



HAL
open science

Etude de la compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire : Une régulation métabolique plus que structurelle

Thibaut Molinié

► **To cite this version:**

Thibaut Molinié. Etude de la compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire : Une régulation métabolique plus que structurelle. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0405 . tel-03599728

HAL Id: tel-03599728

<https://theses.hal.science/tel-03599728v1>

Submitted on 7 Mar 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.

THÈSE
pour le
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ Biochimie

présentée et soutenue publiquement le
17 décembre 2021
par

Thibaut Molinié
né le 10 Janvier 1993 à Agen

**Etude de la compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne
respiratoire**
Une régulation métabolique plus que structurelle

Sous la direction de : **Arnaud Mourier**

Membres du jury

Mme. Agnès NADJAR, Professeur, INSERM, Université de Bordeaux	Président
Mme. Rénée VENTURA CLAPIER, Directeur de recherche émérite, CNRS, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Mr. Axel MAGALON, Directeur de recherche, CNRS, Aix-Marseille	Rapporteur
Mr. Bertrand BEAUVOIT, Maître de conférences, Université de Bordeaux	Invité
Mr. Michel RIGOULET, Professeur émérite, CNRS, Université de Bordeaux	Invité
Mr. Arnaud MOURIER, Chargé de recherche, CNRS, Bordeaux	Directeur de Thèse

*« Méfiez-vous des cons. Il y en a qui vont
beaucoup plus loin qu'on ne le pense ! »*

Alexandre Astier

« A cœur vaillant, rien d'impossible. »

Jacques Coeur

Etude de la compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire : Une régulation métabolique plus que structurale

Grâce à plusieurs ubiquinones oxydoréductases, de nombreuses voies métaboliques sont sous la dépendance de la chaîne respiratoire de mammifère (Béta-oxydation, synthèse des pyrimidines, navette redox, cycle de Krebs). Physiologiquement, la chaîne respiratoire dispose d'une multitude de substrats respiratoires pouvant alimenter simultanément ces oxydoréductases. Il a été émis l'hypothèse que l'organisation supramoléculaire (appelée supercomplexe) du complexe I de la chaîne respiratoire permettrait de favoriser et prioriser le flux d'électron provenant de ce complexe par rapport aux autres oxydoréductases. L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer la possible incidence fonctionnelle de cette organisation supramoléculaire. En particulier, nous avons développé de nouvelles stratégies expérimentales afin de déterminer si cette organisation supramoléculaire pouvait orchestrer l'approvisionnement en électron de la chaîne respiratoire depuis les différentes ubiquinones oxydoréductases. La première partie de ce travail a caractérisé l'incidence fonctionnelle d'une désorganisation de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire consécutive à la perte du facteur d'assemblage COX7A2L. Cette étude a démontré que la perte des supercomplexes III₂-IV de la chaîne respiratoire n'était associée à aucun défaut bioénergétique majeur affectant la respiration associée à l'oxydation du NADH ou du succinate. La seconde partie de ce travail de thèse a mis en évidence que les chaînes respiratoires des mitochondries hépatiques et cardiaques privilégient l'oxydation du succinate au détriment du NADH. Cette observation démontre que l'organisation supramoléculaire du complexe I avec les autres constituants de la chaîne respiratoire ne permet pas de favoriser l'oxydation du NADH. Notre travail a surtout permis de montrer que l'inhibition directe du complexe II par l'oxaloacetate intramitochondrial pouvait être un mécanisme extrêmement réactif permettant de réorienter les flux métaboliques intramitochondriaux et d'orchestrer l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire afin de privilégier la réoxydation du NADH.

Mots-clés : OXPHOS, Compétition à l'entrée des électrons, Supercomplexes, COX7A2L, navette malate-aspartate, cycle de Krebs, Oxaloacetate.

Study of the mechanism of electron donor competition in the respiratory chain: A metabolic regulation more than structural

The mammalian respiratory chain has several ubiquinone oxidoreductases which place numerous metabolic pathways under the control of its activity (beta-oxidation, synthesis of pyrimidines, redox shuttle, Krebs cycle). Physiologically, the respiratory chain has a multitude of respiratory substrates that can simultaneously supply these oxidoreductases. It has been hypothesized that the supramolecular organization (called supercomplex) of complex I of the respiratory chain would promote and prioritize the flow of electrons from this complex over other oxidoreductases. The objective of this thesis work was to determine the possible functional impact of this supramolecular organization. In particular, we have developed new experimental strategies to determine whether this supramolecular organization could orchestrate the supply of electrons to the respiratory chain from the various ubiquinone oxidoreductases. The first part of this work characterized the functional consequences of a disorganization of the supramolecular organization of the respiratory chain following the loss of the assembly factor COX7A2L. This study demonstrated that the loss of the III₂-IV supercomplexes of the respiratory chain was not associated with any major bioenergetic defect affecting respiration associated with the oxidation of NADH or succinate. The second part of this thesis work showed that the respiratory chains of the hepatic and cardiac mitochondria favor the oxidation of succinate against NADH. This observation demonstrates that the supramolecular organization of complex I with the other constituents of the respiratory chain does not promote the oxidation of NADH. Our work has above all made it possible to show that the direct inhibition of complex II by intramitochondrial oxaloacetate could be an extremely powerful mechanism making it possible to reorient intramitochondrial metabolic flows and to orchestrate the activity of complexes I and II of the respiratory chain in order to favor the oxidation of NADH.

Keywords: OXPHOS, Electron competition, Supercomplex, COX7A2L, Malate-aspartate shuttle, Krebs cycle, Oxaloacetate.

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le laboratoire BioDynaMit de l'Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire de Bordeaux (CNRS-UMR5095). Je remercie ce vieux bâtiment dans lequel j'aurai passé un quart de ma vie, je te remercie pour tous ces moments passés en ta compagnie.

La réalisation de cette thèse a nécessité plusieurs milliers de boîtes de cultures, quelques centaines de litres d'éthanol (qu'il soit absolu ou fermenté), une armée d'oroboros, 2 enceintes portatives et quelques centaines de souris, qui dès 8h du matin étaient prêtes à collaborer pour m'aider à mener à bien ce rêve.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, pour les discussions, commentaires et critiques constructives dont ils m'ont fait part durant nos divers échanges. Merci également d'avoir répondu présent lors de ma soutenance, que ce soit en distanciel malgré les problèmes de micro ou en présentiel malgré la situation sanitaire. J'aimerais avoir une mention toute particulière pour BERTRAND BEAUVOIT et MICHEL RIGOULET qui m'ont également eu en cours. Merci pour vos enseignements, pour avoir répondu à mes questions, et pour m'avoir donné des conseils depuis maintenant plus de 7ans.

Mes remerciements vont ensuite à mon chef ARNAUD MOURIER, qui m'a laissé une chance et permis de réaliser ce rêve un peu fou de faire une thèse. Il y avait du travail et c'était un sacré pari mais je pense qu'on l'a bien relevé, sinon « Dobby » n'aurait jamais eu sa chaussette et surtout sa tasse. Je n'aurai jamais cru apprendre autant de toi dans des domaines aussi variés allant de la mitochondrie, cette organelle obscure, à la bioénergétique cette discipline géniale pour tordus, en passant par le montage/démontage/rabotage du mobilier de labo, du masticage, de la peinture voire même de la décoloration des murs. Merci pour tout ce que tu m'as inculqué comme concepts, comme connaissances, comme visions et comme rigueur qui font que l'on m'ait déjà dit « tu ne serais pas l'étudiant d'Arnaud Mourier par hasard ? » lorsque je pose certaines questions. J'espère pouvoir être digne de ton enseignement et de pouvoir perpétuer l'héritage des Guérin, Rigoulet et maintenant Mourier.

Mes remerciements vont ensuite à CLAUDINE DAVID, ma maman du labo qui me supporte moi, mes bulles et mes chansons depuis plus de 5 ans. Toujours là pour veiller sur les étudiants et sur moi, pour répondre aux questions, pour m'aider et m'apprendre. On aura bien ri et bien pleuré pour mettre aux points certaines manips. J'espère quand même t'avoir appris

quelques trucs comme des répliques de Kaamelott ou t'avoir permis d'apprécier certains chefs d'œuvre de la chanson française (Dany Brilliant, Charles Aznavour, Patrick Sébastien, Telephones « palais des congrès de toulouse ;) » et surtout Michel Delpech avec « le chasseur »). Je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté durant ma thèse, tu es une personne extraordinaire.

Je souhaiterais également remercier les autres membres du laboratoire qui y sont toujours ou qui sont partis à commencer par ELODIE COUGOUILLES, qui m'a suivi à travers les étages. T'as commencé par m'apprendre les western blot en master 1 pour que je finisse par t'apprendre les gels natifs et la respi en thèse. Travailler avec une amie a rendu ma thèse bien plus agréable, surtout quand on savait que la journée allait être interminable. Je souhaiterais remercier MANUEL ROJO pour ces conseils, nos interactions et pour m'avoir prêté son grattoir à cellule durant ces 5 années. Je souhaiterais également remercier THOMAS DAUBON en tant que collaborateur d'abord puis en tant que membre du labo. Tu m'as beaucoup aidé durant ma deuxième partie de thèse par tes conseils, ton soutien pendant les périodes difficiles et puis tu m'as permis de me rappeler mes racines agenaises et mon Lot-et-Garonne natal. J'espère qu'il y aura quelqu'un pour t'embêter et te dire des horreurs quand je serai parti. Je souhaiterais également remercier tous les étudiants et collègues qui sont passés dans le laboratoires : Célya, Narda, Claire, Sylvain, Bibi, Flo', Guillaume. Vous m'avez supporté en tant que collègue, vous m'avez appris à enseigner mes connaissances et permis de garder en tête d'où je venais.

J'aimerais également remercier tous mes mentors : ANTHONY BOUTER, MICHEL MOENNER, ARNAUD GISSOT qui m'ont donné la chance de venir dans leur laboratoire et qui ont pris le temps pour m'enseigner ce qu'est la science et le travail en laboratoire, et qui m'ont permis de nourrir ma passion durant les étés entre les cours dans des domaines allant de la synthèse chimique à l'étude de mécanisme de réparation membranaire.

I would also like to thank the « fellowship of the third floor »: Jan, Jasmina, Emilia, Dunja, Thibaut, Stephanie and of course the bossman Dr. Milos. My dear friends thanks to you I learned how to speak in English, and some other words in Greek and Serbian. "Mercifully" you were here for the late night experiment for a smile, a joke, for sweets, for a beer or to tell me "what's happening here with your music?!". I won't be able to do the same thesis without you my friends, you changed my life and I thank you warmly for that.

J'aimerais également remercier mes amis d'enfance, de lycée, d'université avec qui j'ai pu parcourir tout ce chemin pour arriver à la thèse. J'aimerais notamment, remercier ma bande de potes Agenaise. TIMOTHY CRETIN et MARINA ADELIS qui m'ont permis d'avoir un grand bol d'air frais malgré mes allergies quand j'allais les voir. Les acolytes de Bordeaux

GUILLAUME VIGIER, AURELIEN COMBEAU, HUGO JAY qui sont des amis de longue date, et avec qui on a traversé de sacrés moments, notamment des heures innombrables en cours depuis la maternelle ou le collège, puis à la BU, devant mon tableau à craie, à jouer à 2K ou à manger des pizzas Dominos, des lasagnes et autres pâtes au fromage.

Merci à mes compagnons de master PAULINE PONY, NADIA EL MAMMERI, MATTHIEU PIEDNOEL et JULIEN MAZALEYRAT tant de projets, de révisions et de soirées Pizza-Ligues des champions ou avec Bernard de La Villardière pour décompresser du master ou de la thèse. Ces 6 dernières années n'auraient pas été les mêmes sans vous, un énorme merci pour votre soutien et votre aide.

Merci à JOFFREY VALETTE mon bindi, je t'ai tout appris et pourtant c'est moi qui te suis redevable pour tout ce que tu as fait. Tu m'as souvent sauvé les fesses au lycée, dire qu'à l'époque, c'est toi qui disséquais les souris, alors que maintenant, c'est une routine pour moi. Nos discussions interminables sur la NBA, ces nuits où Shane Battier a su enflammer nos cœurs ou où LeBron a brisé le mien... (Putain de 3-1...) et nos discussions font que malgré la distance et le temps, on reste toujours aussi proche, merci ma biche.

Merci à BENJAMIN LAFORET on s'est rencontré en L1, j'étais le gars de la campagne un peu pommé et toi le mec qui passait sa vie sur deal extrême et à citer Kaamelott avec ces 14 batteries externes. Tu m'as permis de développer mon ouverture d'esprit, ma curiosité au-delà de ce que je pensais, et l'emmerdeur que tu es fait qu'on s'entend si bien. Ces petits moments que ce soit dans mon appart à manger macdo sur des plateaux volés, à essayer de réparer des lanternes chinoises trouvées dans la rue ou nos moments plus bucoliques à Carayac, sur les coteaux de Saint Emilion ou au château branlant font partie de mes meilleurs souvenirs de ces 9 dernières années. Merci mon Béni Crochu ! (Maintenant Béni Crochu c'est posé sur papier !)

J'ai également une pensée pour tous mes camarades de BU, d'amphi, de labo qui m'ont accompagné durant mon parcours. Je ne sais pas si j'aurai pu accomplir tout ce que j'ai accompli sans vous, merci.

J'aimerais remercier mes parents et mon frère qui se sont privés pour que je puisse réaliser mon rêve et qui m'ont surtout inculqué les valeurs de travail, d'humilité, de persévérance et qui ont cru en moi même « si je n'étais pas fait pour la science ». J'aimerais remercier ma famille dans son ensemble qui m'a soutenue au cours de ma vie, qui ont fait mon bonheur et qui m'ont permis d'être ce que je suis, en particulier mes grands-parents, mes oncles et surtout mon parrain qui ont été des modèles pour moi depuis mon enfance.

Vous avez tous su donner une ligne directrice à ma vie et vous m'avez donné les clés pour que je la réussisse. Je vous en remercie et j'espère toujours pouvoir mériter la chance que j'ai eu.

Je souhaiterais également remercier ma nouvelle famille des BOUCHEZ-GIRET-ORTET. Merci pour m'avoir accepté parmi les vôtres depuis maintenant deux ans. Les moments passés en votre compagnie ont été salvateur et m'ont permis de me libérer l'esprit que ce soit en montant une terrasse en pavé ou en bois, en creusant des tranchés ou bien simplement en passant un moment en famille avec vous.

Et je souhaiterais finir mes remerciements par CYRIELLE BOUCHEZ, sans qui ma thèse n'aurait définitivement pas été la même. Si j'avais su qu'en échangeant nos places aux concours tu allais autant changer ma vie et mon avenir je ne l'aurais pas cru. Merci pour nos moments et échanges en tant que collègues-amis, puis le soutien et le bonheur que tu m'apportes jour après jour en tant que « collègue-collègue ». Cette thèse est autant la tienne que la mienne, je ne te remercierais jamais assez mon amour pour tout ce que tu fais, ce que tu m'as apporté et ce que tu m'apportes. J'ai hâte de passer aux prochaines étapes de nos vies, de grandes aventures nous attendent. Je t'aime.

Cette thèse est dédiée à ma famille, mes amis, mes collègues et surtout à tous ceux qui sont assez fous pour rêver et pour croire que rien n'est impossible.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
1 INTRODUCTION GENERALE.....	3
1.1 LA MITOCHONDRIE ET LE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES.	12
1.1.1 <i>La théorie chimio-osmotique de MITCHELL.</i>	13
1.1.2 <i>Le système des oxydations phosphorylantes mammifère.</i>	16
1.1.2.1 La Chaîne respiratoire.....	16
1.1.2.2 Le Système phosphorylant.....	31
1.2 ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE.	33
1.2.1 <i>Le modèle « liquid state »</i>	34
1.2.2 <i>Le modèle « solid state »</i>	36
1.2.3 <i>L'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire : les supercomplexes.</i> ..	38
1.2.3.1 Structuration et orientation des complexes.	39
1.2.3.2 Facteurs d'assemblages/intéactions entre les complexes de la chaîne respiratoire dans les supercomplexes.	43
1.2.3.3 Quel est le rôle des supercomplexes ?	46
1.3 LES HYPOTHESES DE TRAVAIL :	54
2 MATERIELS ET METHODES.....	59
2.1 MATERIELS ET METHODES PARTIE 3: COX7A2L PROMEUT LA REORGANISATION DE SUPERCOMPLEXES SANS AFFECTER LA BIOENERGETIQUE MITOCHONDRIALE.....	59
2.1.1 <i>Culture cellulaire</i>	59
2.1.2 <i>Comptage cellulaire</i>	59
2.1.3 <i>Principe de la mesure du flux de consommation d'oxygène par oxygraphie : l'oroboros.</i> 61	
2.1.4 <i>Mesure du flux de consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées.</i>	63
2.2 MATERIELS ET METHODES PARTIE 4 ET PARTIE 5 : DETERMINATION DU MECANISME REGULANT LA PROVENANCE DU FLUX D'ÉLECTRONS AU SEIN DE LA CHAINE RESPIRATOIRE A TRAVERS L'ÉTUDE DU METABOLISME ET DE LA TISSU-SPECIFICITE.....	66
2.2.1 <i>Isolement de mitochondries.</i>	66
2.2.1.1 Isolement de mitochondries cardiaques.....	66
2.2.1.2 Isolement de mitochondries hépatiques.	67
2.2.2 <i>Mesure du flux de consommation d'oxygène de mitochondries isolées de différents tissus.</i> 68	
2.2.2.1 Mesure du flux respiratoire sur mitochondries isolées intactes.....	68
2.2.2.2 Mesure des activités I-III-IV, II-III-IV et I-II-III-IV.	69
2.2.3 <i>Quantification et étude de la stœchiométrie des complexes de la chaîne respiratoire.</i> 70	
2.2.3.1 Western Blot (SDS-PAGE).	70

2.2.3.2	Quantification des cytochromes.....	72
2.2.4	<i>Etude de l'organisation supramoléculaire du système des oxydations phosphorylantes par électrophorèse non dénaturante (BN-PAGE).</i>	73
2.2.4.1	Détection des supercomplexes de la chaîne respiratoire par activité enzymatique dans le gel.	75
2.2.4.2	Détection des supercomplexes de la chaîne respiratoire par Immunoblot.....	77
2.2.5	<i>Dosage des métabolites liés au OXPPOS et au cycle de Krebs.</i>	79
2.2.5.1	Quantification de métabolites par dosages enzymatiques.....	79
2.2.5.2	Mesure des J_{ATP}/JO_2	83
2.2.5.3	Etat stationnaire de NADH.....	84
2.2.5.4	Dosage de métabolites liés au métabolisme du cycle de Krebs.....	84
3	ARTICLE 1.	91
3.1	ETAT DE L'ART :	91
3.1.1	<i>COX7A2L, la première protéine découverte comme étant impliquée dans le remodelage des supercomplexes de mammifère.</i>	91
3.1.2	<i>Le « plasticity model ».</i>	93
3.2	RESUMES DES RESULTATS DE L'ARTICLE.....	95
3.2.1	<i>Mise en place du premier mutant COX7A2L.</i>	96
3.2.2	<i>COX7A2L est nécessaire pour le maintien de certains supercomplexes.</i>	96
3.2.3	<i>L'isoforme courte de COX7A2L ne permet pas le maintien du supercomplexe III₂-IV chez l'humain.</i> 97	97
3.2.4	<i>La perte de COX7A2L n'affecte pas le fonctionnement de la chaîne respiratoire....</i> 98	98
3.2.4.1	Stratégie expérimentale.	98
3.2.4.2	Caractérisation bioénergétique des lignées cellulaires HEK et U87 KO COX7A2L.....	99
3.3	DISCUSSION.	101
4	ARTICLE 2.	133
4.1	ETAT DE L'ART.	133
4.2	RESUME DES RESULTATS DE L'ARTICLE.	135
4.2.1	<i>L'oxydation du NADH et du succinate diffère fortement entre les mitochondries cardiaques et hépatiques.</i>	135
4.2.1.1	Caractérisation des capacités respiratoires des mitochondries intactes de cœur et de foie.	137
4.2.1.2	Caractérisation des capacités respiratoires des mitochondries perméabilisées de cœur et de foie.	138
4.2.2	<i>Les mitochondries de coeur et de foie réoxydent préférentiellement le succinate.</i> 139	139
4.2.3	<i>Le complexe I est associé en supercomplexes a contrario du complexe II.</i>	140

4.2.4	<i>Les mitochondries de cœur et de foies métaboliquement intactes réoxydent préférentiellement le NADH.</i>	142
4.2.5	<i>L'oxaloacetate orchestre le changement de priorité entre les complexes I et II, avec la Malate déshydrogénase 2 comme point de contrôle.</i>	143
4.2.6	<i>MDH2 est l'aiguilleur métabolique permettant la redirection des flux d'approvisionnement de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs.</i>	144
4.2.6.1	<i>MDH2 est le lien entre la navette malate-aspartate et l'activité complexe II.</i>	144
4.2.6.2	<i>Lien entre la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et la navette malate-aspartate : une redirection du flux respiratoire du complexe II vers le complexe I.</i>	145
4.3	DISCUSSION.	147
4.3.1	<i>Etude de la répartition du flux respiratoire entre le complexe I et du complexe II dans un système de mitochondries perméabilisées.</i>	148
4.3.2	<i>Etude de la répartition du flux respiratoire entre le complexe I et complexe II dans un système de mitochondries intactes.</i>	150
5	PARTIE 3 : ETUDE DES CAPACITES RESPIRATOIRES DES COMPLEXES I ET II ET DU METABOLISME MITOCHONDRIAL DANS DES CONDITIONS DE RESPIRATION PHOSPHORYLANTE.	173
5.1	ETAT DE L'ART :	173
5.2	RESULTATS ET DISCUSSIONS :	174
5.2.1	<i>La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II ne peut être appréhendée par une stratégie d'inhibition dans des conditions de respiration phosphorylante.</i>	175
5.2.2	<i>La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II ne peut être appréhendée en mesurant le rendement de l'OXPPOS par le J_{ATP}/J_{O_2}.</i>	178
5.2.3	<i>La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes par la mesure des flux de production de métabolites.</i>	181
5.2.4	<i>Quantification des métabolites intra-mitochondriaux.</i>	184
6	CONCLUSIONS GENERALES.	193
7	ABBREVIATIONS.	199
8	BIBLIOGRAPHIE.	201
9	LISTE DES PUBLICATIONS.	221

TABLE DES FIGURES

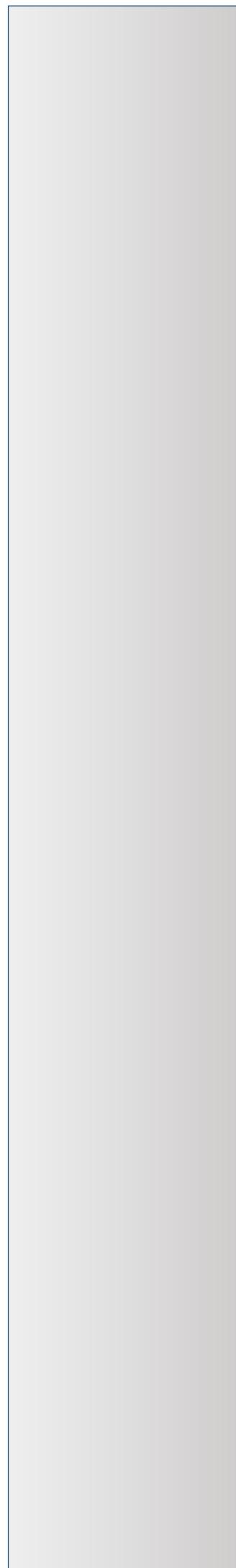
Figure 1. Illustration des principaux systèmes de transformation d'énergie dans les cellules. ...	4
Figure 2. Représentation du fonctionnement de la navette Malate-aspartate.	8
Figure 3. Représentation des principaux systèmes permettant de maintenir le potentiel phosphate.	9
Figure 4. Représentation des principaux systèmes permettant de maintenir le potentiel d'oxydoréduction du [NADH]/[NAD ⁺].	11
Figure 5. Illustration de l'architecture de la mitochondrie (Modifiée de Brandt <i>et al.</i> , 2017).	12
Figure 6. Illustration du système des oxydations phosphorylantes de mammifère (OXPHOS).	14
Figure 7. Représentation de la structure du complexe I de cœur de <i>Mus musculus</i> et du trajet des électrons dans la partie matricielle (Modifiée de Agip <i>et al.</i> , 2019).	17
Figure 8. Illustration du complexe I et de ses différentes parties catalytiques (Modifiée de Agip <i>et al.</i> , 2019).	18
Figure 9. Représentation de la structure du complexe II de cœur de <i>Sus scrofa</i> et du trajet des électrons au sein du complexe (Modifiée de Sun <i>et al.</i> , 2005).	21
Figure 10. Représentation de la chaîne respiratoire approvisionnée avec des ubiquinone oxydotéductases alternatives et les voies métaboliques qui leur sont associées.	23
Figure 11. Représentation de la structure du complexe III de cœur de <i>Bos Taurus</i> (Modifiée de IWATA <i>et al.</i> , 1998).	24
Figure 12. Schéma du transfert électronique et de translocation de protons au sein du dimère de complexe III, le principe de boucle de Mitchell.	25
Figure 13. Représentation de la structure du complexe IV de cœur de <i>Bos taurus</i> (Modifiée de Zong <i>et al.</i> , 2018).	27
Figure 14. Illustration du complexe IV, de ses différentes parties catalytiques, et du mécanisme de transfert d'électrons et de translocation de proton au sein de ce complexe (Modifiée de Lehninger <i>et al.</i>).	28
Figure 15. Illustration du mécanisme de réduction de l'ubiquinone en ubiquinol.	30
Figure 16. Représentation de la structure du cytochrome <i>c</i> de <i>S. cerevisiae</i> et de son interaction avec la membrane interne mitochondriale (Modifiée de Elmer-Dixon <i>et al.</i> , 2018).	31
Figure 17. Illustration de l'ATPsynthase, de ses différentes parties catalytiques, et du mécanisme de transfert d'électrons et de translocation de proton (Modifiée de He <i>et al.</i> , 2020).	32

