Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 341–354.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.* *582*, 2435–2440.
- Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1859*, 1156–1163.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *Science* *281*, 64–71.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., and Jakobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* *45*, 237–249.
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z., and Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *J. Appl. Physiol.* *89*, 81–88.
- Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G.S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P.J., Vreeken, R.J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., *et al.* (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* *53*, 2755–2766.
- Jenkinson, D.M., Elder, H.Y., Montgomery, I., and Moss, V.A. (1985). Comparative studies of the ultrastructure of the sebaceous gland. *Tissue Cell* *17*, 683–698.
- Jollie, W.P. (1990). Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* *41*, 361–381.
- Jones, E.A.V., le Noble, F., and Eichmann, A. (2006). What Determines Blood Vessel Structure? Genetic Prespecification vs. Hemodynamics. *Physiology* *21*, 388–395.
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., and Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* *3*, 26.

- Kandarian, S., and Jackman, R. (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33, 155–165.
- Kang, Y.P., Yoon, J.-H., Long, N.P., Koo, G.-B., Noh, H.-J., Oh, S.-J., Lee, S.B., Kim, H.M., Hong, J.Y., Lee, W.J., *et al.* (2019). Spheroid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Provokes Global Alterations of Breast Cancer Lipidome: A Multi-Layered Omics Analysis. *Front. Oncol.* 9.
- Karaa, A., Haas, R., Goldstein, A., Vockley, J., Weaver, W.D., and Cohen, B.H. (2018). Randomized dose-escalation trial of elamipretide in adults with primary mitochondrial myopathy. *Neurology* 90, e1212–e1221.
- Kaufman, M.H. (1992). *The Atlas of Mouse Development* (Edinburgh University, U.K.: Academic Press).
- Kelly, R.G. (2012). Chapter two - The Second Heart Field. In *Current Topics in Developmental Biology*, B.G. Bruneau, ed. (Academic Press), pp. 33–65.
- Kelly, R.G., Buckingham, M.E., and Moorman, A.F. (2014). Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4.
- Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* 152, 387–395.
- Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.* 63, 50–69.
- Kihara, A., Sakuraba, H., Ikeda, M., Denpoh, A., and Igarashi, Y. (2008). Membrane topology and essential amino acid residues of Phs1, a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in very long-chain fatty acid elongation. *J Biol Chem* 283, 11199–11209.
- Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre Transgenic Mice: A New Model for Endothelial Cell-Lineage Analysis in Vivo. *Dev. Biol.* 230, 230–242.
- Kozlov, M.M., and Chernomordik, L.V. (2015). Membrane tension and membrane fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33, 61–67.
- Krug, E.L., Runyan, R.B., and Markwald, R.R. (1985). Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation. *Dev. Biol.* 112, 414–426.
- Kwok, K.H.M., Rydén, M., Andersson, D.P., Beauchef, G., Guere, C., Vie, K., Bergman, O., Lundbäck, V., Arner, P., and Dahlman, I. (2019). Prospective analyses of white adipose tissue gene expression in relation to long-term body weight changes. *Int. J. Obes.* 1–11.
- Le Garrec, J.-F., Domínguez, J.N., Desgrange, A., Ivanovitch, K.D., Raphaël, E., Bangham, J.A., Torres, M., Coen, E., Mohun, T.J., and Meilhac, S.M. (2017). A predictive model of asymmetric morphogenesis from 3D reconstructions of mouse heart looping dynamics. *ELife* 6, e28951.
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S., and Park, W.J. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* 8, 23.
- Lefèvre, C., Bouadjar, B., Ferrand, V., Tadini, G., Mégarbané, A., Lathrop, M., Prud'homme, J.-F., and Fischer, J. (2006). Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3. *Hum. Mol. Genet.* 15, 767–776.