Figure 18. Représentation de la structure de l'ATP synthase de cerveau de <i>Bos taurus</i> (Modifiée de Wang <i>et al.</i> , 2020).....	33
Figure 19. Illustration représentant les deux modèles principaux d'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire.....	34
Figure 20. Représentation de l'organisation supramoléculaire des complexes I et II de la chaîne respiratoire de mammifère d'après le modèle « solid state ».....	36
Figure 21. Illustration des différents types d'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire de mammifère séparés à l'aide d'un BN-Page (Modifiée à partir de Letts and Sazanov, 2017).	38
Figure 22. Représentation de la structure du respirasome de coeur de <i>sus scrofa</i> (Modifiée de Milenkovic <i>et al.</i> , 2017).....	40
Figure 23. Illustration du chemin électronique au sein du respirasome (Modifiée de Hirst, 2018).	41
Figure 24. Illustration représentant les différentes positions des complexes les uns par rapport aux autres dans les supercomplexes (Modifiée de Davies <i>et al.</i> , 2018 et Milenkovic <i>et al.</i> , 2017). ...	43
Figure 25. Illustration représentant l'étude de la canalisation de l'ubiquinone par compétition avec l'AOX (Modifiée de Fedor <i>et al.</i> , 2018.).	48
Figure 26. Illustration de la biogénèse du respirasome par les holo-complexes de la chaîne respiratoire (Modifiée de Lobo-Jarnes <i>et al.</i> , 2019).	49
Figure 27. Illustration de la biogénèse du respirasome par les complexes partiellement associés de la chaîne respiratoire (Modifiée de Lobo-Jarnes <i>et al.</i> , 2019).	50
Figure 28. Illustration du système des oxydations phosphorylantes de <i>S. cerevisiae</i> (issue de la thèse de Cyrielle Bouchez).	52
Figure 29. Effet de l'ajout de NADH sur la consommation de G3P au cours du temps chez <i>S. cerevisiae</i> (Modifiée de Pahlman <i>et al.</i> , 2002).	53
Figure 30. Comptage cellulaire et détermination des différentes populations de cellules vivante et morte à l'aide du PI.....	61
Figure 31. Illustration d'un oxygraphe O2K-Oroboros.....	62
Figure 32. Illustration d'une electrode de clark (Issue de la thèse d'Arnaud Mourier).....	62
Figure 33. Illustration d'une mesure de respiration de cellules perméabilisées avec un oxygraphe Oroboros.....	64
Figure 34. Illustration de la discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II.....	65

Figure 35. Illustration d'une migration d'un gel deuxième dimension : Native-PAGE/SDS-PAGE (Issue de <i>Fiala et al.</i> , 2011).....	79
Figure 36. Illustration du principe de quantification de NAD ⁺ par la G6PDH de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	81
Figure 37. Illustration du principe de quantification de l'oxaloacetate par la citrate synthase de cœur de <i>Sus scrofa</i>	83
Figure 38. Illustration du protocole de séparation du milieu extra-mitochondrial et intra-mitochondrial grâce à la filtration sur huile.....	88
Figure 39. Illustration du modèle d'assemblage du complexe III et de l'incorporation de COX7A2L dans ce dernier (Issue de la Figure 3G de l'Article 1, Lobo-Jarne et <i>al.</i> , 2018).....	92
Figure 40. Illustration décrivant le « plasticity model » (Issue de Lapuente-Brun et <i>al.</i> , 2013).	94
Figure 41. Illustration représentant l'interconnexion entre la chaîne respiratoire le cycle de Krebs et la navette malate aspartate.....	153
Figure 42. Capacités respiratoires en conditions phosphorylantes des complexes I et II en présence de substrats simples ou multiples.....	176
Figure 43. Flux respiratoires et métaboliques dépendant de l'ajout du glutamate en présence de succinate.....	178
Figure 44. Rendement de l'OXPPOS suivant les conditions de subtrats.....	180
Figure 45. Mesures du flux de production de malate, d'aspartate et d'α-cétoglutarate suivant les conditions de subtrats.....	184
Figure 46. Architecture des mitochondries cardiaques et hépatiques (Modifiée de Brandt <i>et al.</i> , 2017).	185
Figure 47. Contrôle de la qualité des mitochondries filtrées avec l'huile de silicone.	187
Figure 48. Quantification de l'oxaloacetate intra-mitochondrial.	188

Introduction

Générale



1 Introduction Générale.

La cellule est l'unité élémentaire de la vie, elle possède, à elle seule, les capacités associées au vivant que sont la croissance, le métabolisme, la réplication et la réponse aux stimuli. Il existe une grande diversité de cellules divisée en deux classes : les cellules procaryotes comptant le règne bactérien et archéen, et les eucaryotes allant de l'eucaryote unicellulaire comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), aux eucaryotes pluricellulaires comme les mammifères qui peuvent posséder plus de 200 types de cellules.

Le métabolisme est l'une des caractéristiques communes à tous les règnes du vivant, provenant du grec ancien μεταβολή (metabolê) qui signifie changement. Il définit l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergies qui se déroulent dans la cellule. Le métabolisme se sépare en deux processus. Les voies anaboliques en charge de la synthèse de macromolécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, lipides) à partir de molécules simples (acides aminés, oses, bases azotées, acides gras), dont la synthèse nécessite de l'énergie sous forme d'ATP ou de NAD(P)H (*Figure 1*). Les voies anaboliques sont notamment en charge de la production de biomasse, telle que la synthèse de protéines, lipides ou acides nucléiques nécessaire à la croissance, mais également sont en lien avec les processus de stockages qui peuvent être mis en place dans la cellule (glycogénogenèse, synthèse de triglycérides). Les voies cataboliques, quant à elles, sont en charge de la dégradation de molécules complexes (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, lipides) en composés oxydés simples, tels que le dioxyde de carbone, l'eau ou l'ammonium qui sont les déchets finaux du catabolisme aérobie, ou partiellement oxydés comme le pyruvate, l'acétyl-CoA. La dégradation de ces molécules libère l'énergie permettant la régénération des cofacteurs tels que l'ATP et le NAD(P)H, nécessaire pour le fonctionnement des voies anaboliques. La cellule doit réguler et maintenir un équilibre entre les voies cataboliques et anaboliques qui sont antagonistes mais interdépendantes (*Figure 1*).

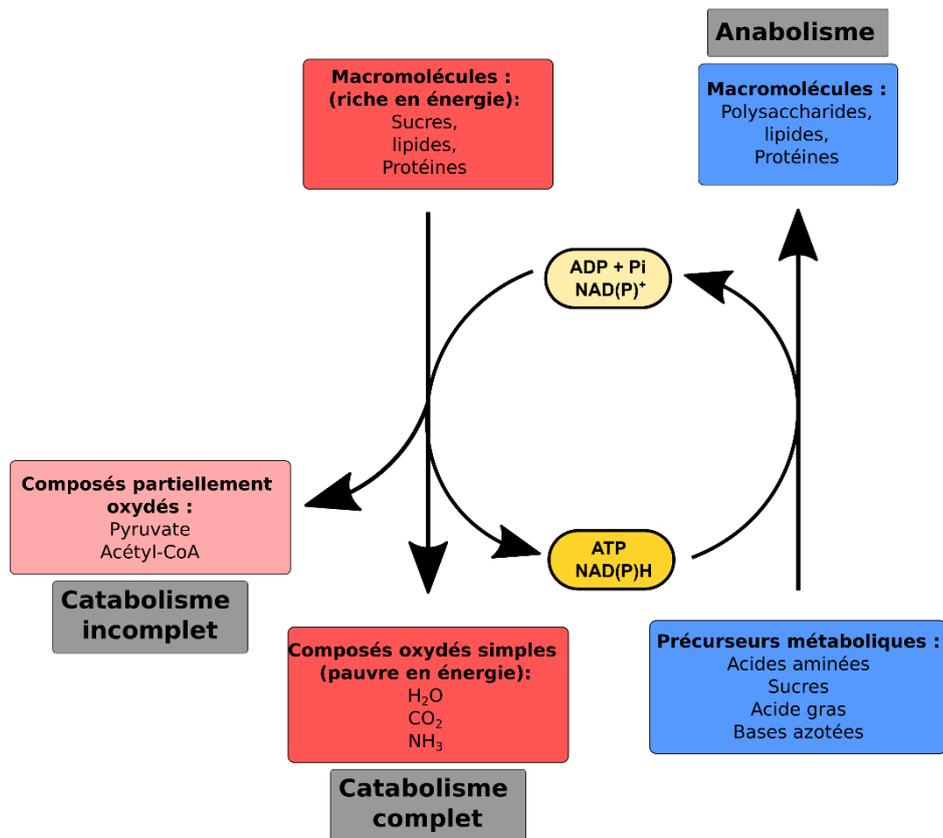


Figure 1. Illustration des principaux systèmes de transformation d'énergie dans les cellules.

Les organismes possèdent différents mécanismes de régulations du métabolisme permettant de maintenir l'équilibre entre les voies anaboliques et les voies cataboliques. Lorsque deux voies cataboliques et anaboliques antagonistes sont présentes à l'intérieur d'un même compartiment, comme la glycolyse et la néoglucogénèse par exemple, la directionnalité des flux peut être contrôlée par une régulation stricte et directe de certaines enzymes clés. C'est une réponse à un besoin immédiat qui peut être liée à une activation, une inhibition, une modification post-traductionnelle, ou un déplacement de l'équilibre métabolique par le potentiel redox ou phosphate par exemple. Dans le cas de la glycolyse et de la néoglucogénèse, cette régulation peut être faite par le fructose-2,6-bisphosphate qui est un activateur allostérique de la phosphofructokinase-1 (glycolyse) et un inhibiteur allostérique de l'activité de la fructose-1,6-bisphosphatase (néoglucogénèse).

Une autre stratégie de régulation des voies métaboliques au sein d'un même organelle est la régionalisation des enzymes. La description classique des voies métabolites

présente les enzymes comme étant physiquement indépendantes les unes des autres. Cependant, les enzymes peuvent être régionalisées au niveau de certaines zones des membranes (rafts lipidiques), alors que d'autres peuvent être solubles et présentes dans le cytoplasme par exemple. Il existe un degré supérieur d'organisation par régionalisation qu'est la formation de métabolon, qui permet de réguler et contrôler certaines voies métaboliques (Castellana et al., 2014; FERSHT, 1999; Fuller and Kim, 2021; Sweetlove and Fernie, 2018; Zhang et al., 2021). Cette structure permet de rassembler des enzymes consécutives d'une voie métabolique, dont le produit d'une enzyme est le substrat de l'enzyme qui la succède. Le métabolon permet de former un compartiment à l'intérieur d'un autre compartiment indépendamment de la présence d'une membrane lipidique. Cette structure permet de concentrer, voire même de piéger parfois, les métabolites labiles ou toxiques. Par cette structure, les métabolites peuvent être protégés du métabolisme ou protégés le métabolisme de leurs effets. Ils peuvent être canalisés pour donner un avantage cinétique aux enzymes associées en métabolon, voire donner une directionnalité à certaines voies métaboliques possédant des bifurcations métaboliques (Bulutoglu et al., 2016; Castellana et al., 2014; FERSHT, 1999; Fuller and Kim, 2021; Robinson et al., 1987; Schägger and Pfeiffer, 2000; Sweetlove and Fernie, 2018; Zhang et al., 2021).

Il existe plusieurs modèles de métabolon. L'un d'entre eux est un métabolon fonctionnant comme un système dit de « phase liquide-liquide » (Hyman et al., 2014; Sweetlove and Fernie, 2018; Zhang et al., 2021). Ce système se définit par une augmentation locale de la concentration en enzymes et en métabolites d'une voie métabolique. Ce système permettrait d'optimiser la catalyse des substrats par une « canalisation de proximité » et permet d'avoir une stœchiométrie variable entre les enzymes d'une voie métabolique (Castellana et al., 2014). La formation de ces complexes réside, notamment, sur les interactions labiles qui peuvent se former entre les protéines (Banani et al., 2016; Hyman et al., 2014; Sweetlove and Fernie, 2018; Zhang et al., 2021). Ces interactions confèrent une certaine flexibilité au métabolon, tout en permettant un contrôle spatiotemporel de l'activité de la voie formant cette structure (Zhang et al., 2021). Néanmoins, ce système ne permet pas d'avoir une séparation stricte des métabolites entre le compartiment cellulaire et le métabolon. Un autre modèle de métabolon décrit une interaction physique et stable des enzymes d'une voie, comme certains supercomplexes de la chaîne respiratoire (CR) ou certaines enzymes du cycle de l'urée (Bulutoglu et al., 2016; Milenkovic et al., 2017; Omini et al., 2021; Robinson et al., 1987; Schägger and Pfeiffer, 2000). Ces métabolons peuvent fonctionner selon un modèle de canalisation de proximité

mais également selon un modèle de canalisation directe (Castellana et al., 2014). En effet, l'association physique des enzymes peut permettre la formation d'un « tunnel » réactionnel permettant la séquestration des métabolites aux seins de ces structures, ceci impliquant une augmentation locale des métabolites et une séparation stricte des métabolites présents dans ces structures par rapport aux métabolites extrinsèques (Bulutoglu et al., 2016; Kastritis and Gavin, 2018; Omini et al., 2021; Robinson et al., 1987; Zhang et al., 2021). Si le phénomène de canalisation directe est admis pour certains métabolons, comme celui impliqué dans le cycle de l'urée (Kastritis and Gavin, 2018; Omini et al., 2021; Ovádi and Sreret, 1999; Sweetlove and Fernie, 2018), la canalisation d'intermédiaires réactionnels ou de cofacteurs reste débattue pour d'autres métabolons, comme pour celui de la chaîne respiratoire. Ces mécanismes sont aussi bien présents chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

Les cellules eucaryotes possèdent une richesse et une complexité supérieure à celle des procaryotes dans le contrôle et la régulation des voies métaboliques. En effet, la présence de membranes phospholipidiques dans le cytoplasme des cellules permet de séparer physiquement deux voies métaboliques antagonistes. La compartimentation subcellulaire est très importante et permet d'avoir des organites aux propriétés singulières, possédant des membranes avec des propriétés physico-chimiques différentes et des mécanismes d'adressages protéiques spécifiques aux compartiments. La spécialisation protéique et métabolique des organites est souvent couplée à la spécialisation des membranes phospholipidiques les constituants. L'un des exemples les plus caractéristiques est la composition protéo-phospholipidique de la membrane interne mitochondriale. Elle lui confère une très faible conductance vis-à-vis des protons. Cette caractéristique physico-chimique de la membrane interne est un élément clé du fonctionnement du système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS), permettant la transduction de l'énergie d'oxydoréduction en énergie chimique sous forme d'ATP. Cette compartimentation physique permet de localiser des voies métaboliques dans certains compartiments, plaçant ces voies sous la dépendance des échanges entre compartiments et des équilibres métaboliques de ces derniers. Par exemple, chez les mammifères, la β -oxydation des acides gras courts a lieu dans la mitochondrie, celle des acides gras longs dans le peroxyosome et la synthèse des acides gras dans le cytoplasme. Cette localisation organello-spécifique permet, dans le cas présent, de séparer : (i) les voies agonistes d'oxydation des acides gras, qui se différencient par la longueur des chaînes carbonées à oxyder, et (ii) les voies antagonistes comme la dégradation et le stockage des lipides.

Outre la présence de certaines voies métaboliques spécifiquement présentes dans certains compartiments, des isoenzymes peuvent être localisées dans deux compartiments différents. Les isoenzymes se différencient par leurs propriétés enzymatiques, ajustant la directionnalité et leur fonctionnement aux différents microenvironnements subcellulaires. Le potentiel d'oxydoréduction de certains cofacteurs ($[NAD(P)H]/[NAD(P)^+]$), et/ou l'état énergétique ($[ATP]/([ADP][Pi])$) influencent de fait la directionnalité des flux métaboliques. En effet, il a été découvert que des isoenzymes étaient localisées à la fois dans le cytoplasme et dans la mitochondrie comme la malate déshydrogénase (MDH) ou la glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) qui sont des enzymes de la navette malate/aspartate (MAS) (Birsoy et al., 2015; Borst, 1962; Dasika et al., 2015; LaNoue et al., 1973; LaNoue and Schoolwerth, 1979; Panteghini, 1990). La directionnalité des voies métaboliques dépendra des propriétés cinétiques des isoenzymes, des équilibres métaboliques, notamment du potentiel redox et phosphate, et voire même du pH des compartiments (Dasika et al., 2015; Nicholls and Ferguson, n.d.; Paynter et al., 1984). Physiologiquement, il est décrit que la malate déshydrogénase cytosolique (MDH1) catalyse principalement la réduction de l'oxaloacetate en malate et la production de NAD^+ , alors que la malate déshydrogénase mitochondriale (MDH2) catalyse majoritairement l'oxydation du malate en oxaloacetate et la production de NADH dans la mitochondrie (*Figure 2*) (Borst, 2020). La partie cytosolique de la navette malate/aspartate ayant un rôle anabolique, et la partie mitochondriale un rôle catabolique.

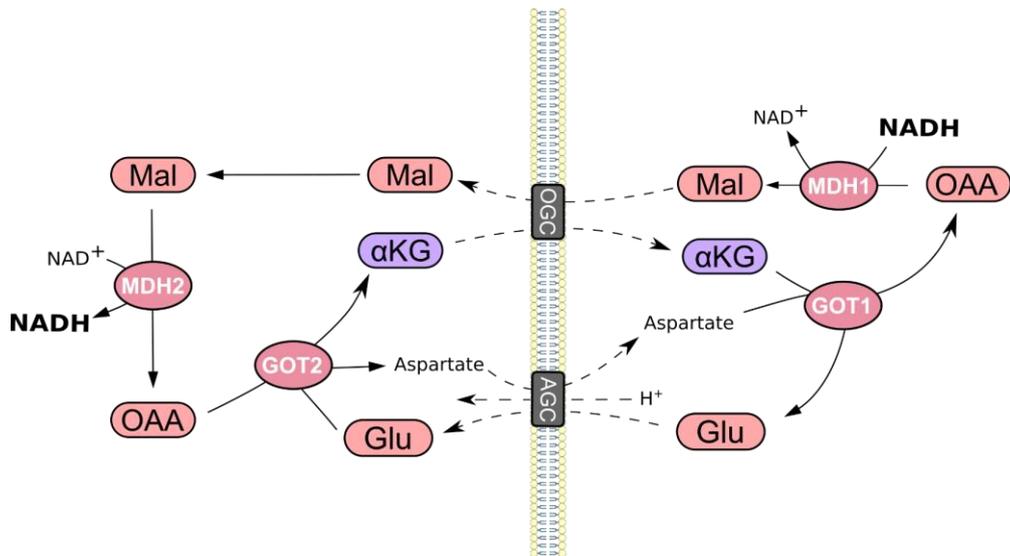


Figure 2. Représentation du fonctionnement de la navette Malate-aspartate.

Abréviations: malate (Mal), oxaloacetate (OAA), glutamate (Glu), aspartate (Asp), α -cétoglutarate (α -KG), aspartate-glutamate carrier (AGC) 2-oxoglutarate carrier (OGC), malate déshydrogénase (MDH1, MDH2), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1, GOT2).

La différenciation fonctionnelle et métabolique tissulaire, spécifique des eucaryotes pluricellulaires, permet, au même titre que la compartimentation en organites des cellules, de localiser des processus biologiques essentiels aux vivants dans certains organes. En effet, suivant le rôle de l'organe la présence de certaines voies métaboliques est requise. Par exemple, les enzymes de la néoglucogénèse sont présentes dans le foie, organe dont une des fonctions est de stocker le glucose, et sont absentes dans le cœur, qui est un organe qui consomme le glucose pour produire l'énergie nécessaire à sa contraction, mais ne le stocke pas. Un autre exemple de cette spécificité tissulaire est la β -oxydation qui est une voie très active dans le cœur, et faiblement active dans le cerveau (Bartlett and Eaton, 2004), indiquant que les lipides ne sont pas une source primordiale d'énergie pour le cerveau. Cette tissu-spécificité des voies métaboliques donne beaucoup d'informations sur le fonctionnement, la régulation et les besoins voire même sur le rôle que possèdent les tissus, permettant d'avoir une réelle carte d'identité métabolique de ces derniers.

Toutes ces compartimentations nécessitent un haut degré de régulation et de communication entre les différents compartiments (tissulaire, cellulaire, protéique) pour maintenir la balance entre catabolisme et anabolisme. Un autre aspect crucial dans la régulation de ces voies est la composante énergétique par le maintien du potentiel phosphate ($[ATP]/([ADP][Pi])$) et du potentiel d'oxydoréduction du couple $[NAD(P)H]/[NAD(P)^+]$.

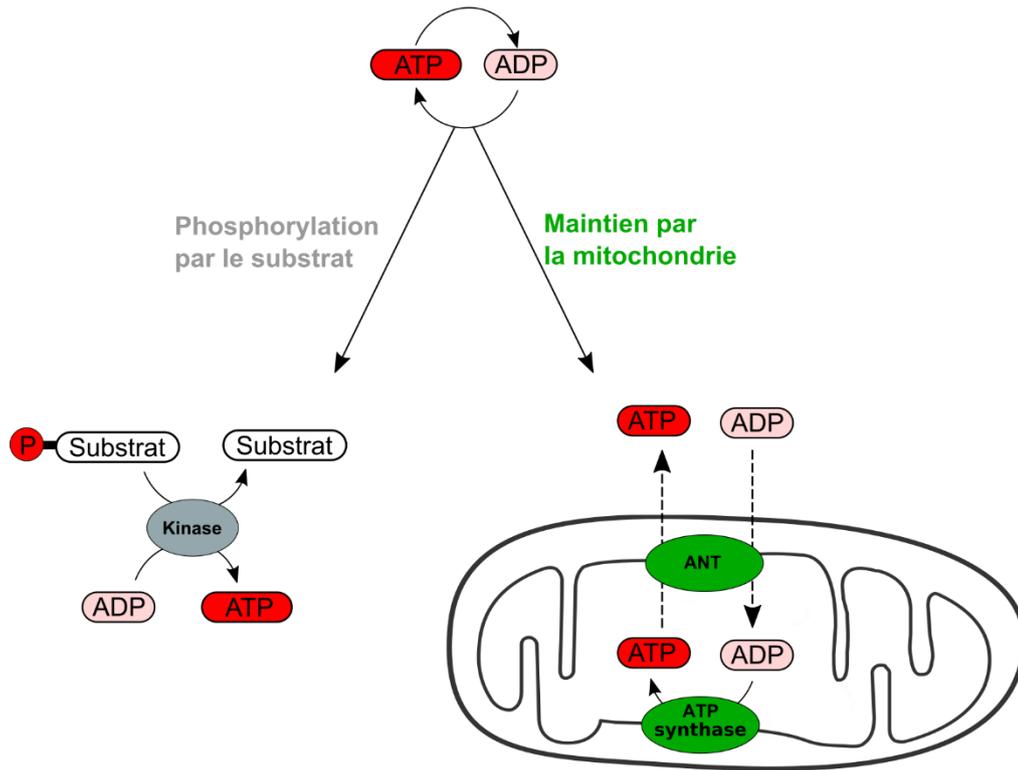


Figure 3. Représentation des principaux systèmes permettant de maintenir le potentiel phosphate.

Abréviation: translocateur ATP/ADP (ANT).

Les organismes non chlorophylliens possèdent deux processus permettant la production d'ATP. Le premier est permis par les phosphorylations au niveau du substrat (*Figure 3*). Ce processus est, par exemple, mis en place dans le cytoplasme par la glycolyse, *via* l'intermédiaire de la 3-phosphoglyceratekinase, de la pyruvate kinase, ou également par la phosphocréatine kinase dans certains tissus ou encore dans la mitochondrie par le cycle de Krebs avec la succinyl-CoA synthétase. Le deuxième est permis par la mitochondrie et l'OXPPOS (*Figure 3*). Ce processus aérobie couple l'oxydation de coenzymes réduits à la synthèse d'ATP (*voir partie 1.1*). Ce dernier met en lien direct le maintien du potentiel phosphate et le maintien du potentiel d'oxydoréduction de la cellule.

Le métabolisme cellulaire produit du NAD(P)H qui nécessite d'être réoxydé. La fermentation, notamment la fermentation lactique chez le mammifère, est une voie prépondérante du maintien du potentiel redox NADH/NAD⁺ (Jorfeldt et al., 1978; Rabinowitz and Enerbäck, 2020). Elle permet de régénérer directement le NADH en NAD⁺ en réduisant le pyruvate en lactate (*Figure 4*). Le deuxième mécanisme permettant la

régénération du NAD^+ se trouve au niveau de la mitochondrie avec la chaîne respiratoire (CR). Elle permet la réoxydation du NADH par des NADH ubiquinones oxydoréductases (*voir partie 1.1.2.1.1*). L'OXPHOS de la levure *S. cerevisiae* possède deux types de NADH ubiquinone oxydoreductase, un tourné vers la matrice mitochondriale permettant de réoxyder le NADH matriciel (Ndi) et deux ayant leur site actif orienté vers l'espace intermembranaire (Nde1 et Nde2), permettant de réoxyder le NADH cytosolique. Cependant, les mitochondries de mammifères ne possèdent qu'une NADH ubiquinone oxydoreductase, le complexe I (*voir partie 1.1.2.1.1*), dont le site actif est orienté vers la matrice mitochondriale. Le NADH étant faiblement transporté dans les mitochondries, des systèmes de navettes redox permettant le transport et la réoxydation indirecte du NADH cytosolique par la mitochondrie ont été mis en évidence (Cantó et al., 2015; Yang and Sauve, 2016). Un premier type de navette redox, dont l'expression est dépendante du tissu, est la navette glycérol-3-phosphate déshydrogénase (*voir partie 1.1.2.1.3*). Elle se compose d'une glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique (cG3PDH) et d'une mitochondriale (mG3PDH), qui est une ubiquinone oxydoréductase (*Figure 4*) (Houštěk et al., 1975; Rabinowitz and Enerbäck, 2020; Xiao et al., 2018). Cette navette permet la réduction, *via* le NADH, du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate (G3P) au niveau du cytosol. Le transport et l'oxydation de ce dernier en DHAP par la mG3PDH, approvisionne directement la chaîne respiratoire en électrons (*Figure 4*). La navette malate/aspartate est un autre type de navette redox, permettant l'oxydation du NADH cytosolique par la mitochondrie. Contrairement à la navette G3P, le maintien de la balance redox $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ cytosolique par la navette malate/aspartate implique l'action conjointe de transporteurs membranaires et de déshydrogénases cytosoliques et mitochondriales. La MAS, grâce à la conversion d'oxaloacetate en malate par la malate déshydrogénase 1 (MDH1), permet l'oxydation du NADH cytosolique (Barron et al., 1998; Borst, 2020, 1962; Xiao et al., 2018). Le malate est par la suite transporté dans la mitochondrie, pour être oxydé dans la matrice par la malate déshydrogénase 2, générant ainsi, dans la mitochondrie, du NADH qui sera oxydé par le complexe I (*Figure 4*). Les deux navettes redox qui sont décrites ici sont dépendantes de l'activité de l'OXPHOS.

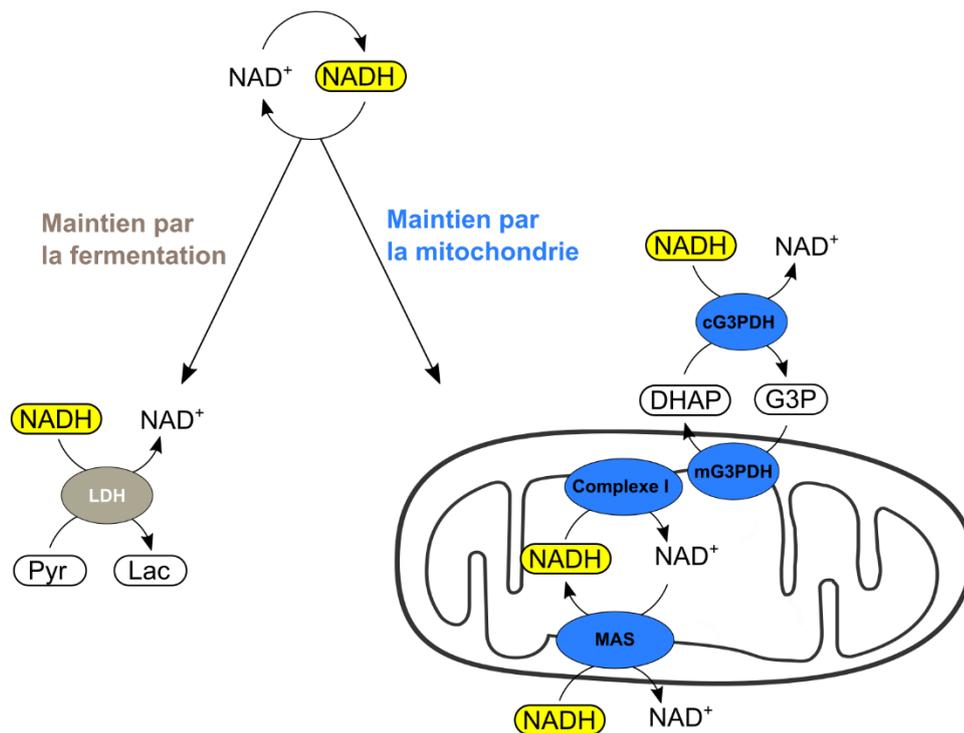


Figure 4. Représentation des principaux systèmes permettant de maintenir le potentiel d'oxydoréduction du [NADH]/[NAD⁺].

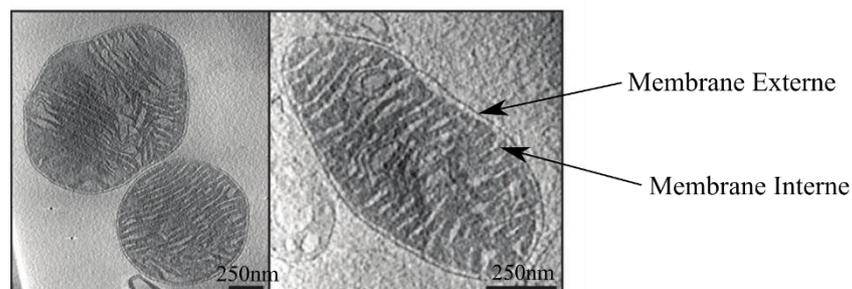
Abréviations: Pyruvate (Pyr), Lactate (Lac), dihydroxyacétone (DHAP), Glycérol-3-phosphate (G3P), Glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique (cG3PDH) ou mitochondriale (mG3PDH), navette malate/aspartate (MAS)

Outre, son rôle liant le potentiel phosphate et le potentiel redox, par la mG3PDH et le complexe I, d'autres ubiquinones oxydoréductases sont décrites comme transférant leurs électrons à la chaîne respiratoire, qui est un composant de l'OXPHOS, plaçant, de fait, une multitude de voies métaboliques, cytosoliques et matricielles, sous la dépendance de l'activité de ce système (*voir partie 1.1.2.1.3.*). L'OXPHOS est un carrefour électronique permettant le fonctionnement et la régulation de très nombreuses voies métaboliques, un dérèglement dans ce dernier induit des effets pléiotropiques sur l'ensemble du métabolisme cellulaire. Ce système étant localisé dans la mitochondrie, c'est l'une des raisons pour lesquelles elle est régulièrement appelée « the powerhouse of the cell ».

1.1 La mitochondrie et le fonctionnement du système des oxydations phosphorylantes.

La mitochondrie est un organe assurant de nombreuses fonctions essentielles pour les cellules dans le métabolisme des lipides (β -oxydation), des acides aminés (cycle de l'urée) et surtout dans le maintien du potentiel phosphate et redox par l'intermédiaire de l'OXPHOS. La mitochondrie est composée d'une double membrane phospholipidique, la membrane externe permettant la séparation entre l'intérieur de la mitochondrie et le cytoplasme, la membrane interne délimitant l'espace intermembranaire et la matrice. Cette membrane interne à la particularité de former des invaginations au sein de la matrice mitochondriale, appelées crêtes mitochondriales (*Figure 5*).

A



B

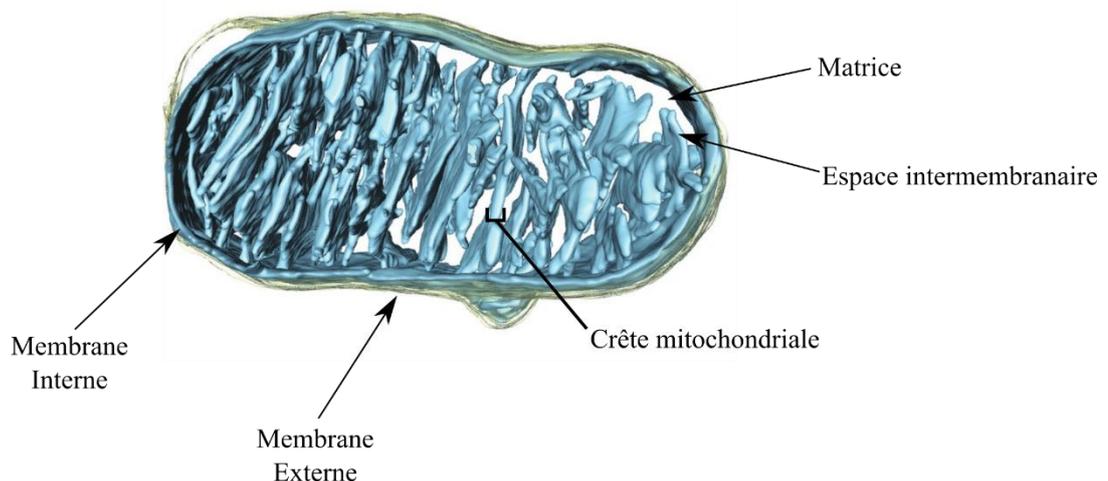


Figure 5. Illustration de l'architecture de la mitochondrie (Modifiée de Brandt *et al.*, 2017).

(A) Image de cryo-microscopie électronique à transmission de mitochondries isolées de cœur de *mus musculus*. (B) Représentation d'un tomogramme de mitochondrie cardiaque, dans lequel sont représentées la membrane interne qui forme des crêtes (en bleu), et la membrane externe (en jaune).

Au-delà de leur structuration, les membranes interne et externe se différencient très fortement par leur composition protéo-lipidique (Horvath and Daum, 2013). En effet, il est décrit que la membrane interne mitochondriale est extrêmement enrichie en protéines et certains phospholipides tels que les cardiolipides (Horvath and Daum, 2013; Schlame, 2021). De plus, la composition et la topologie des membranes mitochondriales varient suivant les tissus et semblent être en corrélation avec les fonctions et spécificités métaboliques de ces derniers (Brandt et al., 2017; Kappler et al., 2019). Une autre des caractéristiques de la mitochondrie est qu'elle possède son propre ADN codant pour 1% du protéome mitochondrial. Son ADN est polycistronique et code pour 11 ARNm codant pour 13 sous-unités essentielles des complexes de l'OXPPOS, 2 ARN ribosomiaux et 22 ARN de transfert (Anderson et al., 1981). Le reste du protéome mitochondrial étant codé par l'ADN nucléaire, ceci implique que la très grande majorité des protéines mitochondriales doit être importée que ce soit dans les membranes (interne ou externe) ou dans les compartiments aqueux (espace intermembranaire ou matrice mitochondriale). Différents types d'imports sont mis en place pour permettre le transport et l'adressage des protéines mitochondriales. Ils peuvent être dépendants du fonctionnement de l'OXPPOS, car certains mécanismes d'import, tels que l'utilisation de protéines chaperonnes, peuvent nécessiter de l'ATP et la présence d'un $\Delta\Psi$ pour pouvoir fonctionner (Harbauer et al., 2014).

L'OXPPOS est étudié depuis près d'un siècle, et malgré cela de nombreuses zones d'ombres subsistent encore sur son fonctionnement. C'est le système le plus étudié de la mitochondrie car son rôle est central dans le métabolisme des cellules, notamment dans le maintien de la balance énergétique est essentiel (Birsoy et al., 2015; Sullivan et al., 2015). Les paragraphes suivants de l'introduction s'attacheront à présenter (1) le fonctionnement de l'OXPPOS à travers la théorie chimio-osmotique de MITCHELL, (2) la composition du système des OXPPOS et (3) l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire et son incidence sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

1.1.1 La théorie chimio-osmotique de MITCHELL.

L'OXPPOS est le système qui permet de coupler la respiration à la synthèse d'ATP. Il se compose d'une chaîne respiratoire et d'un système phosphorylant (*Figure 6*). La chaîne respiratoire est couramment décrite comme étant composée de quatre complexes (Complexes I, II, III et IV) et deux transporteurs mobiles d'électrons : l'ubiquinone (CoQ) et le cytochrome *c* (cyt *c*). L'OXPPOS comporte également un système phosphorylant

composé de l'ATP synthase, de transporteurs de nucléotides adényliques (ANT) et de transporteurs de phosphate inorganique (PiC) (*Figure 6*).

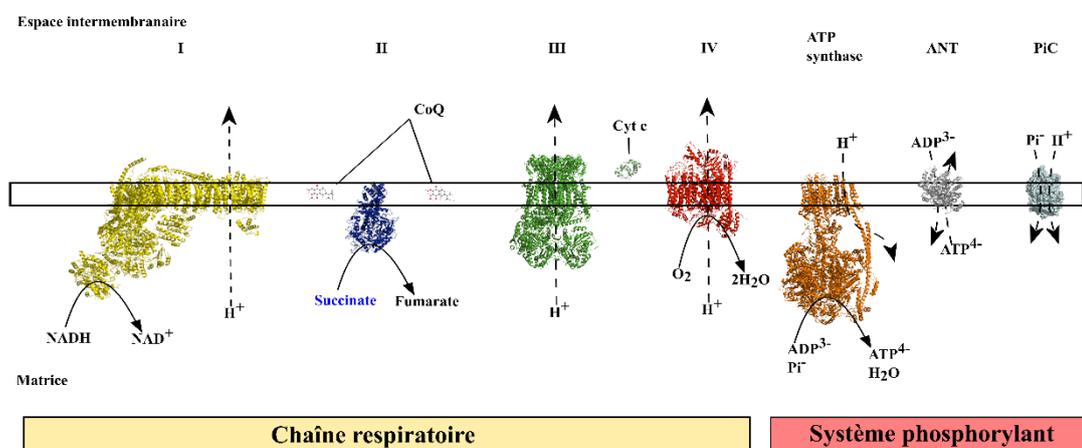


Figure 6. Illustration du système des oxydations phosphorylantes de mammifère (OXPHOS).

Les structures des différents complexes proviennent du : complexe I de *Bos taurus* (I, pdb : 5GPN), complexe II de *Sus scrofa* (pdb : 3SFD), complexe III de *Bos taurus* (III, pdb : 5GPN), complexe IV de *Bos taurus* (IV, pdb : 5GPN), cytochrome *c* de *Bos taurus* (Cyt *c*, pdb : 2B4Z), ATP synthase de *Bos taurus* (pdb : 5FIL), translocateur ATP/ADP de *Bos taurus* (ANT, pdb : 1OKC). Le transporteur de phosphate (PiC) n'ayant pas été cristallisé chez le mammifère est représenté sous forme de sphère.

Le mécanisme permettant de coupler l'activité de la chaîne respiratoire à la synthèse d'ATP est décrit par la théorie chimio-osmotique. Elle a été confortée expérimentalement par de nombreux laboratoires et est aujourd'hui communément admise. Cette théorie est majoritairement basée sur les travaux du Pr. Peter MITCHELL (Mitchell, 1961), elle repose sur trois principes novateurs pour l'époque :

Le premier est le principe de métabolisme vectoriel, permis par les translocases qui peuvent transférer activement un métabolite de part et d'autre d'une membrane, et par conséquent pouvant générer des forces osmotiques de part et d'autre de cette membrane. Ce concept est la base du principe de transfert de groupes chimio-osmotiques qui dans le cadre de l'OXPHOS est le proton.

Le second, est en relation avec le premier concept, c'est le principe de couplage entre énergie d'oxydoréduction et énergie osmotique. Les translocases du système permettent le couplage entre l'oxydation de substrats, la réduction de l'oxygène et la translocation de protons vers un compartiment physiquement séparé de celui qui consomme

l'oxygène. Ce processus permet d'accumuler les protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, générant ainsi un potentiel électrochimique en protons ou force proton motrice (Δp). Le proton étant une entité chimique chargée dont la concentration influence le pH, le potentiel créé par l'accumulation de proton hors de la matrice mitochondriale est donc défini par une composante électrique ($\Delta \Psi$) et une composante chimique (ΔpH) dont la relation est la suivante :

$$\Delta p = \Delta \Psi - Z \Delta pH$$

où Z est le facteur conventionnel $2,303 RT/F$ (R: constante des gaz parfaits ; T: température en degrés Kelvin ; F: constante de FARADAY)

Ce concept est la base de la théorie du couplage entre transfert électronique et protonique aux seins des complexes I, III et IV. La génération de cet intermédiaire permet de coupler énergétiquement l'oxydation des substrats par la chaîne respiratoire à la synthèse d'ATP. Initialement, Pr. MITCHELL avait décrit que le transfert d'électrons et la translocation de protons étaient réalisés par une entité physique. Cette dernière, lors de sa réduction capte des protons de la matrice par l'intermédiaire d'une première oxidoréductase, pour les transloquer dans l'espace intermembranaire au niveau de l'oxidoréductase suivante, lors de l'oxydation de cette entité physique. Ce mécanisme réactionnel est appelé « boucle de Mitchell », c'est un couplage direct entre le transfert d'électrons et de protons, impliquant une stoechiométrie fixe et égale à 1 électron transféré pour 1 proton transloqué. A l'heure actuelle, seul le complexe III est décrit comme fonctionnant comme une « boucle de Mitchell » (Crofts, 2004). En effet, des travaux plus récents ont permis de démontrer que les complexes I et IV fonctionnaient comme des pompes à protons, dont la stœchiométrie électrons transférés/protons transloqués (e^- / H^+) était supérieure à 1 lorsqu'elle était ramenée au nombre de site de couplage (Galkin et al., 1999; Pietrobon et al., 1983; Wikstrom et al., 1981; Wikström and Hummer, 2012). Ceci sera décrit plus précisément dans la *partie 1.1.2.1*.

Le troisième grand concept est le couplage entre le transfert vectoriel de protons et la synthèse d'ATP par l'ATPsynthase. Pr. MITCHELL a imaginé que l'ATPsynthase pouvait elle aussi fonctionner comme une perméase, l'utilisation de la force protonmotrice apportant l'énergie nécessaire pour passer la barrière énergétique permettant la synthèse d'ATP. Il a été montré que l'ATPsynthase pouvait coupler la production d'ATP et le

transfert de protons grâce à un changement conformationnel de cette dernière (Baracca et al., 1995; Gu et al., 2019; Nakamoto et al., 2008; Noji et al., 1997).

Ces concepts ont engendré plus de 60 ans de travaux permettant d'affiner le modèle de la théorie chimio-osmotique. Actuellement, le mode de fonctionnement de l'OXPPOS est défini comme suivant. La chaîne respiratoire couple le transfère d'électrons issus de l'oxydation de substrats, comme le NADH et le succinate, et la réduction de l'oxygène à l'extrusion de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexe I, complexe III et complexe IV. La faible conductance aux protons de la membrane interne mitochondriale permet l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique en proton (Δp) de part et d'autre de cette membrane. Cette énergie chimio-osmotique ainsi générée par la chaîne respiratoire est utilisée par l'ATPsynthase, qui permet la réentrée des protons dans le sens du potentiel électrique et chimique. La rentrée des protons est mécaniquement couplée à des changements conformationnels de l'ATPsynthase, qui permettent de libérer l'énergie nécessaire pour produire l'ATP à partir d'ADP et de phosphate.

1.1.2 Le système des oxydations phosphorylantes mammifère.

1.1.2.1 La Chaîne respiratoire.

1.1.2.1.1 La NADH : ubiquinone oxidoreductase (Complexe I).

La réoxydation du NADH est un enjeu crucial pour les cellules qui mettent en place de nombreuses stratégies pour le réoxyder. Chez les mammifères, par opposition à d'autres organismes bactériens ou fongiques, la réoxydation du NADH par la chaîne respiratoire est réalisée par un seul complexe protéique : la NADH ubiquinone oxidoreductase (Complexe I). Elle permet de coupler la réoxydation du NADH et la réduction de l'ubiquinone à l'extrusion de protons (*Figure 7*). Ce complexe, d'une taille approximative de 1 MDa, est décrit dans la littérature comme étant composé de 45 sous-unités, dont 14 sont centrales et sont toutes essentielles au processus « bioénergétique » couplant le transfert d'électrons au transfert des protons (Carroll et al., 2006, 2003; Janssen et al., 2006; Wirth et al., 2016). Ces 14 sous-unités se divisent en deux groupes.

1.1.2.1.1.1 Partie matricielle du complexe I : transfert d'électrons du NADH à l'ubiquinone.

Un premier groupe composé de 7 sous-unités se trouve dans la matrice mitochondriale (notée NDUFA pour « NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Alpha

Subcomplexe ») et est en charge du transfert d'électrons du NADH jusqu'à l'ubiquinone. Le bras périphérique du complexe I oxyde le NADH par l'intermédiaire d'un FMN prosthétique. Les deux électrons qui résultent de l'oxydation du NADH sont transférés séquentiellement du FMN au centre fer-soufre se trouvant à proximité (*Figure 7*). Les électrons transitent par 7 des 8 centres fer-soufre que comportent le complexe I, jusqu'à la poche de réduction de l'ubiquinone. Ces centres fer-soufre sont répartis dans les sous-unités se trouvant dans la partie matricielle du complexe I qui est composée du module N et du module Q (*Figure 7*).

Le site de réduction de l'ubiquinone se trouve à la jonction entre la partie matricielle du complexe I, au niveau des sous-unités NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8 qui appartient au module Q, et de la partie membranaire du complexe I, au niveau de la sous-unité ND1 (*Figure 7*) (Agip et al., 2018). Par ailleurs, il semblerait que la poche de réduction de l'ubiquinone se situe hors de la membrane interne mitochondriale (Agip et al., 2019), ce qui pose des questions quant au mécanisme de réduction de l'ubiquinone qui est un composé très hydrophobe. C'est au niveau de cette poche de réduction de l'ubiquinone qu'agissent les inhibiteurs du complexe I, tels que la roténone ou la Piericidine A qui ont

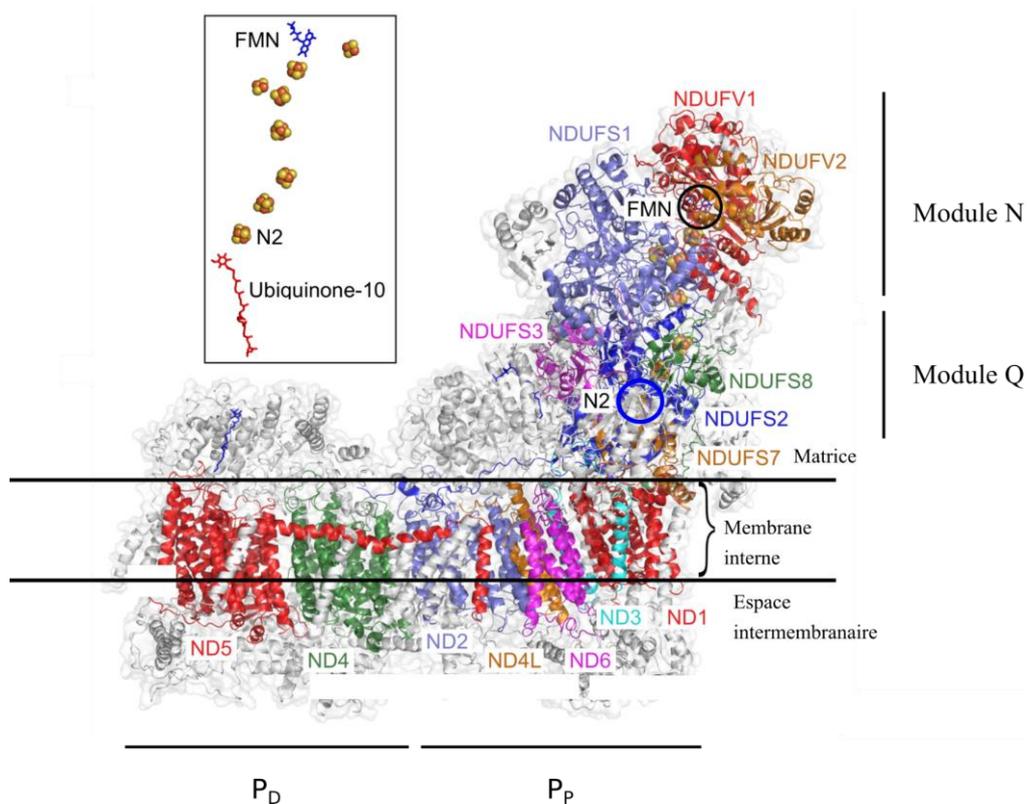


Figure 7. Représentation de la structure du complexe I de cœur de *Mus musculus* et du trajet des électrons dans la partie matricielle (Modifiée de Agip et al., 2019).

été utilisés dans nos travaux (*Figure 7*) (Lobo-Jarne et al., 2018; Molinié et al., 2022; Vinogradov and Grivennikova, 2016). A l'heure actuelle, aucun inhibiteur du complexe I n'est connu pour agir au niveau de la poche d'oxydation du NADH.

1.1.2.1.1.2 Partie membranaire du complexe I : translocation de protons.

Un deuxième groupe de 7 sous-unités est codé par le génome mitochondrial (notée ND pour « NADH Dehydrogenase »), elles sont enchâssées dans la membrane interne mitochondriale. Ces sous-unités sont impliquées dans la translocation des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Il a été décrit que les sous-unités ND5, ND4, ND2 possédaient une structure similaire aux canaux H^+/Na^+ de certaines bactéries, pouvant faire de ces sous-unités des semi-canaux permettant le transfert des protons (Vinothkumar et al., 2014). De plus, l'existence d'un quatrième canal pouvant se trouver à la jonction entre la partie matricielle et la partie membranaire du complexe I est débattue (Zickermann et al., 2015) (*Figure 8*). L'existence et le fonctionnement de ces canaux est important pour comprendre le phénomène de couplage qu'il existe entre transfert d'électrons et translocation de protons au niveau du complexe I.

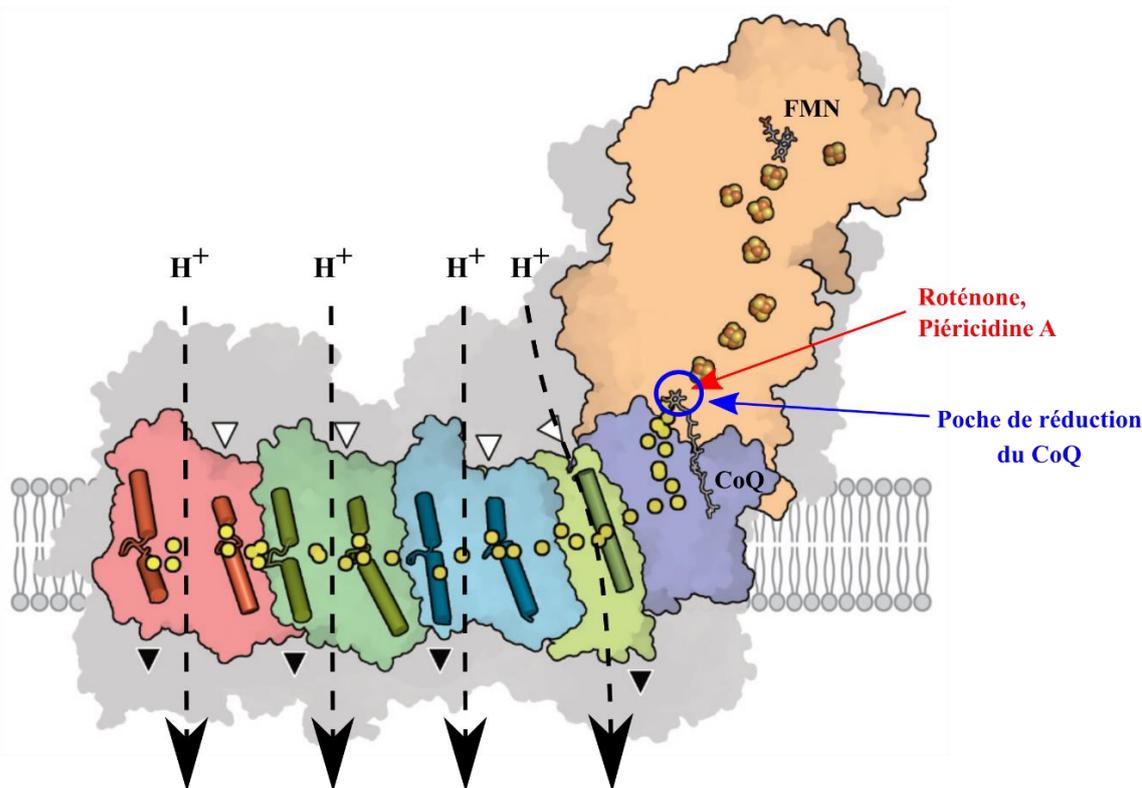


Figure 8. Illustration du complexe I et de ses différentes parties catalytiques (Modifiée de Agip *et al.*, 2019).