- Liang, Q., Xu, C., Chen, X., Li, X., Lu, C., Zhou, P., Yin, L., Qian, R., Chen, S., Ling, Z., *et al.* (2015). The roles of Mesp family proteins: functional diversity and redundancy in differentiation of pluripotent stem cells and mammalian mesodermal development. *Protein Cell* 6, 553–561.
- Lindner, G., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., and Ling, G. (1997). Analysis of Apoptosis during Hair Follicle Regression (Catagen). *151*, 17.
- Logan, D.C. (2006). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 57, 1225–1243.
- Loublier, S., Schiff, M., Bénit, P., and Rustin, P. (2009). Les maladies mitochondriales : une médecine à part ? *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* 24, 240–253.
- Maani, N., Sabha, N., Rezai, K., Ramani, A., Groom, L., Eltayeb, N., Mavandadnejad, F., Pang, A., Russo, G., Brudno, M., *et al.* (2018). Tamoxifen therapy in a murine model of myotubular myopathy. *Nat. Commun.* 9, 4849.
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., *et al.* (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis: *Hepatology*. *Hepatology* 56, 2199–2208.
- McCormick, E.M., Zolkipli-Cunningham, Z., and Falk, M.J. (2018). Mitochondrial disease genetics update: recent insights into the molecular diagnosis and expanding phenotype of primary mitochondrial disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 30, 714–724.
- McMahon, A., Butovich, I.A., and Kedzierski, W. (2011). Epidermal expression of an Elovl4 transgene rescues neonatal lethality of homozygous Stargardt disease-3 mice. *J. Lipid Res.* 52, 1128–1138.
- Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2009). Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* 91, 784–790.
- Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., DeLuca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., *et al.* (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5229–5236.
- Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., and Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *J. Hum. Genet.* 64, 113–125.
- Ohkuni, A., Ohno, Y., and Kihara, A. (2013). Identification of acyl-CoA synthetases involved in the mammalian sphingosine 1-phosphate metabolic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 195–201.
- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18439–18444.
- Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., *et al.* (2015). Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 7707–7712.
- Palis, J., and Yoder, M.C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol.* 29, 927–936.

- Palis, J., McGrath, K.E., and Kingsley, P.D. (1995). Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood* *86*, 156–163.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* *126*, 5073–5084.
- Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* *117*, 3–32.
- Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1417–1427.
- Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., and Mastrofrancesco, A. (2009). Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol.* *1*, 68–71.
- Pijuan-Sala, B., Griffiths, J.A., Guibentif, C., Hiscock, T.W., Jawaid, W., Calero-Nieto, F.J., Mulas, C., Ibarra-Soria, X., Tyser, R.C.V., Ho, D.L.L., *et al.* (2019). A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. *Nature* *566*, 490–495.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* *17*, 1063–1072.
- Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., *et al.* (*in press*). Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle. *Sci. Adv.*
- Radner, F.P.W., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G.-J., Ribierre, F., Kamoun, B., Abid, L., Leipoldt, M., Turki, H., Schempp, W., *et al.* (2013). Mutations in CERS3 Cause Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis in Humans. *PLoS Genet.* *9*, e1003536.
- Rantakari, P., Lagerbohm, H., Kaimainen, M., Suomela, J.-P., Strauss, L., Sainio, K., Pakarinen, P., and Poutanen, M. (2010). Hydroxysteroid (17 β) Dehydrogenase 12 Is Essential for Mouse Organogenesis and Embryonic Survival. *Endocrinology* *151*, 1893–1901.
- Rose, S., Frye, R.E., Slattery, J., Wynne, R., Tippett, M., Pavliv, O., Melnyk, S., and James, S.J. (2014). Oxidative Stress Induces Mitochondrial Dysfunction in a Subset of Autism Lymphoblastoid Cell Lines in a Well-Matched Case Control Cohort. *PLoS ONE* *9*, e85436.
- Rossant, J., and Cross, J.C. (2001). Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 538–548.
- Sassa, T., and Kihara, A. (2014). Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. *Biomol. Ther.* *22*, 83–92.
- Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., *et al.* (2013). Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elovl1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2787–2796.
- Sawai, M., Uchida, Y., Ohno, Y., Miyamoto, M., Nishioka, C., Itohara, S., Sassa, T., and Kihara, A. (2017). The 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases HACD1 and HACD2 exhibit functional redundancy and are active in a wide range of fatty acid elongation pathways. *J. Biol. Chem.* *292*, 15538–15551.

- Schneider, M.R., and Paus, R. (2010). Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 181–185.
- Schneiter, R., BRÜGGER, B., Amann, C.M., Prestwich, G.D., Epand, R.F., Zellnig, G., Wieland, F.T., and Epand, R.M. (2004). Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty-acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *Biochem. J.* *381*, 941–949.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., *et al.* (2005). Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile. *Cell* *123*, 507–519.
- Science, M. (2017). La Phosphorylation Oxydative Mitochondriale » Magazine Science.
- Segre, J.A. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders (American Society for Clinical Investigation).
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* *376*, 62–66.
- Siegel, M.P., Kruse, S.E., Percival, J.M., Goh, J., White, C.C., Hopkins, H.C., Kavanagh, T.J., Szeto, H.H., Rabinovitch, P.S., and Marcinek, D.J. (2013). Mitochondrial-targeted peptide rapidly improves mitochondrial energetics and skeletal muscle performance in aged mice. *Aging Cell* *12*, 763–771.
- van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., and Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 295–313.
- Souilhol, C., Perea-Gomez, A., Camus, A., Beck-Cormier, S., Vandormael-Pournin, S., Escande, M.C., Collignon, J., and Cohen-Tannoudji, M. (2015). NOTCH activation interferes with cell fate specification in the gastrulating mouse embryo. *Development* *142*, 3649–3660.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., *et al.* (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.* *35*, D527–D532.
- Takeichi, T., and Akiyama, M. (2016). Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. *J. Dermatol.* *43*, 242–251.
- Takeichi, T., Okuno, Y., Kawamoto, A., Inoue, T., Nagamoto, E., Murase, C., Shimizu, E., Tanaka, K., Kageshita, Y., Fukushima, S., *et al.* (2018). Reduction of stratum corneum ceramides in Neu-Laxova syndrome caused by phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *J. Lipid Res.* *59*, 2413–2420.
- Tam, P.P.L., and Behringer, R.R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* *68*, 3–25.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., and Böhlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *187*, 1579–1586.
- Thody, A.J., and Shuster, S. (1989). Control and function of sebaceous glands. *Physiol. Rev.* *69*, 383–416.

- Tiret, L., Blot, S., Kessler, J.-L., Gaillot, H., Breen, M., and Panthier, J.-J. (2003). The *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Hum. Genet.* *113*, 297–306.
- Toscano, A., Emmanuele, V., Savarese, M., Musumeci, O., Torella, A., Conca, E., Moggio, M., Nigro, V., and Rodolico, C. (2017). Pseudo-dominant inheritance of a novel homozygous *HACD1* mutation associated with congenital myopathy: The first caucasian family. *Neuromuscul. Disord.* *27*, S173.
- Traupe, H., Fischer, J., and Oji, V. (2014). Nonsyndromic types of ichthyoses – an update. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* *12*, 109–121.
- Udan, R.S., Vadakkan, T.J., and Dickinson, M.E. (2013). Dynamic responses of endothelial cells to changes in blood flow during vascular remodeling of the mouse yolk sac. *Development* *140*, 4041–4050.
- Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Kim, S.Y., Mandal, M.N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., *et al.* (2007). Loss of functional *ELOVL4* depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 471–482.
- Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., Pfanner, N., and Voos, W. (1999). The Protein Import Motor of Mitochondria: Unfolding and Trapping of Preproteins Are Distinct and Separable Functions of Matrix Hsp70. *10*.
- Vrbacký, M., Kovalčíková, J., Chawengsaksophak, K., Beck, I.M., Mráček, T., Nůšková, H., Sedmera, D., Papoušek, F., Kolář, F., Sobol, M., *et al.* (2016). Knockout of *Tmem70* alters biogenesis of ATP synthase and leads to embryonal lethality in mice. *Hum Mol Genet* *25*, 4674–4685.
- Walls, J.R., Coultas, L., Rossant, J., and Henkelman, R.M. (2008). Three-Dimensional Analysis of Vascular Development in the Mouse Embryo. *PLOS ONE* *3*, e2853.
- Wang, Z., and Wu, M. (2015). An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci. Rep.* *5*.
- Wang, B., Pelletier, J., Massaad, M.J., Herscovics, A., and Shore, G.C. (2004). The Yeast Split-Ubiquitin Membrane Protein Two-Hybrid Screen Identifies BAP31 as a Regulator of the Turnover of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Tyrosine Phosphatase-Like B. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2767–2778.
- Westerberg, R., Tvrdik, P., Undén, A.-B., Månsson, J.-E., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W.H., Elias, P.M., Asadi, A., Flodby, P., *et al.* (2004). Role for *ELOVL3* and Fatty Acid Chain Length in Development of Hair and Skin Function. *J. Biol. Chem.* *279*, 5621–5629.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the Protein Import Channel Tom40 of the Mitochondrial Outer Membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 18188–18194.
- Wigger, M., Kisielewska, K., Filimonow, K., Plusa, B., Maleszewski, M., and Suwińska, A. (2017). Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Sci. Rep.* *7*, 15136.
- Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L., and Rossant, J. (1993). *flk-1*, an *flt*-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* *118*, 489–498.

Yamamoto, H., Hattori, M., Chamulitrat, W., Ohno, Y., and Kihara, A. (2020). Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene *FATP4* through formation of the barrier lipid ω -*O*-acylceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *117*, 2914–2922.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* *407*, 242–248.

Yoshida, M., Muneyuki, E., and Hisabori, T. (2001). ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 669–677.

Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Ogura, T., Shimokata, K., Katayama, Y., and Shimada, H. (2006). Reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1757*, 395–400.

Zdravec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J.A., Capecchi, M.R., and Jacobsson, A. (2011). ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J. Lipid Res.* *52*, 245–255.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *173*, 2026–2034.

Zucker, S. (2011). Cardiac Jelly and Its Roles in Heart Development. *Sci. J. Lander Coll. Arts Sci.* *4*, 23–29.