1.1.2.1.1.3 Mécanisme de couplage entre électrons et proton.

Des données expérimentales ont permis de déterminer que la stoechiométrie du complexe I était supérieure à 1 proton transloqué par électron transféré (Galkin et al., 1999). Impliquant donc que le complexe I ne fonctionnait pas comme une boucle de Mitchell (Galkin et al., 1999). Il semblerait donc que le couplage entre le transfert d'électrons, au niveau de la partie matricielle, et le transfert vectoriel de protons par la partie membranaire, soit décrit comme étant indirecte (Holt et al., 2003). Le modèle actuel décrit le complexe I comme étant une pompe à protons, dans lequel le transfert d'électrons à l'ubiquinone serait à l'origine d'un changement conformationnel majeur, permettant à la partie membranaire de transloquer les protons à l'extérieur de la matrice mitochondriale (Mourier and Larsson, 2011). L'obtention récente de la structure moléculaire du complexe I dans de nombreux organismes n'a pas permis de déterminer le mécanisme de couplage, ainsi que la stoechiométrie (e^-/H^+), qui restent donc encore sujets d'intenses débats (Mourier and Larsson, 2011). Cependant, il est admis que la stoechiométrie du complexe I est de 4 protons transloqués pour 2 électrons transférés (Galkin et al., 1999; Hinkle, 2005; Wikström and Hummer, 2012).

1.1.2.1.1.4 Sous-unités accessoires.

Outre ce corps catalytique de 14 sous-unités, plus d'une trentaine de protéines sont décrites comme composant le complexe I (Carroll et al., 2006; Stroud et al., 2016; Wirth et al., 2016). Elles sont définies comme étant des sous-unités accessoires ou surnuméraires.

L'étude de ces sous-unités est en plein essor car le rôle de ces protéines n'est pas totalement compris et reste toujours débattu notamment pour leur rôle putatif dans certaines pathologies (Koene et al., 2012). Il a été décrit que 25 sous-unités composant le complexe I étaient indispensables à l'assemblage d'un complexe I fonctionnel (Stroud et al., 2016). De plus, l'étude du rôle fonctionnel des sous-unités accessoires du complexe I est, dans certains cas, complexifiée par l'existence d'isoformes dont l'expression dépend des tissus (Bridges et al., 2017; Guerrero-Castillo et al., 2017). Par exemple, il a été décrit que la sous-unité NDUFV3 existe sous deux isoformes : une isoforme longue (50kDa, NDUFV3-L) et une courte (~10kDa, NDUFV3-S). NDUFV3-L est décrite comme étant plus abondante dans le cerveau et le foie, alors que NDUFV3-S est plus abondante dans le cœur et les muscles striés squelettiques (Bridges et al., 2017; Guerrero-Castillo et al., 2017). Les complexes

possédant l'isoforme longue semblent présenter une plus haute affinité pour le NADH que ceux possédant la forme courte (Devin et al., 2019). Cette corrélation pose la question de l'existence de différents types de complexe I, possédant des propriétés qui diffèrent suivant les tissus, mais ces observations restent à être confirmées.

1.1.2.1.2 La Succinate déshydrogénase (Complexe II).

La succinate déshydrogénase (Complexe II) permet de réduire l'ubiquinone grâce à l'oxydation du succinate en fumarate. Le complexe II est également une enzyme du cycle de Krebs, il place par conséquent le cycle de Krebs sous la dépendance de la chaîne respiratoire.

Ce complexe d'une taille de 130 kDa est, chez le mammifère, décrit comme étant composé de quatre sous-unités codées par le génome nucléaire : deux se trouvant dans la matrice mitochondriale (SDHA et SDHB) et deux se trouvant dans la membrane interne mitochondriale (SDHC et SDHD) (*Figure 9*) (Rutter et al., 2010; Sun et al., 2005). La sous-unité SDHA possède un FAD prosthétique permettant l'oxydation du succinate. Les deux électrons résultant de son oxydation sont transférés séquentiellement, aux trois centres fer-soufre localisés dans la sous-unité SDHB, puis jusqu'à ou jusqu'au(x) site(s) de réduction de l'ubiquinone localisé(s) entre les sous-unités SDHC et SDHD. En effet, la présence d'un hème *b* dans la sous-unité SDHD et son rôle potentiel dans le transfert d'électrons restent débattus. L'hypothèse selon laquelle cet hème *b* serait fonctionnel impliquerait l'existence de deux sites de réduction des ubiquinones : un site de réduction de l'ubiquinone se trouvant proche de la matrice (Q_P), et l'autre étant proche de l'espace intermembranaire à proximité de l'hème *b* (Q_D) (*Figure 9*) (Sun et al., 2005). La structure du complexe II, ainsi que l'étude des potentiels d'oxydoréduction des centres fer-soufre chez la levure montrent que le chemin électronique le plus favorable pour les électrons ne passe pas par cet hème (Hägerhäll, 1997; Sun et al., 2005).

La localisation de ces deux potentielles poches de réduction de l'ubiquinone a notamment été permise par l'utilisation d'un inhibiteur du complexe II, le TTFA (thenoylfluoroacetone), dont les sites de fixations sont colocalisés avec les sites possibles de fixation de l'ubiquinone (Sun et al., 2005; Yankovskaya et al., 1996). Il existe plusieurs catégories d'inhibiteurs du complexe II. Des inhibiteurs métaboliques, comme notamment l'oxaloacetate ou le malonate, induisent une inhibition compétitive et réversible du complexe II au niveau de la poche de réduction du FAD (*Figure 9*). D'autres inhibiteurs comme le TTFA ou l'Atpenin A5 (Atpn A5) induisent une inhibition irréversible du

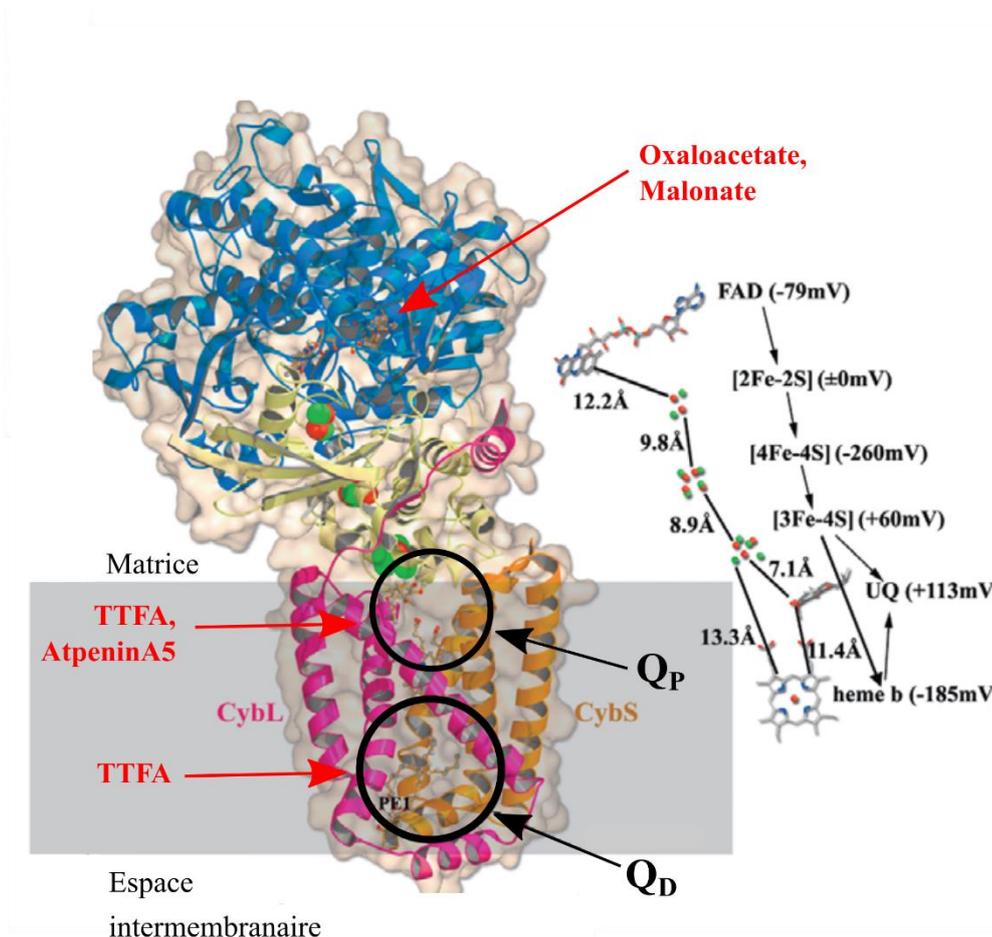


Figure 9. Representation de la structure du complexe II de cœur de *Sus scrofa* et du trajet des électrons au sein du complexe (Modifiée de Sun *et al.*, 2005).

complexe II en inhibant la réduction de l'ubiquinone (Miyadera *et al.*, 2003; Sakuda *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2005; Yankovskaya *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2011). Lors de ma thèse, j'ai notamment utilisé le malonate et l'atpenin A5 comme inhibiteur du complexe II (Lobo-Jarne *et al.*, 2018; Molinié *et al.*, 2022).

1.1.2.1.3 Les autres ubiquinone oxydoréductases pouvant approvisionner la chaîne respiratoire en électrons :

La chaîne respiratoire est classiquement décrite comme étant composée de deux ubiquinones oxydoréductases, que sont le complexe I et le complexe II, considérées comme les deux voies d'entrée principales des électrons dans la chaîne respiratoire. Cependant, d'autres enzymes ont été décrites comme pouvant approvisionner la chaîne respiratoire en électrons, une partie d'entre elles sont décrites ici.

1.1.2.1.3.1 La Glycérol-3-Phosphate déshydrogénase mitochondriale (mG3PDH).

La mG3PDH est une enzyme à FAD prosthétique qui catalyse l'oxydation du G3P et la réduction de l'ubiquinone en DHAP. Cette protéine de 79kDa est une protéine membranaire extrinsèque dont le site actif est dirigé vers l'espace intermembranaire (*Figure 10*) (Mráček et al., 2013). Cette enzyme, qui est codée par le génome nucléaire, est surtout exprimée dans le tissu adipeux brun, le cerveau, les muscles striés squelettiques, le foie et les testicules (Green, 1936; Koza et al., 1996; Ohkawa et al., 1969).

1.1.2.1.3.2 La Dihydroorotate déshydrogénase (DHODH).

La DHODH est la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse des pyrimidines. Elle catalyse la conversion du dihydroorotate (DHO) en orotate (ORO), en transférant les électrons à l'ubiquinone (*Figure 10*). Cette enzyme à FMN est une protéine membranaire extrinsèque dont le site actif est dirigé vers l'espace intermembranaire (Liu et al., 2000; Walse et al., 2008). De par son rôle, la DHODH, qui est exclusivement codée par le génome nucléaire, est décrite comme étant exprimée majoritairement dans les tissus prolifératifs, régénératifs, où ayant une activité d'absorption ou de sécrétion (Löffler et al., 1997, 1996).

1.1.2.1.3.3 L'Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF-QO).

L'ETF-QO est la première enzyme impliquée dans la β -oxydation (Bartlett and Eaton, 2004; Lynen, n.d.; Watmough and Frerman, 2010). Elle permet le transfert des électrons provenant de l'oxydation d'acyl-CoA par l'ETF à l'ubiquinone (*Figure 10*) (Crane and Beinert, 1956; Hiltunen et al., 2010; Watmough and Frerman, 2010; Yang et al., 1987). L'ETF-QO est une enzyme extrinsèque de 64kDa de la membrane interne mitochondriale dont le site actif, dirigé vers la matrice mitochondriale, contient un FAD prosthétique (*Figure 10*). Cette enzyme possède un centre fer-soufre [4Fe4S] permettant le transfert des électrons du FAD à l'ubiquinone (Watmough and Frerman, 2010; Zhang et al., 2006). L'ETF-QO, qui est elle aussi exclusivement codée par le génome nucléaire, est exprimée également de façon tissu spécifique et semble être plus présente dans les tissus comme le cœur ou les muscles striés squelettiques que dans le cerveau (Bartlett and Eaton, 2004).

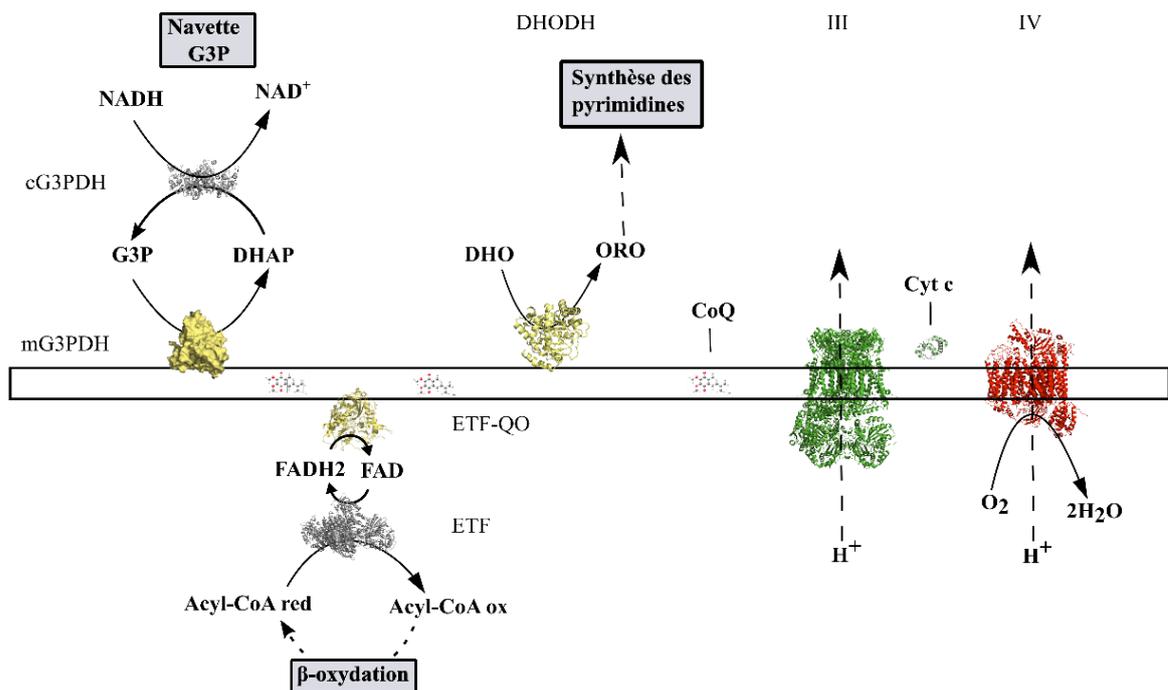


Figure 10. Représentation de la chaîne respiratoire approvisionnée avec des ubiquinone oxydotéductases alternatives et les voies métaboliques qui leur sont associées.

Les structures des différents complexes proviennent de la : glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique d'*Homo sapiens* (cG3PDH, pdb :6PYP), la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (mG3PDH) n'ayant pas été cristallisée chez le mammifère est représenté sous forme de sphère, Electron Transfer Flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase de *Sus scrofa* (ETF-QO, pdb : 2GMH), Electron Transfer Flavoprotein d'*Homo sapiens* (ETF, pdb : 2A1T), Dihydroorotate déshydrogénases d'*Homo sapiens* (DHODH, pdb : 3KVM), complexe III de *Bos taurus* (III, pdb : 5GPN), complexe IV de *Bos taurus* (IV, pdb : 5GPN).

L'ensemble de ces ubiquinones oxydoréductases place le métabolisme des lipides, le maintien du potentiel d'oxydoréduction $[NADH]/[NAD^+]$, la synthèse des pyrimidines et le cycle de Krebs sous la dépendance du fonctionnement de l'OXPPOS. La convergence de toutes ces voies métaboliques fait de l'OXPPOS un point central du fonctionnement de la cellule, un défaut dans ce dernier peut impacter l'activité de l'ensemble de ces voies métaboliques. Ceci laisse entrevoir une question essentielle : comment le système s'adapte-t-il lorsque la chaîne respiratoire doit réoxyder une multitude de substrats respiratoires en même temps ?

1.1.2.1.4 L'ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (Complexe III ou complexe *bc1*).

L'ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (complexe III) est le carrefour des électrons entrant dans la chaîne respiratoire par les ubiquinones oxydoréductases. Il permet de passer d'un transporteur bi-électronique (l'ubiquinone) à un transporteur monoélectronique le cytochrome *c* (*Figure 11*).

Un monomère de complexe III est d'une taille approximative de 240 kDa, et est composé de 11 sous-unités, dont trois sont impliqués dans le transfert d'électrons et dont seule la sous-unité MT-CYB (cytochrome *b*) est codée par le génome mitochondrial. Cette sous-unité contient les deux sites de liaison de l'ubiquinone (Q_0 et Q_i) du complexe III, deux hèmes *b* (b_L et b_H). La sous-unité CYC1 contenant le cytochrome *c1* et la sous-unité RIESKE (UQCRFS1) contenant un centre fer-soufre [2Fe-2S] permettant le transfert des électrons jusqu'au cytochrome *c* (*Figure 11*) (Iwata et al., 1998; Xia et al., 2013).

Ce complexe couple, comme le complexe I et complexe IV, le transfert d'électrons à une extrusion de protons. De manière remarquable, c'est le seul de ces trois complexes qui, à ce jour, est décrit comme fonctionnant comme une « boucle de Mitchell » et non pas comme une pompe à protons à l'instar des complexes I et IV (Crofts, 2004). Comme décrit précédemment, Pr. MITCHELL avait posé l'hypothèse, dans son modèle de la théorie

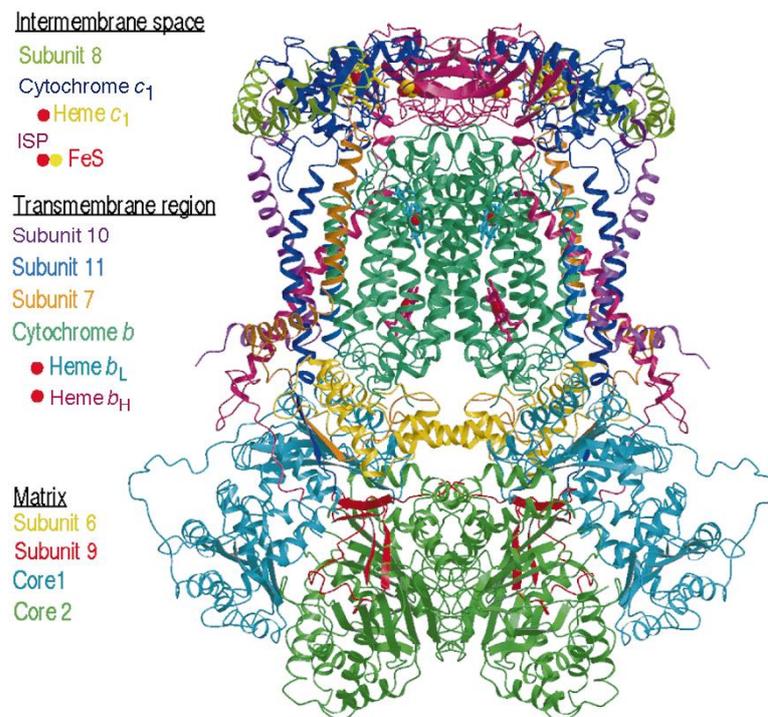


Figure 11. Représentation de la structure du complexe III de cœur de *Bos Taurus* (Modifiée de IWATA *et al.*, 1998).

chimio-osmotique, qu'une entité physique allait permettre le transfert d'électrons et l'extrusion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Pour le complexe III, cette entité est l'ubiquinone. Elle donne séquentiellement ces deux électrons au niveau de la poche d'oxydation de l'ubiquinone nommée Q_0 (Figure 12). Les électrons suivent deux voies au sein du complexe III, ce mécanisme est notamment permis par la différence de potentiel d'oxydoréduction qui existe entre les deux électrons. La première est la voie passant par le centre fer-soufre et acheminant les électrons jusqu'au cytochrome c_1 et *in fine* jusqu'au cytochrome c se trouvant dans l'espace intermembranaire (en bleu) (Figure 12). L'autre voie électronique transfère les électrons jusqu'au cytochrome b_L , puis au cytochrome b_H , et enfin jusqu'au site de réduction de l'ubiquinone nommée Q_i , se trouvant près de la matrice mitochondriale (en vert) (Figure 12). L'électron est transféré à une ubiquinone oxydée, en formant une semi-ubiquinone. L'oxydation d'une seconde ubiquinone au niveau du site Q_0 permet de réduire la semi-ubiquinone en ubiquinol dans le site Q_i . Du fait de la réduction des ubiquinones sur la face matricielle (Q_i) et l'oxydation des ubiquinones sur la face externe (Q_0), le mécanisme de couplage du complexe III est en adéquation avec le modèle de la boucle de Mitchell précédemment décrite dans la *partie 1.1.1*. Cette spécificité permet au complexe III d'avoir une stœchiométrie fixe de deux électrons transférés pour deux protons extrudés.

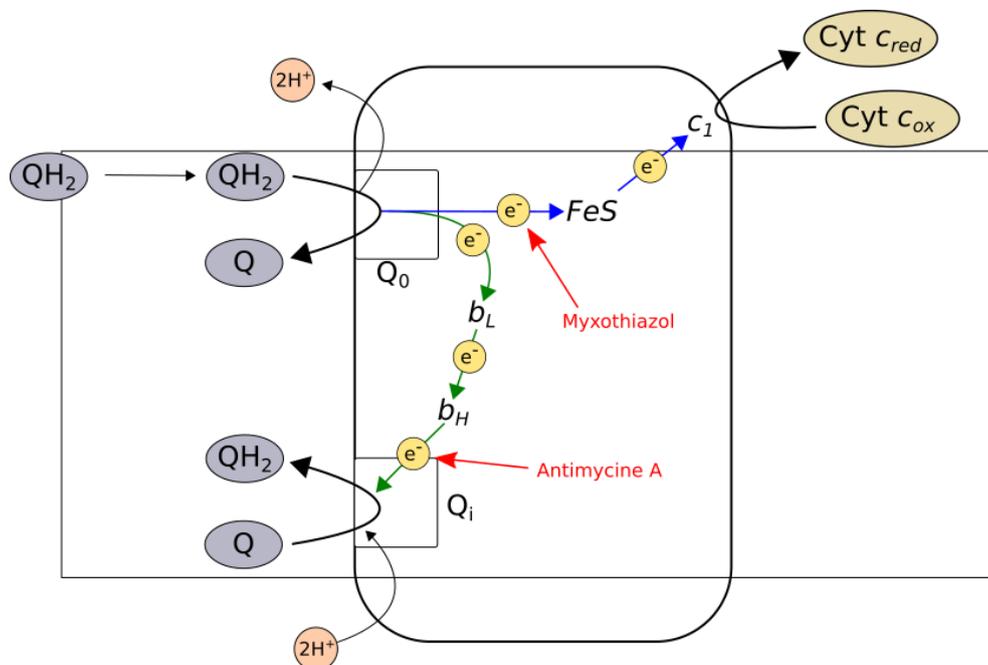


Figure 12. Schéma du transfert électronique et de translocation de protons au sein du dimère de complexe III, le principe de boucle de Mitchell.

Le complexe III présente aussi la particularité d'être assemblé en homodimère pour être fonctionnel (Berry et al., 2000; Covian and Trumpower, 2008). En effet, il est décrit que les électrons provenant de l'oxydation de l'ubiquinone sur le monomère 1 sont transférés au monomère 2 pour réduire le cytochrome *c*, et *vice versa*. D'après ce qui est décrit par Dr. ZHANG, il existerait deux conformations de la protéine RIESKE qui induisent deux positions du centre fer-soufre pour transférer les électrons. Une conformation dans laquelle le centre fer-soufre est proche du cytochrome *c₁* du deuxième dimère mais est éloigné de la poche de réduction de la quinone qu'est Q₀. Et une deuxième conformation dans laquelle ce centre fer-soufre est proche du cytochrome *b* et de la poche Q₀ et loin du cytochrome *c₁* (Zhang et al., 1998). La protéine RIESKE permettrait donc par ces changements de conformation de transférer les électrons de l'ubiquinone au cytochrome *c₁*. De plus, il semblerait que le transfert d'électrons interdimère soit également possible entre les cytochromes *b_L* de chaque monomère, qui sont physiquement proches (Covian and Trumpower, 2008, 2005). Ce dernier transfert électronique interdimère permettrait de garder l'hème *b_H* dans un état oxydé, évitant l'encombrement électronique du système susceptible de provoquer une augmentation de la production de ROS (Covian and Trumpower, 2008).

Le complexe III possède plusieurs sites d'inhibition, l'un d'entre eux se situe entre la poche Q_i et le centre fer-soufre, c'est le site de fixation de la stigmatelline et du myxothiazol. Un autre site d'inhibition se situe entre le cytochrome *b_H* et la poche Q₀, c'est le site de fixation de l'antimycine A, qui est un inhibiteur couramment utilisé en respiration pour inhiber le complexe III (*Figure 12*).

1.1.2.1.5 La Cytochrome *c* oxydase (Complexe IV).

La cytochrome *c* oxydase (complexe IV) est le dernier complexe et pompe à protons de la chaîne respiratoire, il couple l'oxydation du cytochrome *c* et la réduction de l'oxygène à une translocation des protons.

Ce complexe d'une taille approximative de 200 kDa est historiquement décrit comme étant composé de 13 sous-unités dont 3 sous-unités catalytiques codées par l'ADN mitochondrial (I-III), et 10 sous-unités codées par l'ADN nucléaire (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII) (*Figure 13*) (Kadenbach, 2017; Kadenbach and Hüttemann, 2015; Zong et al., 2018).

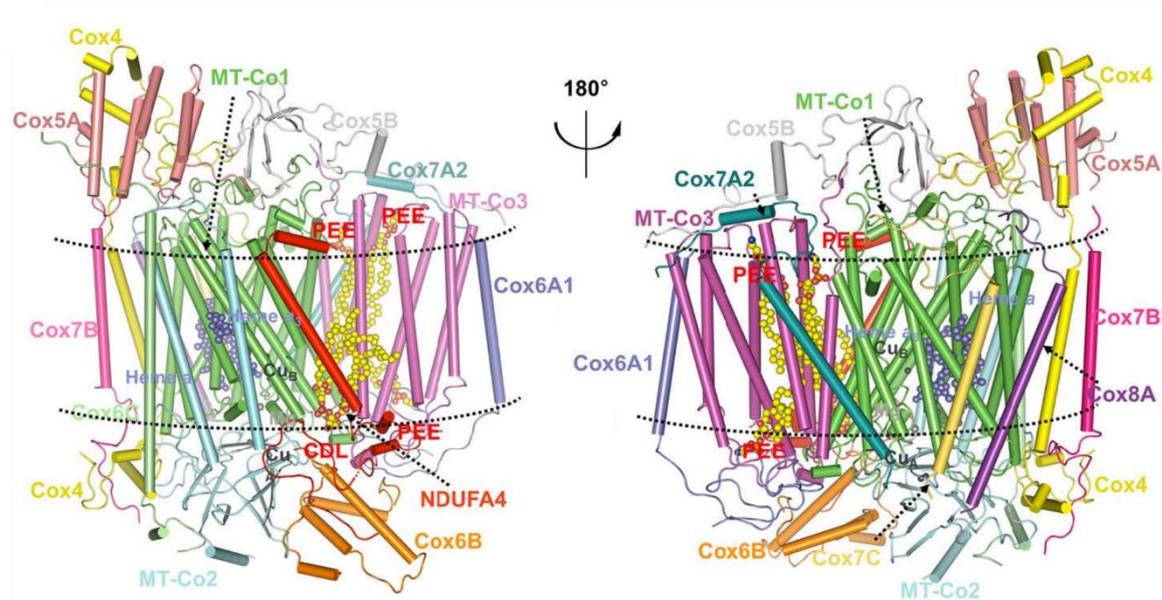


Figure 13. Représentation de la structure du complexe IV de cœur de *Bos taurus* (Modifiée de Zong *et al.*, 2018).

Les sous-unités I et II sont responsables du transfert d'électrons au sein du complexe IV. La sous-unité I contient un hème *a*, un hème binucléaire *a₃/Cu_b* et est le site de réduction de l'oxygène, où quatre électrons sont transférés à une molécule de dioxygène pour former deux molécules d'eau (*Figure 14*) (Pilet *et al.*, 2004; Zong *et al.*, 2018). Le cyanure est l'inhibiteur le plus connu du complexe IV, il se fixe dans cette sous-unité au niveau de l'hème *a₃*, empêchant le transfert d'électrons jusqu'à l'oxygène (Cooper and Brown, 2008). La sous-unité II, quant à elle, contient un noyau cuivrique (*Cu_a*) qui est l'accepteur des électrons provenant du cytochrome *c*. La sous-unité III, est décrite comme permettant la stabilisation des centres actifs des sous-unités I et II, mais elle est également décrite comme étant l'accepteur initial des protons du complexe IV (Saraste *et al.*, 1981; Varanasi and Hosler, 2012; Wikstrom *et al.*, 1981). Le cytochrome *c* se fixe au niveau de la sous-unité II et transfère son électron au centre *Cu_A* (centre composé de deux atomes de cuivres) (*Figure 14*). Les électrons sont ensuite transmis à l'hème *a* situé au niveau de la sous-unité I, pour être transférés au centre binucléaire *a₃/Cu_b*, où ils sont ensuite transférés à l'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire, le dioxygène. Ce transfert d'électrons est couplé à une extrusion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe IV est décrit comme étant une pompe à protons, dont la stœchiométrie électrons transférés/protons extrudés communément acceptée est de deux

électrons transférés pour quatre protons transloqués (Antonini et al., 1993; Wikstrom et al., 1981; Wikström and Hummer, 2012).

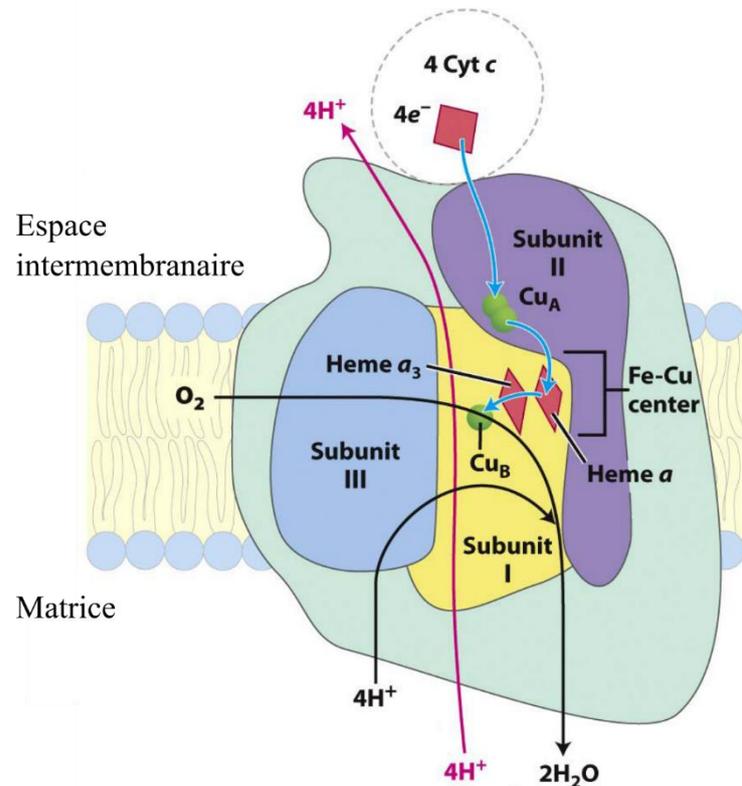


Figure 14. Illustration du complexe IV, de ses différentes parties catalytiques, et du mécanisme de transfert d'électrons et de translocation de proton au sein de ce complexe (Modifiée de Lehninger *et al.*).

Le complexe IV possède des sous-unités qui semblent avoir un rôle dans la régulation de son activité, indépendamment du processus de transfert d'électrons ou de la translocation des protons (Kadenbach, 2003; Kadenbach and Hüttemann, 2015). Dr. KADENBACH décrit que les trois sous-unités catalytiques fonctionnent plus efficacement sans les autres sous-unités, qui ralentissent l'activité du complexe IV et le rendent sensible à certaines régulations métaboliques. Par exemples, des sous-unités telles que la sous-unité IV peuvent fixer l'ADP et modifier l'activité du complexe IV, rendant ce complexe sensible au potentiel phosphate (ratio $[ATP]/([ADP][Pi])$) (Beauvoit and Rigoulet, 2001; Frank and Kadenbach, 1996; Napiwotzki and Kadenbach, 1998). Une telle régulation pourrait permettre aux cellules de moduler l'activité de la chaîne respiratoire suivant l'état énergétique de celle-ci. Certaines sous-unités du complexe IV possèdent différentes isoformes dont l'expression est tissu-spécifique (Kadenbach and Hüttemann, 2015). La sous-unité VI, par exemple, possède une forme VIa-L (pour « Liver type ») qui

est retrouvée dans le foie. Il a été décrit que la présence de palmitate divise par deux le ratio électrons transférés/protons pompés (Frank and Kadenbach, 1996; Kadenbach and Hüttemann, 2015). *A contrario*, les complexes IV possédant la forme VIa-H (pour « Heart type ») ne sont pas affectés par le palmitate, mais rendent le complexe IV sensible au ratio potentiel phosphate (Kadenbach and Hüttemann, 2015; Lee and Kadenbach, 2001). De telles expériences ont été faites sur liposomes reconstitués et ne semblent pas être confirmées *in vivo*, ne permettant pas de conclure sur un rôle physiologique de ces derniers. D'autres sous-unités du complexe IV sont exprimées de façon tissu-spécifique telles que VII et VIII, ce qui suggère que la composition du complexe IV est finement régulée par la spécificité des cellules ou des tissus (Kadenbach and Hüttemann, 2015; Mansilla et al., 2018). L'existence d'isoformes dont l'expression est tissu-spécifique pose de nombreuses questions sur le rôle physiologique de ces sous-unités, et du lien possible entre le métabolisme et l'activité du complexe IV, voire par extension, de la chaîne respiratoire. En effet, il a été décrit que le complexe IV serait l'étape limitante de la chaîne respiratoire, dictant par conséquent les capacités maximales de celle-ci (Kadenbach et al., 2013; Kadenbach and Hüttemann, 2015), cependant ces conclusions restent à tempérer. Des travaux montrent que la perte de 60% de l'activité du complexe IV n'induit pas de défauts respiratoires dans un système de mitochondries isolées, impliquant donc qu'il ne semble pas limitant dans ces conditions (Mourier et al., 2014b). Cependant, ces divers mécanismes de régulations du complexe IV, montrent la flexibilité du système à répondre aux changements métaboliques, et notamment aux demandes énergétiques des différents organes (Kadenbach and Hüttemann, 2015).

1.1.2.1.6 Les transporteurs mobiles des électrons :

1.1.2.1.6.1 L'ubiquinone (CoQ).

L'ubiquinone, également appelé Coenzyme Q ou quinone, permet le transfert des électrons des ubiquinones oxido-reductases au complexe III (*Figure 6 et Figure 10*). Elle est constituée d'un cycle benzoquinone hydrophile, qui est la partie acceptant les électrons, et d'une chaîne carbonée isoprénique, dont sa longueur permet son enchâssement dans la membrane interne mitochondriale (*Figure 15*). Cette queue carbonée possède une grande disparité de taille dans le vivant pouvant aller d'une à dix unités isoprènes. Pour des raisons encore inconnues, la souris *mus musculus*, présente deux formes d'ubiquinone à neuf ou dix unités isoprénoïdes, coenzyme Q₉ ou Q₁₀, alors que chez l'humain, seule l'entité comportant dix unités est présente.

L'ubiquinone est réduite en ubiquinol par deux cycles de réduction monoélectronique, formant de façon transitoire une semi-ubiquinone, forme radicalaire de l'ubiquinone (*Figure 15*) (Hirst and Roessler, 2016).

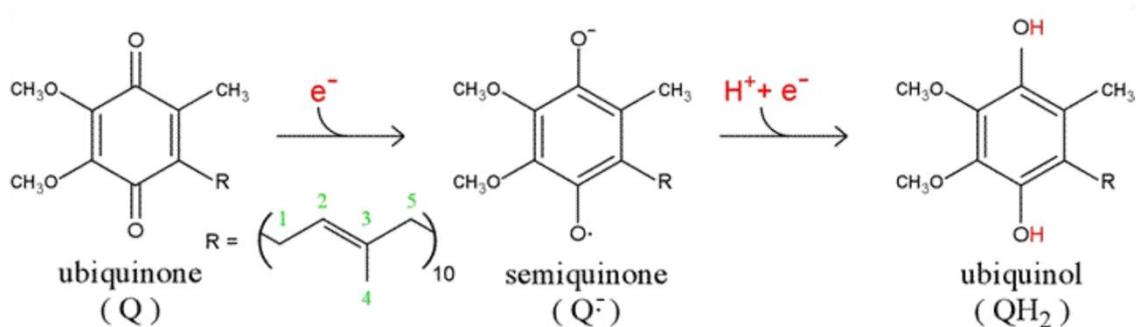


Figure 15. Illustration du mécanisme de réduction de l'ubiquinone en ubiquinol.

1.1.2.1.6.2 Le cytochrome c (cyt c).

Le cytochrome *c* est une hémoprotéine de 12kDa qui permet le transfert mono-électronique entre les complexes III et IV (*Figure 6*) (Kranz et al., 2009). Il est le seul transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire qui n'est pas enchâssé dans la membrane interne et qui soit hydrosoluble (*Figure 16*). Il semblerait que sa proximité avec la membrane interne mitochondriale, dans l'espace intermembranaire, soit permise par la composition lipidique de celle-ci et notamment grâce aux cardiolipides (Hanske et al., 2012).

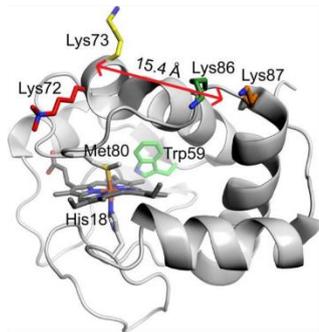
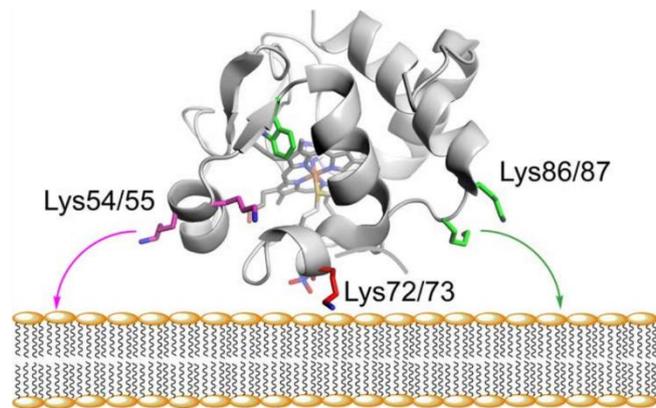
A**B**

Figure 16. Représentation de la structure du cytochrome *c* de *S. cerevisiae* et de son interaction avec la membrane interne mitochondriale (Modifiée de Elmer-Dixon *et al.*, 2018).

1.1.2.2 Le Système phosphorylant.

Le système phosphorylant permet de maintenir le potentiel phosphate ($[ATP]/([ADP][Pi])$) de la cellule en régénérant de l'ATP à l'aide de l'énergie chimio-osmotique générée par la chaîne respiratoire. Pour cela, ce système se compose de (1) l'ATP synthase et de transporteurs que sont (2) le transporteur de nucléotide adénylique et le transporteur de phosphate inorganique.

1.1.2.2.1 ATPsynthase.

La F_1F_0 adénosine triphosphate synthase (ATPsynthase) est un complexe d'environ 600kDa qui permet la transduction de l'énergie osmotique du gradient de protons en énergie chimique (*Figure 17*) (Baker *et al.*, 2012). Cette enzyme couple mécaniquement l'entrée des protons, dans le sens du potentiel électrochimique en protons, à un changement conformationnel permettant de libérer l'énergie nécessaire pour former de l'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique (Gu *et al.*, 2019; Nakamoto *et al.*, 2008; Noji *et al.*, 1997).

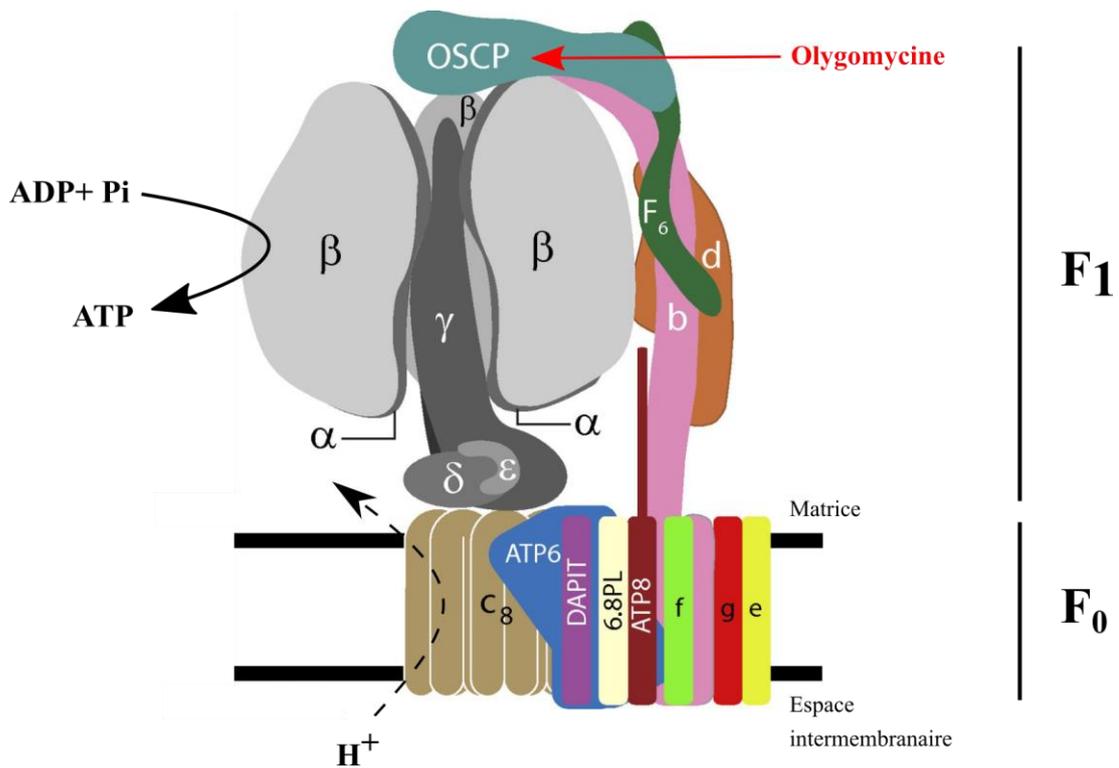


Figure 17. Illustration de l'ATP synthase, de ses différentes parties catalytiques, et du mécanisme de transfert d'électrons et de translocation de proton (Modifiée de He *et al.*, 2020).

Ce complexe de 29 sous-unités se compose d'une partie F₁ qui est la partie matricielle de l'ATP synthase, contenant un hexamère des sous-unités α₃β₃, en charge de la phosphorylation de l'ADP, et des sous-unités γ, δ, ε, formant une tige centrale permettant le lien entre la partie F₁ et F₀ (Figure 17) (Abrahams *et al.*, 1994; He *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Wittig and Schägger, 2008). Elle possède également une partie F₀ qui permet son ancrage dans la membrane interne mitochondriale, elle est composée des sous-unités a, c₁₀, e, f, g, A6L, (Figure 18) (Collinson *et al.*, 1994; Wittig and Schägger, 2008). Enfin, ce complexe se compose d'un « stator » qui permet de lier F₁ et F₀ et de maintenir la partie F₁ fixe. Cette partie est composée des sous-unités b, d, F₆ et de OSCP (pour oligomycin sensitivity conferring protein). Cette dernière sous-unité a été décrite comme étant le site de fixation de l'oligomycine, qui est l'inhibiteur de l'ATP synthase le plus communément utilisé (Figure 17). Les sous-unités a et A6L sont les deux seules sous-unités encodées par le génome mitochondrial.

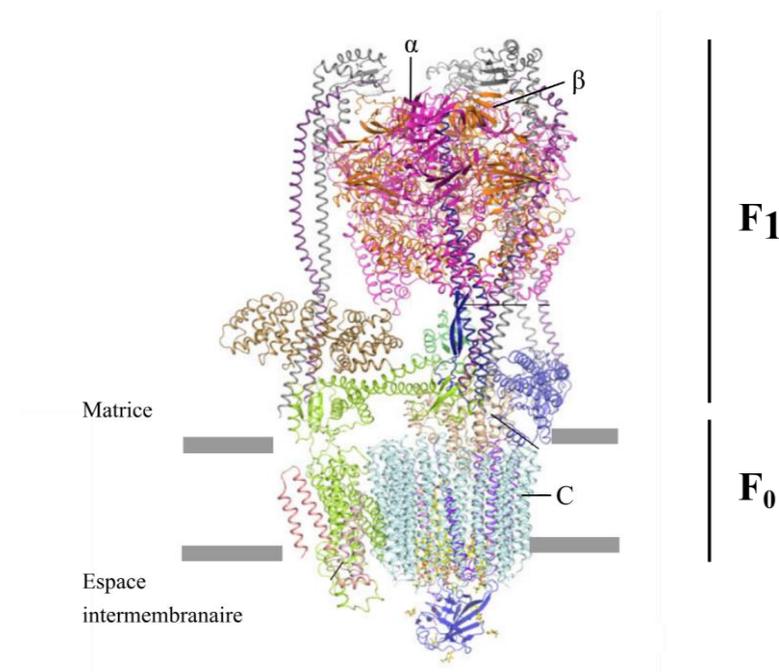


Figure 18. Représentation de la structure de l'ATP synthase de cerveau de *Bos taurus* (Modifiée de Wang *et al.*, 2020).

1.1.2.2.2 Les transporteurs de nucléotide adénylique (ANT) et de phosphate inorganique (PiC).

La translocase ATP/ADP (ANT) est un dimère de 32kDA qui permet la translocation électrogénique de l'ATP⁴⁻ contre l'ADP³⁻. Ce transporteur est inhibé par deux familles d'inhibiteurs que sont les atractylosides et les acides bongkréiques. Il existe différentes isoformes dont l'expression dépend des tissus. La présence de certaines isoformes semblent corrélérer avec les besoins énergétiques des tissus et de leur capacité de génération de l'ATP dans lequel ils sont exprimés (Dörner *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 1997).

Le transporteur de phosphate inorganique (PiC ou SLC25A3) permet l'import électroneutre du phosphate et d'un proton (Krämer, 1996).

1.2 Organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire.

Après avoir présenté l'OXPPOS, je vais me concentrer sur les travaux qui ont abordé la problématique de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire. Depuis la découverte des complexes de la chaîne respiratoire et le développement de la

théorie chimio-osmotique, différents modèles d'organisation de la chaîne respiratoire tentant d'expliquer son fonctionnement ont vu le jour. Notamment, deux modèles majeurs : (1) le modèle dit « liquid state » et (2) le modèle « solid state » (*Figure 19*).

1.2.1 Le modèle « liquid state ».

Le modèle « liquid state » ou de « collision aléatoire », a été le premier modèle admis pour décrire le fonctionnement et l'organisation de la chaîne respiratoire. Il décrit les complexes comme étant indépendants et physiquement dissociés les uns des autres (*Figure 6, Figure 10 et Figure 19*). Le transfert d'électrons entre les complexes étant permis par des collisions stochastiques, entre les transporteurs mobiles d'électrons et les complexes diffusant librement dans la membrane interne mitochondriale. Ce modèle a été grandement étudié et défendu par Pr. HACKENBROOK et ces collaborateurs pendant plusieurs décennies (Chazotte and Hackenbrock, n.d.; Hackenbrock, 1966; Hackenbrock et al., 1986; Sowers and Hackenbrock, 1981).

Ce modèle repose sur plusieurs faits expérimentaux. Premièrement, avant le développement du BN-PAGE, aucune technique ne permettait d'isoler les protéines sans les dénaturer. Les complexes de la chaîne respiratoire étaient donc observés comme étant physiquement indépendants les uns des autres. De plus, des expériences de microscopies à fluorescence ont montré que la diffusion dans la membrane du complexe III et du complexe IV était indépendante l'un de l'autre (Höchli et al., 1985). Cependant, il a été montré plus tard que ces complexes formaient des supercomplexes (SC) (Milenkovic et al., 2017; Schägger and Pfeiffer, 2000). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par la

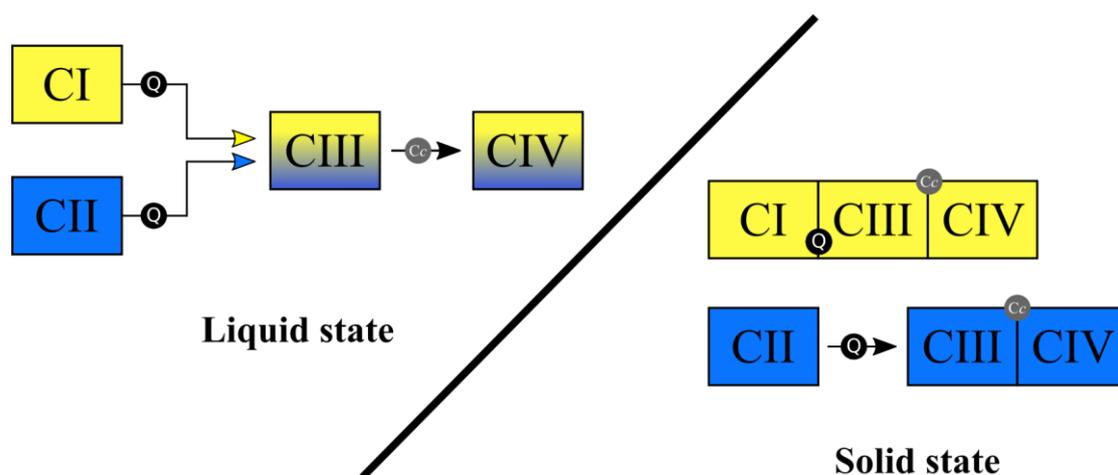


Figure 19. Illustration représentant les deux modèles principaux d'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire.

stratégie utilisée qui s'appuie sur des anticorps fluorescents. En effet, seulement une partie des complexes III et IV sont décrits comme associés en supercomplexes (Milenkovic et al., 2017). Il est probable que Dr. HÖCHLI ait observé les complexes non associés en supercomplexes, les épitopes des complexes organisés en supercomplexes n'étant pas accessibles.

Le deuxième fait expérimental est la diffusion en trois dimensions du cytochrome *c*, traduisant donc de la libre diffusion de cette entité dans l'espace intermembranaire (Hackenbrock, 1966). Cette diffusion implique donc que le cytochrome *c* n'est pas piégé dans une structure supramoléculaire comme peuvent l'être les autres cytochromes de la chaîne respiratoire. Cette observation a été confirmée plus tard par deux autres équipes (Boumans et al., 1998; Trouillard et al., 2011).

Le troisième fait expérimental réside sur la mesure des coefficients de diffusion des entités de la chaîne respiratoire. Ils ont calculé, grâce à des expériences de *photobleaching* (FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching), le coefficient de diffusion dans la membrane interne des différents complexes de la chaîne respiratoire et des transporteurs mobiles d'électrons. Ils ont pu, par la suite, comparer ce coefficient de diffusion à la fréquence maximale théorique de collision entre les partenaires redox nécessaire pour assurer le flux respiratoire (Gupte et al., 1984). Ils ont ainsi conclu que le coefficient de diffusion était largement supérieur à celui nécessaire pour assurer le flux respiratoire dans des conditions de découplage (respiration maximale), et ce pour tous les constituants de la chaîne respiratoire mesurés (Gupte et al., 1984; Hackenbrock et al., 1986). Ils en ont donc déduit qu'une organisation supramoléculaire n'est pas nécessaire pour accéder aux capacités maximales de la chaîne respiratoire. Ils ont également observé que le coefficient de diffusion des entités de la chaîne respiratoire allait être proportionnel à la concentration protéique et à la surface de la membrane interne. Ces deux paramètres, lorsqu'ils augmentent, induisent une diminution du coefficient de diffusion (Hackenbrock et al., 1986; Schneider et al., 1982). Ces résultats sont donc en adéquation avec un modèle de diffusion et de collision aléatoire, entre les complexes et les transporteurs mobiles d'électrons, permettant le transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire.

Ces expériences, bien qu'impressionnantes techniquement, sont à tempérer. En effet, ces observations sont faites sur des liposomes de membranes internes mitochondriales gonflés dans un tampon hypoosmotique jusqu'à obtention d'une vésicule sphérique (Gupte et al., 1984), perdant par conséquent l'architecture caractéristique des mitochondries qui comporte des crêtes et une membrane externe (*Figure 5*). De plus, la technique de gel

natif n'existant pas à l'époque de ces études, la structuration des supercomplexes n'a pas été contrôlée. Il est donc possible que le modèle expérimental affecte l'organisation supramoléculaire et donc que les observations faites décrivent le fonctionnement d'une chaîne respiratoire artificiellement désorganisée.

1.2.2 Le modèle « solid state ».

Ce second modèle décrivant l'organisation et le fonctionnement de la chaîne respiratoire est celui du « solid state ». Il pose l'hypothèse que les complexes de la chaîne respiratoire interagiraient physiquement entre eux et formeraient une organisation supramoléculaire appelée supercomplexe. Ce modèle décrit les complexes comme interagissant physiquement entre eux, permettant de canaliser le transfert des électrons au sein de ces structures (*Figure 19 et Figure 20*) (Chance and Williams, 1955). La canalisation des électrons est le point fondamental de cette théorie. Le principe de canalisation repose sur l'isolement d'intermédiaires réactionnels au sein d'une structure protéique, dans laquelle les sites actifs des enzymes se retrouvent à proximité les uns des autres. La canalisation permettrait de limiter la diffusion des transporteurs mobiles d'électrons, que sont l'ubiquinone et le cytochrome *c*, améliorant la cinétique du transfert électronique au sein de la chaîne respiratoire, permettant de favoriser les électrons provenant d'une voie métabolique plutôt qu'une autre, en diminuant la production de ROS.

Ce modèle est apparu bien avant que l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire ne soit découverte, mais en l'absence de technique permettant d'observer ces supercomplexes, le modèle « liquid state » fut donc celui accepté pendant près de trois décennies. Le modèle « solid state » a été très solidement conforté expérimentalement par le développement des électrophorèses non dénaturantes au début des années 2000.

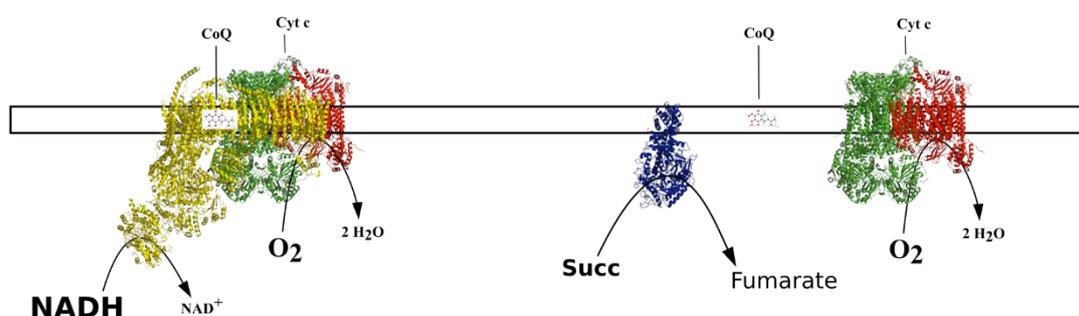


Figure 20. Représentation de l'organisation supramoléculaire des complexes I et II de la chaîne respiratoire de mammifère d'après le modèle « solid state ».

Cette technique s'appuie sur la solubilisation non dénaturante des protéines membranaires à l'aide de détergents non ioniques, comme la digitonine par exemple (Schägger and Pfeiffer, 2000). Cette stratégie permet de solubiliser les complexes protéiques membranaires en conservant leur structures tertiaires, quaternaires et certaines interactions entre protéines permettant l'analyse de ces structures par électrophorèse, cristallographie, microscopie électronique et même spectrométrie de masse (Gu et al., 2016; Lapuente-Brun et al., 2013; Letts et al., 2016; Schagger, 2000; Wu et al., 2016). Ces expériences réalisées dans différents organismes modèles, ont permis d'observer que les complexes de la chaîne respiratoire pouvaient s'associer et former différents types de supercomplexes, entre les complexes III et IV chez *S. cerevisiae*, ou entre les complexes I, III et IV chez les mammifères (**Figure 20**), la levure *Yarrowia lipolytica*, chez certaines plantes comme *l'Asparagus officinalis* (Davies et al., 2018; Milenkovic et al., 2017; Schägger and Pfeiffer, 2000), ou chez certaines bactéries et archées (Berry and Trumpower, 1985; Kaila and Wikström, 2021; Magalon et al., 2012).

Une multitude de supercomplexes existent dans lesquels les complexes impliqués peuvent varier et avoir différentes associations, comme par exemple les complexes I-III-IV, III-IV, I-III (**Figure 21**). La stœchiométrie des complexes présente dans les supercomplexes peut également être modulée (Bultema et al., 2009; Wittig and Schägger, 2005). Le respirasome, par exemple, se compose d'un monomère de complexe I et de complexe IV et d'un dimère de complexe III, mais il existe également des supercomplexes ayant une stœchiométrie de type $I_{1-2}-III_2-IV_{2-n}$ voire supérieure appelés mégacomplexes (**Figure 21**) (Böttinger et al., 2012; Bultema et al., 2009; Lobo-Jarne et al., 2018).

L'existence de ces supercomplexes a été confirmée notamment par des expériences de cristallographie, de microscopie électronique, ou de spectrométrie de masse couplée à une stratégie de cross linking des protéines et de gel natif pour séparer les supercomplexes (Davies et al., 2011; Gu et al., 2016; Letts et al., 2019, 2016; Liu et al., 2018). De plus, depuis une dizaine d'années, l'apparition de modèles génétiquement modifiés permet de moduler l'organisation supramoléculaire des supercomplexes, donnant des arguments en faveur de leurs possibles existences *in vivo* (Hock et al., 2020; Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014a; Timón-Gómez et al., 2020). Cependant, l'importance physiologique et fonctionnelle de ces structures est sujette à d'intenses débats au sein de la communauté scientifique.

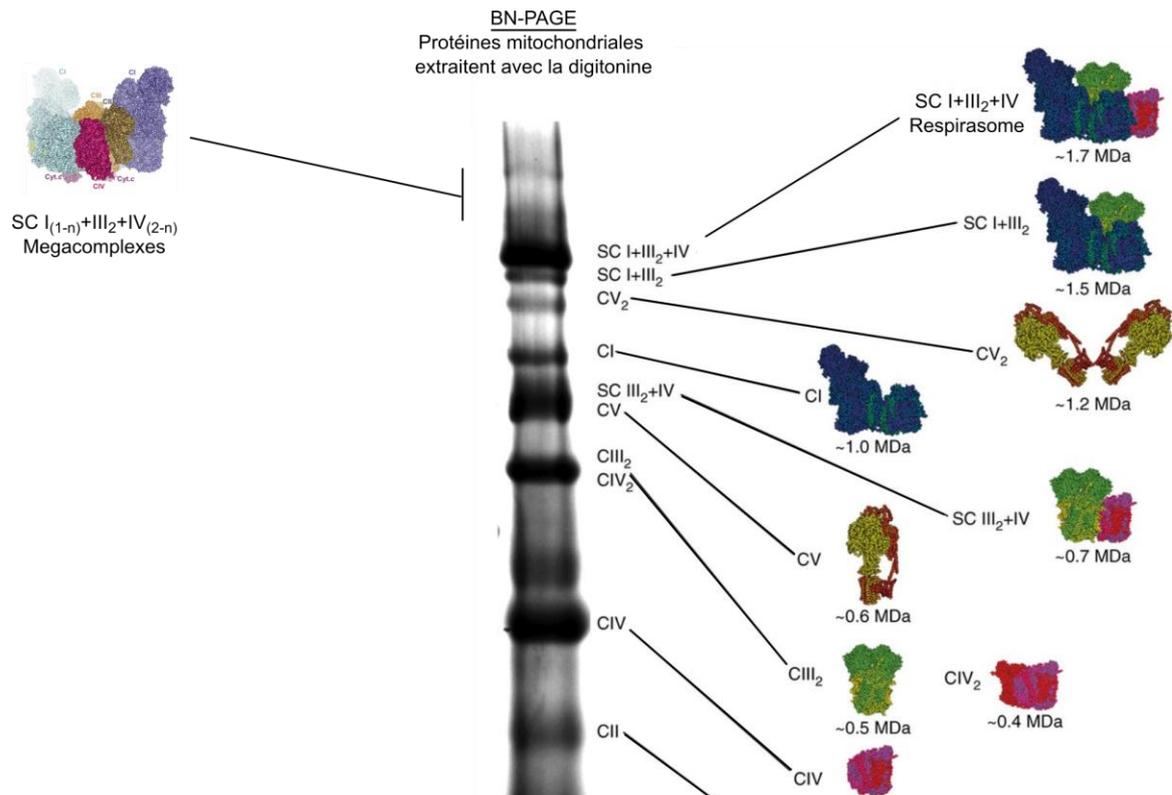


Figure 21. Illustration des différents types d'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire de mammifère séparés à l'aide d'un BN-Page (Modifiée à partir de Letts and Sazanov, 2017).

Actuellement, c'est ce modèle qui prédomine dans la littérature pour expliquer le fonctionnement de la chaîne respiratoire, notamment car le complexe I est associé en supercomplexe et pas le complexe II (*Figure 20*). C'est notamment pour cette raison que, durant ma thèse, je me suis basé sur ce modèle pour comprendre et étudier le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

1.2.3 L'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire : les supercomplexes.

Par définition les supercomplexes sont des entités supramoléculaires constituées par au moins deux complexes de la chaîne respiratoire (I-III, I-IV ou III-IV). Différents laboratoires ont notamment pu estimer que 85% à 100% du complexe I étaient associés en supercomplexes, 55% à 65% pour le complexe III et 15%–25% pour le complexe IV suivant les modèles (Greggio et al., 2017; Milenkovic et al., 2017; Molinié et al., 2022; Schägger and Pfeiffer, 2001). Le complexe II, quant à lui, n'est trouvé associé en supercomplexe que dans un seul article (Acín-Pérez et al., 2008), mais la communauté scientifique s'accorde à dire que la proportion de complexe II retrouvé associée est très

marginale voire même inexistante (*Figure 20*) (Greggio et al., 2017; Kovářová et al., 2013; Liu et al., 2018; Milenkovic et al., 2017; Molinié et al., 2022; Schägger and Pfeiffer, 2001, 2000). Il existe de nombreuses associations de supercomplexes : I-III ; III-IV ou I-III-IV, qui sont décrites comme pouvant comporter différentes stœchiométries entre les complexes comme par exemple : I-III₂-IV, I-III₂-IV₂, I₂-III₂-IV₂ (*Figure 20*) (Bultema et al., 2009; Guo et al., 2017; Letts et al., 2019; Letts and Sazanov, 2017; Wu et al., 2016).

Dans la prochaine partie, je vais m'attacher à décrire la structure du respirasome, récemment résolue (Gu et al., 2016; Guo et al., 2017; Wu et al., 2016), et discuter le(s) rôle(s) que pourraient avoir cette organisation supramoléculaire sur la chaîne respiratoire (*Figure 22*). Le respirasome se compose des complexes I, III et IV, il est nommé ainsi car il peut transférer les électrons du donneur NADH à l'accepteur final, l'oxygène (Acín-Pérez et al., 2008).

1.2.3.1 Structuration et orientation des complexes.

Le respirasome, qui est un supercomplexe de plusieurs mégadaltons, a été cristallisé et observé par cryo-microscopie électronique chez le mammifère par de nombreuses équipes (Dudkina et al., 2010; Gu et al., 2016; Letts et al., 2016; Vercellino and Sazanov, 2021; Wu et al., 2016). La complexité pour modéliser cette structure engendre des questions sur la pertinence des modèles générés, notamment en terme de préparation des échantillons, et de sélection des cartes de densités récoltées durant la génération des structures. Les interfaces d'interaction entre complexes semblent faire consensus (Gu et al., 2016; Letts et al., 2019, 2016; Wu et al., 2016). Cependant, des points de discordes subsistent notamment sur la présence ou l'absence de certaines sous-unités, de leur localisation dans les supercomplexes, sur la distance ou l'angle que peuvent avoir les complexes entre eux.

Le respirasome se compose au moins d'un complexe I, d'un dimère de complexe III et d'au moins un complexe IV, ces deux derniers complexes s'organisent autour de la partie membranaire du complexe I (*Figure 22*). Par ailleurs, à ce jour, le complexe I est la seule ubiquinone oxydoréductase qui est décrite comme associée en supercomplexes dans le mammifère (Liu et al., 2018; Milenkovic et al., 2017). Le dimère de complexe III se trouve à proximité de la partie concave du complexe I, proche de la poche de réduction de l'ubiquinone du complexe I (environ à 10nm) (Hirst, 2018). Le complexe IV se situant au niveau de la zone distale de la partie membranaire du complexe I à proximité du complexe III₂ (*Figure 22*). Les différentes structures décrivent que le complexe III₂ est orienté dans

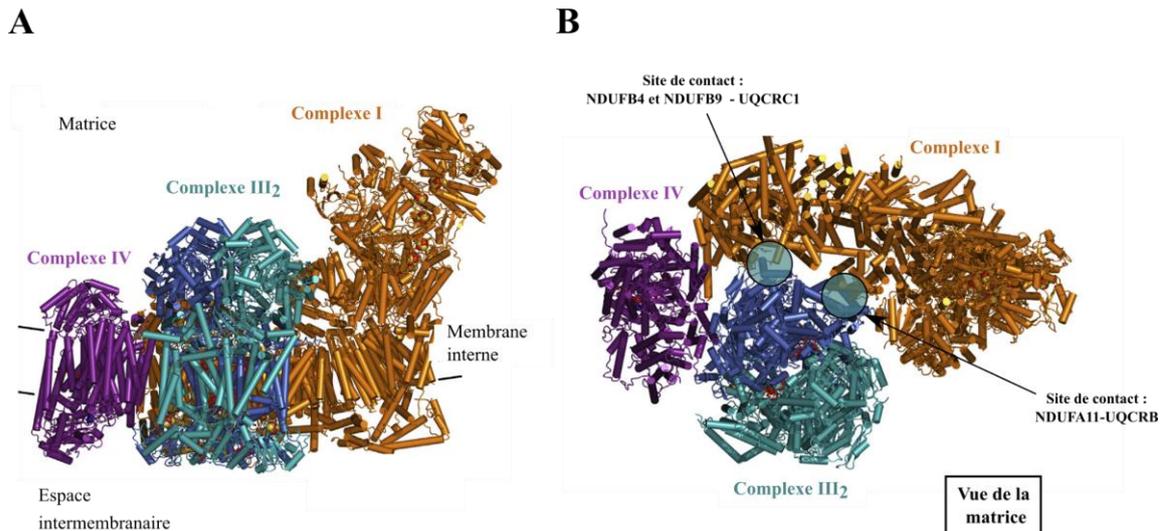


Figure 22. Représentation de la structure du respirasome de coeur de *Sus scrofa* (Modifiée de Milenkovic *et al.*, 2017).

Arrangement du complexe I (en orange), du dimère de complexe III₂ (les monomères sont représentés en bleu foncé et en cyan), et du complexe IV (en violet) au sein du respirasome observé par rapport (A) au plan de la membrane ou (B) de la matrice mitochondriale.

les supercomplexes, un monomère du dimère de complexe III interagit physiquement avec le côté proximal du complexe I. A l'heure actuelle, il est décrit qu'il existe deux sites de contact ou de proximité entre le complexe I et le complexe III₂. Le premier site de contact est intramembranaire à l'interface entre NDUF11 et les protéines UQCRB et UQCRQ du protomère de complexe III adjacent au complexe I (*Figure 22*). Le deuxième site de contact est situé dans la matrice entre NDUFB4 et NDUFB9 du complexe I et UQCRC1 du complexe III (4 Å de distance) (Letts *et al.*, 2019, 2016; Sousa *et al.*, n.d.; Wu *et al.*, 2016). Ces observations semblent être supportées par la cristallisation du SC I-III₂ qui montre une structure similaire à la partie I-III₂ du respirasome (Letts *et al.*, 2019). Cependant, aucun partenaire protéique communément accepté comme permettant de moduler la formation des respirasomes n'a, à l'heure actuelle, été découvert.

L'organisation en supercomplexe semble révéler une certaine proximité et une bonne orientation des différents sites actifs les uns par rapport aux autres (*Figure 23*), ce qui pourrait être en adéquation avec l'idée d'une possible canalisation des transporteurs mobiles. Il semble clair, également, que l'organisation du respirasome montre une asymétrie du dimère de complexe III. Un seul des deux monomères possèdent ses sites actifs à proximité du complexe I et du complexe IV (*Figure 23*). Il est décrit que la distance entre le site actif du complexe I et du complexe III le plus proche est d'environ 100 Å, et

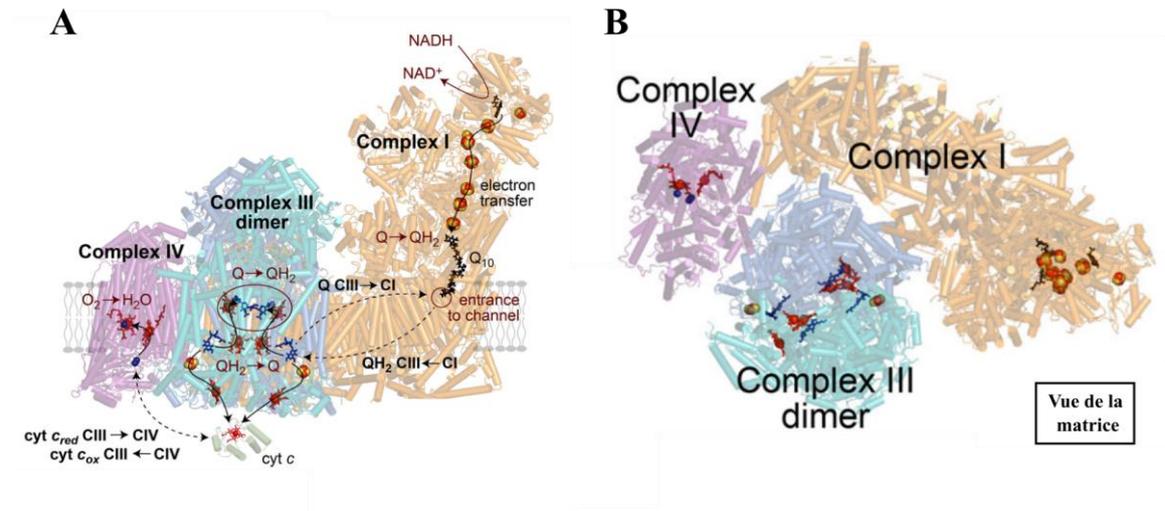


Figure 23. Illustration du chemin électronique au sein du respirasome (Modifiée de Hirst, 2018).

la distance entre le cite actif du complexe III le plus proche et complexe I est de 43,5 à 84,5 Å (Hirst, 2018; Letts et al., 2016; Vercellino and Sazanov, 2021). Certains chercheurs émettent l'hypothèse que ce complexe est le seul monomère de complexe III actif du dimère (Castellani et al., 2010; Letts et al., 2019; Sousa et al., n.d.). Cette organisation permettrait de favoriser les électrons provenant du complexe I par rapport aux électrons provenant des autres ubiquinones oxydoréductases non associées en supercomplexes, comme le complexe II par exemple.

Cependant, ces spéculations s'appuient sur des observations structurales et ne reposent sur aucune donnée fonctionnelle chez le mammifère. Pr. KUHLBRANDT et son équipe ont généré la structure du respirasome à une faible résolution. Dans cette structure, ils ont observé qu'un seul des deux centres fer-soufre des protéines RIESKE (ou UQCRFS1) du dimère de complexe III a pu être résolu à plus haute résolution. Ils en ont déduit que la résolution de ce centres fer-soufre était lié à son immobilité, cette dernière traduisant d'une incapacité à transférer les électrons jusqu'au cytochrome *cI* et donc de l'inactivité d'un des deux monomères de complexe III (Sousa et al., n.d.). D'autres travaux, chez *Paracoccus denitrificans* cette fois, décrivent qu'un seul des deux monomères était nécessaire pour transférer les électrons dans le complexe III de cette bactérie (Castellani et al., 2010; Covian et al., 2007). Cependant, plusieurs informations doivent tempérer cette analyse. La première est que les complexes de la chaîne respiratoire de *Paracoccus denitrificans* ont une composition très différente de celle de mammifère, notamment au niveau du nombre de sous-unités du complexe I (14 pour *P. denitrificans*, 46 pour *B.*

Taurus), du complexe III (3 pour *P. denitrificans*, 11 pour *B. Taurus*), et du complexes IV (4 pour *P. denitrificans*, 13 pour *B. Taurus*). La deuxième étant que, bien que la chaîne respiratoire de cette bactérie s'organise également en supercomplexe, la stœchiométrie des respirasomes est différente de celle observée chez le mammifère (I-III₄-IV₄ versus I-III₂-IV chez le mammifère) (Stroh et al., 2004). De plus, ces observations sont faites sur des complexes III isolés et non pas sur des complexes III associés en supercomplexes. Par conséquent, l'hypothèse soutenant l'asymétrie fonctionnelle des complexes III₂ au sein des supercomplexes reste extrêmement fragile, cependant l'orientation du complexe III₂ dans les supercomplexes pose question.

La position des interfaces d'interaction entre complexe I et complexe III au sein des supercomplexes semble conservé au cours de l'évolution (Davies et al., 2018; Milenkovic et al., 2017), *a contrario* les zones d'interactions entre les complexes I et IV et les complexes III et IV semblent être multiples et beaucoup plus variables selon les structures, et les organismes étudiés (Davies et al., 2018; Gu et al., 2016; Letts et al., 2016; Milenkovic et al., 2017; Vercellino and Sazanov, 2021) (*Figure 24 A*). L'hypothèse a été émise que le respirasome pourrait avoir plusieurs conformations dans laquelle le complexe I et complexe IV sont plus ou moins proches (*Figure 24 B*). Il a été supposé que la présence de la protéine COX7A/COX7A2L pourraient jouer un rôle dans la structuration des supercomplexes et dans la conformation de ceux-ci (Milenkovic et al., 2017). Cependant, la cryo microscopie électronique, utilisée pour générer les structures, possède plusieurs biais liés à la solubilisation des protéines qui peuvent déstabiliser les structures (Letts et al., 2019; Schägger and Pfeiffer, 2001), mais également liés au pourcentage de cartes de densités exclues afin de générer les structures. En effet, les quatre premières structures du respirasome présentent une grande hétérogénéité dans l'exclusion des cartes de densités, indiquant une grande disparité entre les approches et pouvant expliquer les différences entre les structures, et l'éloignement entre les complexes I et IV. L'interaction entre le complexe III et le complexe IV est l'un des points de débat majeur dans la littérature, notamment à cause de la protéine COX7A2L. Cette protéine est décrite comme se trouvant à la jonction entre complexe III et complexe IV et permettant leurs interactions. Il semblerait que son absence affecte le maintien de certains supercomplexes. Le débat sur le rôle de cette protéine sera plus développé dans la *partie Article 1*. Néanmoins, la position du complexe I par rapport au complexe III semble être conservée dans les différentes structures des respirasomes (*Figure 24 B*).

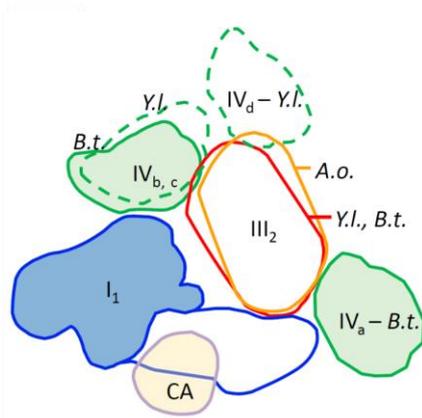
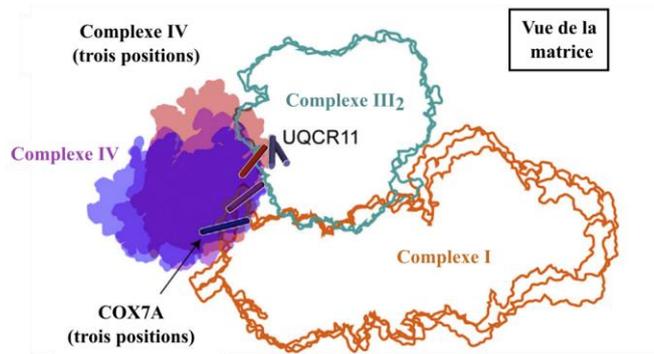
A**B**

Figure 24. Illustration représentant les différentes positions des complexes les uns par rapport aux autres dans les supercomplexes (Modifiée de Davies *et al.*, 2018 et Milenkovic *et al.*, 2017).

(A) Arrangement des complexes I, III et IV au sein des respirasomes suivant différents organismes : *Yarrowia lipolytica* (Y.I.), *Asparagus officinalis* (A.o.), et *Bos taurus* (B.t). (B) Arrangement des complexes I, III et IV au sein des respirasomes dans différentes structures, qui révèle différentes positions du complexe IV par rapport au complexe I.

1.2.3.2 Facteurs d'assemblages/intérractions entre les complexes de la chaîne respiratoire dans les supercomplexes.

L'étude des fonctions des supercomplexes nécessite des modèles dans lequel l'organisation de ces derniers est remodelée. L'étude des facteurs d'assemblage permettant la formation ou le maintien des supercomplexes est en plein essor. Deux types de facteurs d'assemblage sont étudiés (1) les protéiques et (2) les lipidiques.

1.2.3.2.1 Le rôle des protéines dans la formation des supercomplexes.

Des structures à faible résolution ont suggéré que les sous-unités cytochrome *b*, RIESKE et UQCR11 du complexe III pouvaient respectivement interagir avec COX3, COX6A and COX7A du complexe IV (Dudkina *et al.*, 2010). Des structures plus récentes et réalisées à plus haute résolution confirment une proximité entre COX7A et UQCR11 (environ 10–30 Å) mais ne montrent pas d'interaction directe entre ces protéines (Gu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Les auteurs de ces structures émettent l'hypothèse que l'interaction ou la proximité entre les complexes III et IV seraient d'avantage médiées par les lipides plutôt que par des protéines (Gu *et al.*, 2016; Hartley *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2016). Cependant, d'autres études montrent que la famille des protéines COX7A pourraient avoir un rôle sur l'organisation des supercomplexes. En effet, il a été déterminé que COX7A2L

était présent dans les supercomplexes III₂-IV et I-III₂-IV mais pas dans les complexes isolés III et IV (Lapiente-Brun et al., 2013). Il a été proposé que cette protéine était un facteur d'assemblage des SC III₂-IV et des respirasomes, mais la stratégie, les résultats et les conclusions de ce travail sont vivement remises en cause dans la littérature (Fedor and Hirst, 2018; Mourier et al., 2014a; Pérez-Pérez et al., 2016). Ce débat sera développé dans l'introduction de l'*Article 1*. de ma thèse.

D'autres protéines sont également décrites comme pouvant modifier l'organisation des supercomplexes telles que : HIGD1A et HIGD2A, MR/1S ou C11ORF83 (Chen et al., 2012; Desmurs et al., 2015; Hock et al., 2020; Timón-Gómez et al., 2020). Les deux premières protéines sont des orthologues de facteurs d'assemblage Rcf1 et Rcf2 décrits chez la levure. Ils sont connus pour moduler l'assemblage du SC III₂-IV chez *S. cerevisiae* (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012). Il a été décrit que Rcf1, chez la levure, ou HIGD2A, chez le mammifère, affectaient, légèrement, l'enrichissement en supercomplexes (Chen et al., 2012; Hock et al., 2020; Timón-Gómez et al., 2020), mais les mutants de levures ou les modèles de *Knockdown* ou *Knockout* (KO) utilisés sur mammifères montrent que ces modèles peuvent toujours former des respirasomes. Des travaux plus récents montrent que la perte de HIGD1A et HIGD2A diminue l'accumulation et altère la stœchiométrie des supercomplexes mais que cet impact serait causé par la diminution du niveau de complexe IV (Hock et al., 2020; Timón-Gómez et al., 2020). Ainsi, HIGD1A et HIGD2A affecteraient les supercomplexes en agissant, non pas sur leur assemblage, mais sur l'assemblage du complexe IV (Hock et al., 2020; Timón-Gómez et al., 2020).

La protéine C11ORF83 (ou UQCC3A), qui est une protéine de la membrane interne mitochondriale, a été décrite comme permettant le remodelage des SC III₂-IV et semblerait également être impliquée dans les premières étapes de l'assemblage du complexe III (Desmurs et al., 2015; Feichtinger et al., 2017; Tucker et al., 2013). Peu de choses sont connues sur cette protéine, il semblerait qu'elle interagisse avec le complexe III. Un défaut dans cette protéine entraîne une diminution de la quantité de complexe III et SC III₂-IV, un défaut respiratoire, une altération des crêtes mitochondriales et un changement de la longueur des acides gras présents dans les cardiolipides de la membrane interne (Desmurs et al., 2015). Cependant, ces travaux montrent, là encore, que les supercomplexes peuvent se former et qu'aucun enrichissement d'autres supercomplexes ou de complexes isolés n'est observé, par conséquent ce n'est, là encore, pas un réel remodelage des supercomplexes (Desmurs et al., 2015).

Ces résultats démontrent que l'existence de facteurs protéiques intervenant spécifiquement dans l'assemblage des supercomplexes reste extrêmement débattu. Il existe peu de modèles fiables possédant une réorganisation claire des supercomplexes, sans affecter la quantité de complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, à l'heure actuelle, aucun modèle génétique consensus ne permet d'élucider l'importance fonctionnelle de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire.

1.2.3.2.2 Le rôle des lipides dans la formation des supercomplexes.

Actuellement, il existe de réelles questions sur l'existence de facteurs d'assemblage ou de stabilisation des supercomplexes. L'un des modèles permettant d'observer un désassemblage des supercomplexes repose sur les modèles comportant une déficience en cardiolipides. Ce phospholipide anionique est très majoritairement présent dans la membrane interne mitochondriale (10-15% des lipides totaux) (Horvath and Daum, 2013). Les déficiences en cardiolipides affectent l'organisation des supercomplexes chez la levure et chez le mammifère (Dudek et al., 2013; Letts et al., 2019; Paradies et al., 2014; Pfeiffer et al., 2003; Rigoulet et al., 2010). Les cardiolipides sont nécessaires pour le fonctionnement des complexes I, II, III et IV isolés (Dudek et al., 2016; Fry and Green, 1981; Pfeiffer et al., 2003; Schwall et al., 2012), mais également pour la formation des supercomplexes (Letts et al., 2019; Pfeiffer et al., 2003) et sont cruciaux pour stabiliser les supercomplexes aux seins de liposomes, notamment pour les expériences de cristallographie (Bazán et al., 2013; Letts et al., 2019; Mileykovskaya and Dowhan, 2014; Pfeiffer et al., 2003; Zhang et al., 2005). Lors des expériences de BN-PAGE, le type de détergents et la concentration utilisée influencent grandement les interactions entre complexes de la chaîne respiratoire (Pfeiffer et al., 2003; Schagger, 2000; Schagger and Pfeiffer, 2001). En effet, l'utilisation de détergents comme la digitonine permet la séparation de supercomplexes, alors que le dodécyl-maltoside induit une dissociation des supercomplexes, dénotant une fois de plus du lien entre lipide et organisation supramoléculaire. Par ailleurs, ce lien entre cardiolipides et supercomplexes a été décrit comme ne pouvant être compensé par d'autres phospholipides de la membrane interne mitochondriale (Böttlinger et al., 2012). Chez la levure, seuls les complexes III et IV sont associés en supercomplexe. L'absence de cardiolipides induit une dissociation de ce supercomplexe mais n'affecte pas massivement le flux respiratoire, alors qu'une légère diminution de la quantité des complexes III et IV est observée (Gohil et al., 2004; Pfeiffer

et al., 2003; Rigoulet et al., 2010). Cette expérience, sur un système biologique intégré, montre que, sur levure, le transfert d'électrons et l'association en SC III₂-IV ne semble pas être limitant dans le système. Les cardiolipides sont donc essentielles pour le bon fonctionnement des enzymes et l'association en supercomplexe *in vitro* mais ne semble pas jouer de rôle physiologique majeur.

1.2.3.3 Quel est le rôle des supercomplexes ?

1.2.3.3.1 Les transporteurs mobiles d'électrons sont-ils canalisés au sein des supercomplexes ?

L'un des points essentiels définissant le modèle « solid state » est le rôle des supercomplexes dans la canalisation des électrons. Elle permettrait l'amélioration des propriétés cinétiques du système par un processus de canalisation des substrats (transporteurs mobiles d'électrons ici). La canalisation de substrats sous-entend l'existence de différents pools de transporteurs mobiles, ceux séquestrés dans les supercomplexes et ceux diffusant librement dans la membrane.

1.2.3.3.1.1 La canalisation de l'ubiquinone.

Entre les complexes I et III, seule l'ubiquinone intervient et il existe un vrai débat sur la présence de différents pools d'ubiquinones. De nombreuses structures décrivent la présence d'ubiquinones co-isolées avec les supercomplexes (Letts et al., 2016). Cependant, comme avancé par Dr. LETTS et Pr. SAZANOV, la très grande hydrophobicité de l'ubiquinone peut expliquer la présence de ces dernières dans la structure (Letts et al., 2019). D'après leur hypothèse, l'extraction-purification des protéines étant en phase aqueuse, une partie des ubiquinones resteraient piégées dans ces structures du fait de leur grande hydrophobicité. De plus, les différentes structures indiquent qu'aucune protéine ne permet la séquestration physique des ubiquinones au sein des supercomplexes, et donc ne permet la dissociation physique et le maintien de deux pools distincts d'ubiquinones (Gu et al., 2016; Letts et al., 2019, 2016; Sousa et al., n.d.; Wu et al., 2016).

De nombreuses études fonctionnelles ont été réalisées pour déterminer si un phénomène de canalisation pouvait être mis en place. Les premières ont été faites en 1973 par Pr. KRÖGER et Pr. KLINGENBERG. Ils ont pu déterminer que, sur leurs préparations de particules submitochondriales, la réduction du pool d'ubiquinones est cinétiquement homogène et ne dépend pas du substrat respiratoire utilisé (NADH ou Succinate) (KrÖGER and Klingenberg, 1973). A l'époque, aucune technique ne permettait d'observer

l'architecture des supercomplexes et donc de vérifier si elle n'était pas altérée par le protocole expérimental. Des études plus récentes menées par Dr. HIRST et ses collègues ont montré que, sur membrane mitochondriale et particules submitochondriales, l'ubiquinone se comporte comme un pool homogène et disponible pour les complexes I et II (Blaza et al., 2014). Pour confirmer cela, ils ont dans une seconde étude, introduit la protéine AOX (Alternative Oxidase de *Trypanosoma brucei brucei*) qui est une ubiquinone-oxygène oxydoréductase. Les auteurs, par cette stratégie, introduisent une compétition à l'oxydation de l'ubiquinone entre le complexe III associé en supercomplexes et l'AOX (*Figure 25*) (Fedor and Hirst, 2018). Ils ont observé que le flux respiratoire lié à la réoxydation de l'ubiquinone dépendant du complexe I, dont 85%-100% sont associés en supercomplexes avec le complexe III, était plus rapide avec l'AOX qu'avec le complexe III (Fedor and Hirst, 2018). Ce résultat met en évidence que les ubiquinones peuvent diffuser librement à l'extérieur des supercomplexes et qu'elles ne sont pas limitantes dans le flux respiratoire. Au cours de cette étude, ils ont également démontré sur mitochondries isolées de tissus que l'AOX n'a qu'un impact minimal sur la respiration. Par conséquent, dans ces conditions également, l'ubiquinone n'est pas limitante pour l'activité de la chaîne respiratoire (El-Khoury et al., 2013; Fedor and Hirst, 2018). Un autre laboratoire utilisant une stratégie similaire basé sur l'AOX ne confirme pas ces résultats (Calvo et al., 2020). Néanmoins, il a été décrit que lors du phénomène d'ischémie-reperfusion des ROS, provenant de l'oxydation du succinate, sont produits par le complexe I (Chouchani et al., 2014; Quinlan et al., 2013, 2012). Ce phénomène décrit qu'un libre échange des ubiquinones, entre le complexe I associé en supercomplexe et le complexe II non associé, peut être mise en place.

L'ensemble de ces données montrent que l'ubiquinone se comporte comme un pool homogène qui est partagé par les différentes ubiquinone oxydoréductases, mais également que le phénomène de canalisation n'est pas nécessaire pour avoir un flux respiratoires maximal. Ces expériences confirment les observations sur liposomes faites par Pr. HACKENBROOK (Hackenbrock et al., 1986).

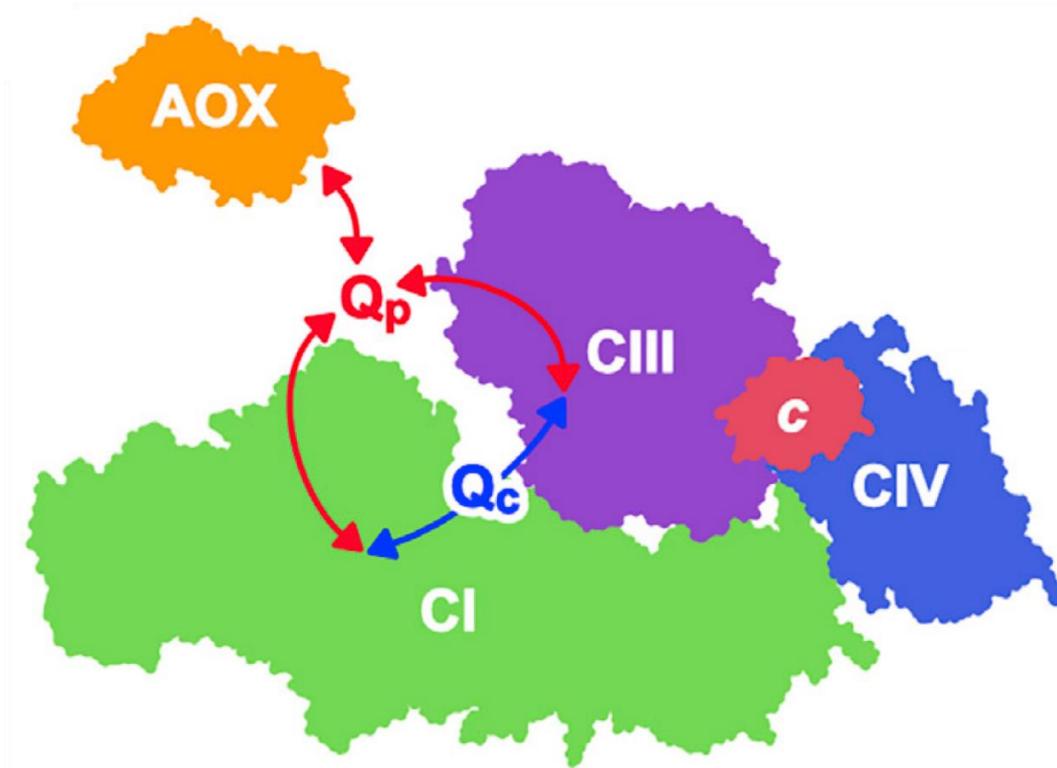


Figure 25. Illustration représentant l'étude de la canalisation de l'ubiquinone par compétition avec l'AOX (Modifiée de Fedor *et al.*, 2018.).

Modèle représentant les différentes voies de transfert d'électrons pouvant être empruntées par l'ubiquinone : le transfert d'électrons réalisé par l'ubiquinone canalisée (Q_c , en bleu) et le transfert d'électrons par une population non canalisée de l'ubiquinone (Q_p , en rouge), partagés entre les différentes ubiquinone oxydases (complexe III ou AOX).

1.2.3.3.1.2 La canalisation du cytochrome *c*

Des travaux ont permis d'étudier la canalisation du cytochrome *c*, deuxième transporteur mobile d'électrons entre les complexes III et IV sur *S. cerevisiae* (Boumans et al., 1998; Trouillard et al., 2011). Cette levure possède des supercomplexes composés de complexes III et IV, comme chez le mammifère, dans lequel le cytochrome *c* pourrait être canalisé. Des études sur mitochondries isolées et sur cellules entières montrent qu'en utilisant des souches de levures dans lesquels les crêtes mitochondriales ou les supercomplexes étaient altérés (Trouillard et al., 2011), le cytochrome *c* se comportait comme un pool homogène et unique et aucune canalisation de ce dernier n'a pu être mise en évidence (Boumans et al., 1998; Gupte et al., 1984). Ces expériences viennent s'ajouter aux observations faites par le Pr. HACKENBROOK qui décrivent que le cytochrome *c*

diffuse dans trois dimensions, observation qui ne peut être adéquat avec un modèle de canalisation de ce dernier au sein des supercomplexes (Hackenbrock et al., 1986).

La multitude de travaux réalisés sur l'étude de la structure, ainsi que sur la fonctionnalité de ces supercomplexes semble montrer qu'il n'y a pas de canalisation des transporteurs mobiles d'électrons au sein de la chaîne respiratoire.

1.2.3.3.2 Les supercomplexes permettent-ils l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire ?

Les complexes de la chaîne respiratoire semblant être organisés autour de la partie membranaire du complexe I, certains groupes de recherche ont émis l'hypothèse que la structuration des supercomplexes pouvait jouer un rôle dans l'assemblage et la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire. Actuellement, il existe plusieurs modèles d'assemblage des respirasomes. Le premier décrit que les complexes sont formés dans leur

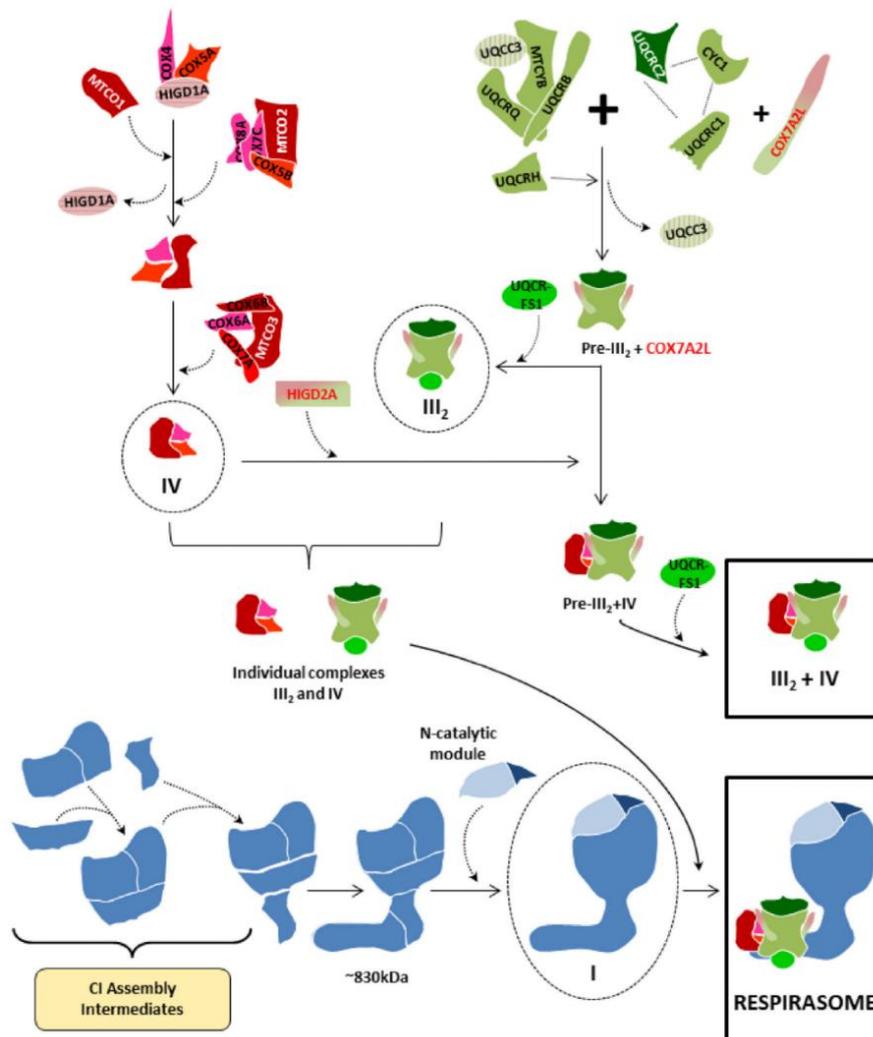


Figure 26. Illustration de la biogenèse du respirasome par les holo-complexes de la chaîne respiratoire (Modifiée de Lobo-Jarnes *et al.*, 2019).

intégralité et indépendamment les uns des autres, pour être ensuite associé en supercomplexe (*Figure 26*) (Acín-Pérez et al., 2008; Moreno-Lastres et al., 2012).

Un autre modèle décrit que des pré-complexes se forment, puis s'associent en supercomplexes permettant la maturation de ces complexes une fois qu'ils sont associés (*Figure 27*) (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018). Il existe plusieurs modèles pour décrire ces associations. Le premier décrit qu'un pré-complexe I se forme et les holo-complexes III et IV viennent s'associer, permettant l'ajout du module N du complexe I. Un autre modèle décrit qu'un pré-complexe I se forme et des sous unités et des sous complexes de complexes III et IV viennent interagir avec ce pré-complexe I pour permettre leur assemblage, finissant

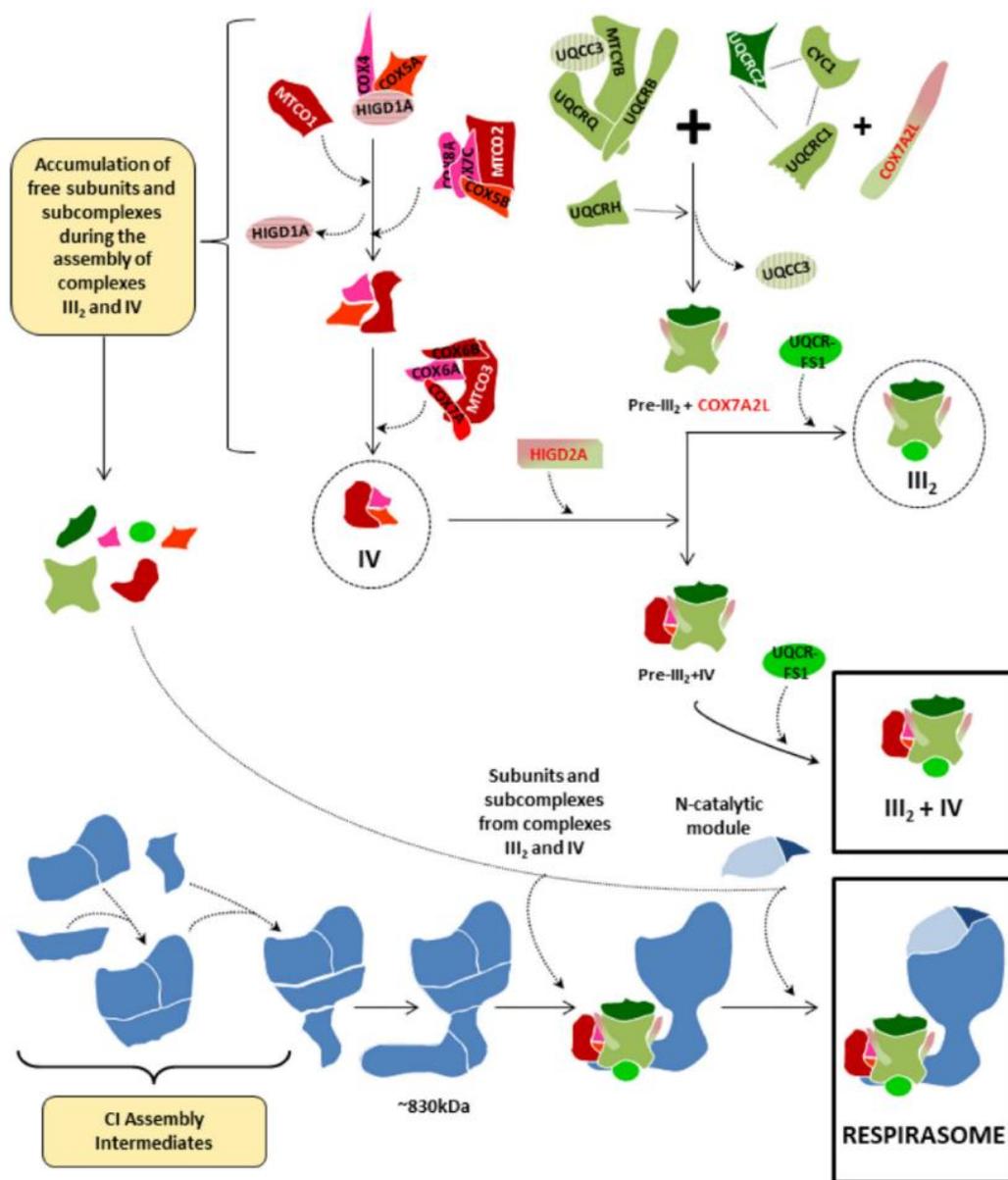


Figure 27. Illustration de la biogénèse du respirasome par les complexes partiellement associés de la chaîne respiratoire (Modifiée de Lobo-Jarnes *et al.*, 2019).

là encore par l'ajout du module N du complexe I (Fang et al., 2021; Fernández-Vizarra and Zeviani, 2015; Guerrero-Castillo et al., 2017; Lobo-Jarne and Ugalde, 2018; Moreno-Lastres et al., 2012).

Il a été montré que la perte du dimère de complexe III, mais également du complexe IV entraînent une déstabilisation du complexe I et une perte de ce module N, induisant l'apparition d'un sous-assemblage de ce dernier dont l'activité est altérée (Moreno-Lastres et al., 2012; Protasoni et al., 2020; Schägger et al., 2004). Cependant, une forte diminution du complexe I n'induit pas de défaut fonctionnel des complexes III ou IV (Schägger et al., 2004). Ces observations ont été très récemment confirmées, une équipe a pu déterminer que seulement une partie du module P_D du bras membranaire du complexe I était nécessaire pour la formation des « respirasomes » contenant cette sous-unité et les complexes III et IV (*Figure 7*) (Fang et al., 2021). De plus, ils ont pu observer qu'aucune sous-unité des complexes III et IV ne co-migrait avec le module P_D. Ceci suggère que les complexes III et IV s'assemblent en supercomplexe sous la forme holo-complexe, pour s'associer ensuite au complexe I (Fuhrmann et al., 2018; Heide et al., 2012). De plus, l'enrichissement des complexes III et IV ne semble pas affecté dans ce modèle. Ces observations semblent donc confirmer le premier modèle décrit plus haut (*Figure 26*), dans lequel les holo-enzymes s'assemblent totalement avant de se structurer en supercomplexe.

Les modèles décrivant des sous assemblages et des altérations fonctionnelles du complexe I sont des modèles possédant des altérations sévères des complexes III et IV (Moreno-Lastres et al., 2012; Protasoni et al., 2020). Ces observations ne sont pas confirmées dans la plupart des modèles de patient présentant un défaut des complexes III ou IV, défaut qui est moins sévère que dans les modèles qui ont permis d'observer ces sous-assemblages (Fernández-Vizarra and Zeviani, 2015; Rak et al., 2016). De plus, les défauts drastiques de complexes III et IV sont souvent liés à un défaut bioénergétique massif. L'import des protéines codées par le génome nucléaire étant dépendant de l'ATP et du $\Delta\Psi$ (Harbauer et al., 2014), les sous-assemblages et la diminution du niveau des complexes observés pourraient résulter des défauts bioénergétiques affectant l'import et l'assemblage des protéines, et ainsi ne pas être la conséquence directe des défauts d'assemblage des supercomplexes.

Les modèles décrivant l'importance des supercomplexes dans la maturation et l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire reste assez fragile compte tenu de l'effet pléiotropique observé lors de la perte de ces hypothétiques facteurs d'assemblages ou des complexes de la chaîne respiratoire. La frontière est mince entre le remodelage des

supercomplexes décrit dans la *partie 1.2.3.2.1* et l'assemblage et la stabilité de ces derniers. En effet, comme décrit précédemment, certaines protéines permettant le remodelage des supercomplexes, comme COX7A2L, HIGD1A et HIGD2A, entraînent une diminution de l'enrichissement non seulement des supercomplexes mais également des complexes de la chaîne respiratoire. Ces facteurs d'assemblages n'entraînent pas, pour la plupart, de disparition totale d'un ou plusieurs types de supercomplexe (Hock et al., 2020; Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014a; Timón-Gómez et al., 2020). A l'heure actuelle, peu de modèles génétiques sont disponibles chez le mammifère pour étudier l'assemblage et le maintien des supercomplexes, ne permettant pas d'avoir de modèles fiables pour décrire l'importance bioénergétique et le rôle que pourrait avoir ces derniers dans la biogenèse ou le maintien des complexes de la chaîne respiratoire.

1.2.3.3.3 L'association en supercomplexes donne-t-elle la priorité aux électrons provenant des complexes associés ?

Comme précédemment décrit de nombreuses ubiquinone oxydoréductases dépendent de l'activité de la chaîne respiratoire pour réoxyder l'ubiquinone nécessaire à leur activité. Une question importante, qui est rarement prise en compte dans les études, est la convergence et l'engorgement possible de l'ubiquinone. En effet, physiologiquement la chaîne respiratoire est approvisionnée simultanément avec tous les substrats de ces ubiquinone oxydoréductases. Cependant, comment le système contrôle-t-il la provenance de l'entrée des électrons lorsqu'elle est approvisionnée avec plusieurs substrats? Le Pr. RIGOLET a été le premier à étudier ce phénomène chez *S. cerevisiae*. Son équipe a déterminé qu'il existait une compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire de levure. La chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* est constituée de plusieurs ubiquinone oxydoréductases dont une NADH ubiquinone oxydoréductase localisée sur le feuillet

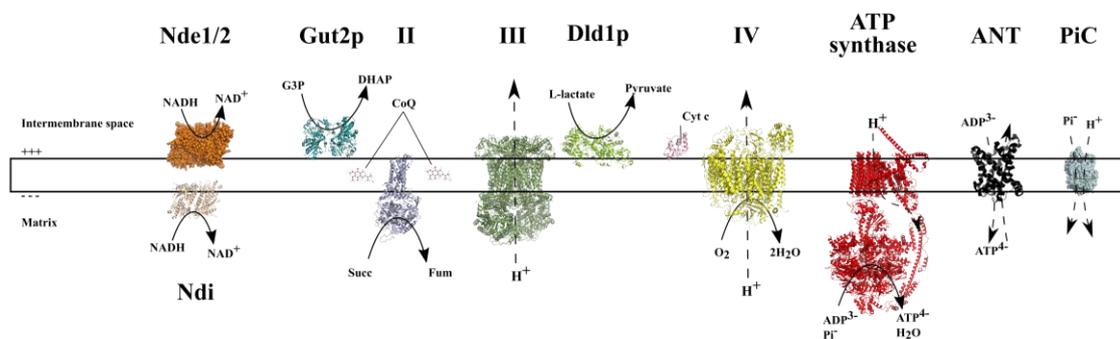


Figure 28. Illustration du système des oxydations phosphorylantes de *S. cerevisiae* (issue de la thèse de Cyrielle Bouchez).

externe de la membrane interne mitochondriale (Nde1/2) et d'une G3P ubiquinone oxydoréductase (Gut2p) (*Figure 28*).

Ils ont pu montrer que lorsque la chaîne respiratoire est en présence de deux substrats respiratoires, que sont le NADH et le G3P, seul le NADH est utilisé pour fournir en électrons la chaîne respiratoire, le G3P étant, quant à lui, consommé lorsque la totalité du NADH a été oxydé (*Figure 29*) (Påhlman et al., 2001). Ils ont également pu déterminer que les électrons provenant de la Nde étaient prioritaires au détriment de ceux des autres ubiquinone oxydoréductases du système (Bunoust et al., 2005; Påhlman et al., 2002, 2001).

A l'heure actuelle, le mécanisme permettant de mettre en place cette compétition à l'entrée des électrons reste énigmatique. En revanche, ils ont pu déterminer que l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* n'était pas à l'origine de ce phénomène de compétition (Rigoulet et al., 2010). Cependant, les chaînes respiratoires de ces levures ne possèdent pas d'ubiquinone oxydoréductases associées en supercomplexe comme peut l'être le complexe I chez les mammifères (Schägger and Pfeiffer, 2000). Le laboratoire de Pr. ENRIQUEZ, à travers d'autres travaux plus récents et réalisés chez le mammifère, a posé l'hypothèse et tenté de montrer que l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire de mammifère allait dicter la provenance du flux d'électrons. Il a émis l'hypothèse que les électrons provenant du complexe I associé en supercomplexe seraient prioritaires sur ceux provenant du complexe II non associé (Lapiente-Brun et al., 2013). Ce travail est vivement critiqué, notamment à cause du modèle biologique utilisé, mais il lui a permis de proposer le « plasticity model » qui est une alternative « dynamique » du modèle « solid state ». Ce modèle repose sur la découverte de COX7A2L comme facteur d'assemblage des supercomplexes. Il décrit que la

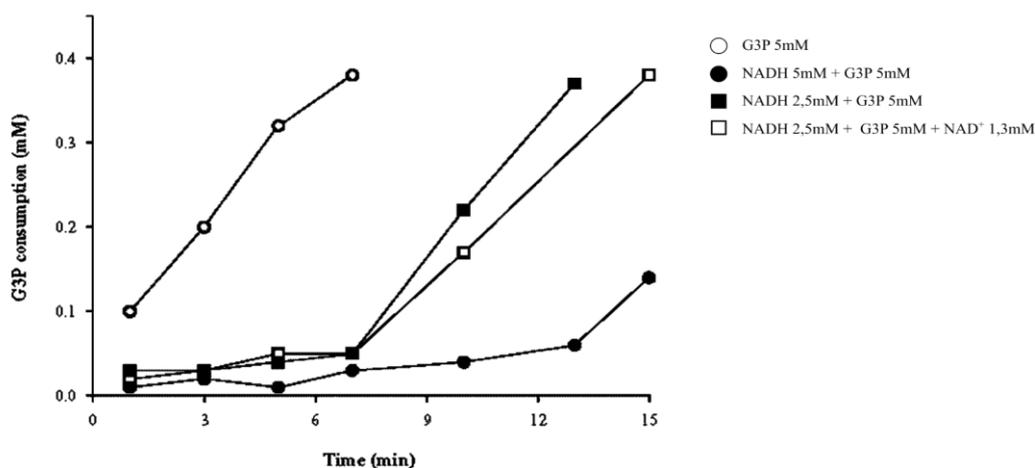


Figure 29. Effet de l'ajout de NADH sur la consommation de G3P au cours du temps chez *S. cerevisiae* (Modifiée de Pahlman et al., 2002).

dissociation des respirasomes et des SC III₂-IV, causée par différentes isoformes de COX7A2L, impacterait les capacités et la priorisation du flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire. Ce sujet sera décrit plus précisément dans la *partie Article 1* .

Néanmoins, bien que la canalisation des électrons ne semble pas être mise en place dans les supercomplexes et qu'aucune étude ne démontre l'existence d'une compétition entre les flux d'électrons provenant du complexe I par rapport aux autres déshydrogénase, le modèle de fonctionnement de la chaîne respiratoire en supercomplexe est largement admis par la communauté scientifique, bien qu'il commence à être de plus en plus remis en cause. La question du rôle des supercomplexes sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, notamment dans l'entrée des électrons reste donc ouverte, et c'est l'une des questions principales de mon travail de thèse.

1.3 Les hypothèses de travail :

Au cours de ma thèse, mon travail s'est centré sur la compréhension du fonctionnement de la chaîne respiratoire de mammifère, notamment du rôle de l'organisation supramoléculaire dans la formation des complexes et dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. J'ai notamment tenté de définir si l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire pouvait influencer les capacités respiratoires du système, et contrôler l'entrée des électrons au sein de la chaîne respiratoire.

Pour répondre à ces questions, j'ai, tout d'abord, collaboré avec Pr. UGALDE et Pr. BARRIENTOS pour étudier l'impact de la réorganisation supramoléculaire des complexes III et IV sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Pour cela, j'ai réalisé une caractérisation bioénergétique, sur cellules en culture perméabilisées, du premier *Knockout* cellulaire de COX7A2L. J'ai, notamment, mis au point une stratégie permettant de distinguer les flux respiratoires dépendants de l'activité du complexe I et du complexe II, lorsque ces deux déshydrogénases sont approvisionnées en substrats.

Dans un deuxième temps, j'ai tenté de comprendre le fonctionnement des chaînes respiratoire de cœur et de foie, à travers leur caractérisation bioénergétique et organisationnelle. J'ai cherché à déterminer si un mécanisme de compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire avait lieu sur mitochondries isolées perméabilisées et sur mitochondries isolées découplées. J'ai tenté de comprendre quel(s) mécanisme(s) pouvai(en)t contrôler l'approvisionnement en électrons de la chaîne respiratoire. Pour cela, j'ai développé de nouvelles stratégies expérimentales permettant de déterminer la

provenance des flux d'électrons approvisionnant la chaîne respiratoire en utilisant des mitochondries cardiaques et hépatiques. Cette approche m'a permis de déterminer l'importance de l'organisation supramoléculaire sur le contrôle de l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en électrons depuis les complexes I et II.

Dans un troisième temps, j'ai tenté de déterminer s'il était possible d'étudier le métabolisme mitochondrial et cette compétition entre les donneurs d'électrons de la chaîne respiratoire, dans des conditions de respiration phosphorylante, et si un mécanisme semblable à celui observé en respiration découplée était mis en place. Pour cela, j'ai tenté d'utiliser différentes approches pour discriminer les flux d'électrons approvisionnant la chaîne respiratoire depuis les complexes I et II.

Matériels et méthodes

2 Matériels et méthodes.

2.1 Matériels et méthodes partie 3: COX7A2L promeut la réorganisation de supercomplexes sans affecter la bioénergétique mitochondriale.

2.1.1 Culture cellulaire.

Les cinq lignées cellulaires utilisées pour cette étude sont nommées HEK293T, HEK KO1, HEK KO2, U87, U-KO1, U-KO1+COX7A2L. Elles ont été générées par Pr. BARRIENTOS et son équipe à partir de cellules embryonnaires de rein (HEK) et de glioblastome (U87). Les lignées ont été cultivées dans deux milieux de culture. Un milieu glucose nommé DMEM Glucose composé de 25mM de glucose, 1mM de pyruvate, 2mM de glutamax®, 0,1U/mL de pénicilline/streptavidine, et 10 % de sérum de veau fœtal. Un milieu galactose nommé DMEM Galactose composé de 15mM de galactose (pH 7,2), 1mM de pyruvate, 2mM de glutamax®, 0,1U/mL de pénicilline/streptavidine, et 10% de sérum de veau fœtal.

Les cultures ont été réalisées dans des incubateurs permettant de maintenir la température à 37°C et la concentration de CO₂ à 5%. Pour certaines expériences, les lignées ont été traitées avec de la piéricidine A (symbole : PinA ; concentration : 12µM ; solubilisée dans le DMSO). Le maintien des cellules HEK et U87 en milieu galactose ou en milieu glucose supplémenté en PinA n'étant pas viable, les cellules sont cultivées pendant 72h dans ces deux milieux.

2.1.2 Comptage cellulaire.

Les cellules sont récoltées entre 50 et 80% de confluence par digestion enzymatique avec 0,05% de trypsine pendant 5min à 37°C. Les cellules sont diluées et récoltées dans du PBS froid permettant de stopper l'action de la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées (1000g, 10min) pour éliminer la trypsine, le culot est repris dans un milieu DMEM Glucose sans sérum de veau fœtal ou DMEM Galactose sans sérum de veau fœtal (suivant les conditions de culture), puis les cellules sont déposées dans la glace. Elles sont ensuite comptées à l'aide d'un cytomètre en flux (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer). Une

fraction de la suspension cellulaire est diluée dans un Tampon PBS supplémenté avec 3,75mM d'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN fluorescent qui ne peut passer la membrane plasmique, mais qui peut pénétrer dans les cellules mortes lorsque l'intégrité de leur membrane plasmique est altérée. En diffusant dans les cellules mortes l'iodure de propidium (PI) s'intercale dans l'ADN, et émet dans le visible. Le canal FL2 (FL2-A, excitation : 488nm, émission : 585±20nm) du cytomètre en flux permet de quantifier la fluorescence de l'iodure de propidium intercallé dans l'ADN, permettant de discriminer les cellules viables des cellules mortes. De plus, le cytomètre en flux permet de discriminer les particules en fonction de leur taille. Cette dernière est liée à leur capacité à diffracter la lumière à 180° (FSC-A). Ces deux paramètres de taille et de fluorescence permettent de séparer les particules en trois populations définies comme les cellules vivantes (rectangle vert), les cellules mortes (rectangle rouge) et les débris cellulaires (rectangle bleu, *Figure 30*). Les zones permettant de sélectionner les cellules vivantes et les cellules mortes a été déterminées à l'aide de la digitonine. En effet, la digitonine est un détergent qui permet de faire des pores dans la membrane plasmique des cellules. Cette stratégie rend les cellules perméables à l'iodure de propidium et permet de déterminer les différentes populations cellulaires sans ambiguïté comme décrit sur le schéma (*Figure 30*). Les données sont recueillies et analysées à l'aide du logiciel BD Accuri C6 Software.

Notes :

1. *Le temps de trypsinisation est dépendant de chaque type cellulaire, il faut par conséquent remettre au point pour chaque lignée et condition de culture, en regardant au microscope optique le temps minimal pour décoller les cellules.*
2. *L'utilisation de la digitonine montre que la perméabilisation de la membrane plasmique n'induit pas de grandes variations de taille des cellules. Par conséquent, il semblerait que les cellules gardent une certaine structuration sub-cellulaire malgré la perméabilisation.*
3. *Il est préférable de finir de décrocher et resuspendre les cellules à l'aide d'une pipette sérologique, au lieu qu'un cône de pipette 1000µl dont l'excrémité sera plus large et induira moins de contraintes mécaniques sur les cellules. Cela permet d'augmenter la qualité des prélèvements de cellules en terme de rendement, viabilité, ainsi que vis-à-vis de la stabilité des cellules au cours du temps.*

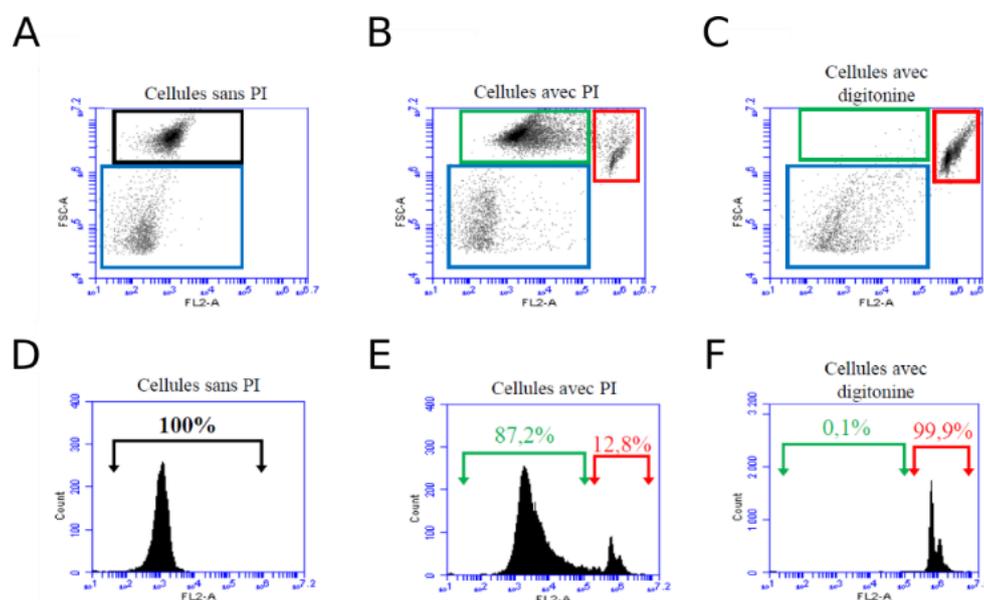


Figure 30. Comptage cellulaire et détermination des différentes populations de cellules vivante et morte à l'aide du PI.

Les cellules diluées dans du PBS et sont analysées par cytométrie en flux sans iodure de propidium (PI) (A), après ajout de PI (B), et dans du PBS-EDTA-EGTA-PI et avec de la digitonine (60µg/mL) afin de rendre toutes les cellules perméables au PI (C). (A-C) représentent le nombre d'évènements en fonction de leurs tailles (FSC-A) et de l'intensité de fluorescence FL2-A (Excitation : 488 nm ; Emission : 585nm). (D-F) représentent le nombre de cellules lorsque le bruit a été soustrait du comptage. Les encadrés et les crochets représentent les différentes populations : population de cellules totale (en noir), le bruit (en bleu), les cellules vivantes non perméables au PI (vert) et les cellules mortes perméables au PI (rouge).

2.1.3 Principe de la mesure du flux de consommation d'oxygène par oxygraphie : l'oroboros.

Le flux de consommation d'oxygène des cellules perméabilisées et des mitochondries isolées a été mesuré par oxymétrie à haute résolution (Oxygraph-2K, Oroboros ; (Figure 31). L'oxygraphe Oroboros est équipé de deux chambres de mesure indépendantes, étanches de 2,1 ml, thermostatées (37°C), sous agitation constante (800rpm), permettant de mesurer la concentration d'oxygène dans chaque cuve grâce à une électrode de Clark (Figure 32).

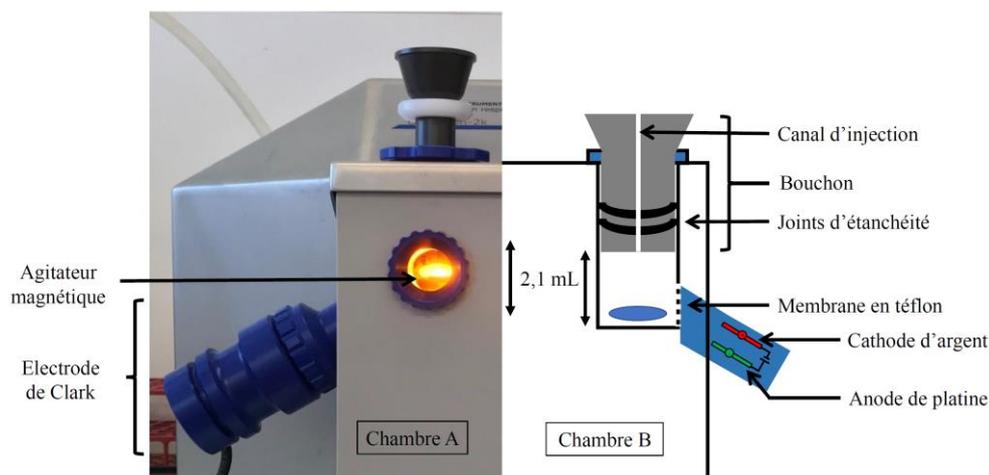


Figure 31. Illustration d'un oxygraphe O2K-Oroboros.

Celle-ci est composée d'une anode en argent et d'une cathode en platine immergées dans une solution de KCl demi-saturée. L'électrode est isolée de la cuve de mesure par une membrane en téflon. Les propriétés physico-chimiques de celle-ci rendent la membrane spécifiquement perméable à l'oxygène, permettant à l'oxygène de diffuser librement entre la chambre de mesure et l'électrode de Clark. L'électrode de Clark maintient une tension de 0,7V. A ce potentiel, l'oxygène est réduit deux fois par la cathode de platine une première fois en H_2O_2 , puis en H_2O (Figure 32). La réduction de l'oxygène génère une dépolarisation de la cathode. Le courant qui en résulte est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous dans l'électrolyte de l'électrode de Clark et donc par extension à l'oxygène présent dans la cuve de mesure.

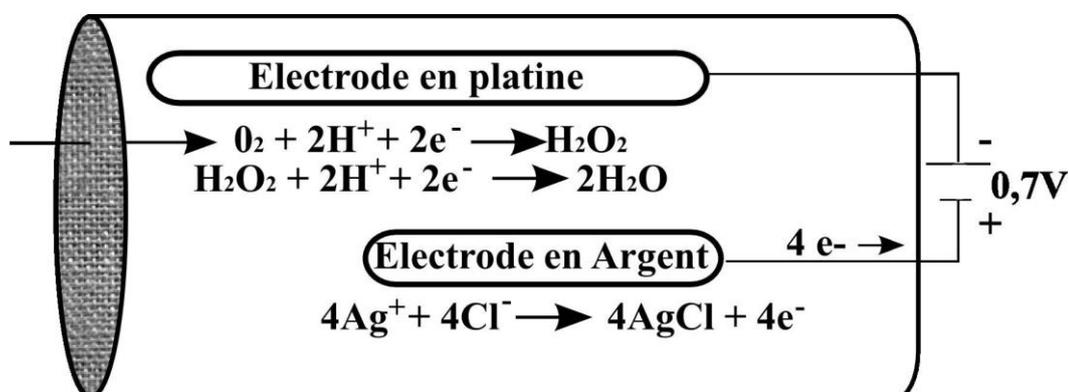


Figure 32. Illustration d'une electrode de clark (Issue de la thèse d'Arnaud Mourier).

2.1.4 Mesure du flux de consommation d'oxygène sur cellules perméabilisées.

A la suite du comptage cellulaire, un million de cellules vivantes sont diluées dans le tampon de respiration (RB) composé de 120mM de sucrose, 50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl, 4mM de KH_2PO_4 , 2mM de MgCl_2 et 1mM d'EGTA (pH 7,2). La respiration endogène des cellules non perméabilisées est mesurée en présence de substrats respiratoires mitochondriaux du complexe I (10mM pyruvate, 5mM glutamate, 5mM malate) du complexe II (10mM de succinate) et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (mG3PDH, 5mM de glycérol-3-phosphate) et du substrat de l'ATP synthase pour mesurer la respiration phosphorylante (1mM d'ADP). La perméabilisation des cellules, par addition successive de digitonine (entre 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Figure 33*), est suivie grâce à l'augmentation de respiration provoquée par l'entrée des substrats et de l'ADP présents en concentration non limitante dans le tampon respiration. La respiration phosphorylante est mesurée lorsque l'ajout de digitonine n'entraîne plus d'augmentation significative du flux de consommation d'oxygène (*Figure 33*), cette respiration est la respiration lorsque le potentiel électrochimique en proton est consommé par l'ATP synthase pour former de l'ATP. La respiration non-phosphorylante est ensuite mesurée grâce à l'ajout de 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'oligomycine permettant d'inhiber la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Dans cette condition le potentiel électrochimique en proton est à son maximum, la respiration est dite minimale, elle est due à la fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale. La respiration découplée est observée après ajouts successifs de CCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone, entre 0,03 μM et 0,05 μM) jusqu'à obtention d'un plateau de respiration (*Figure 33*). L'ajout de découplant permet de dissiper chimiquement le potentiel électrochimique en protons et d'obtenir les capacités maximales respiratoires des chaînes respiratoires. Lors de nos études les substrats des différentes déshydrogénases sont ajoutés séparément ou simultanément.

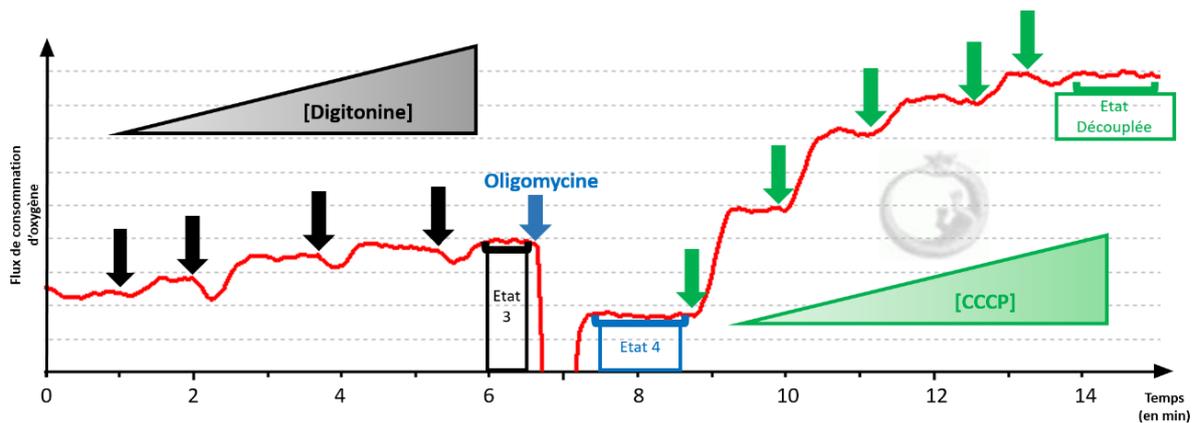


Figure 33. Illustration d'une mesure de respiration de cellules perméabilisées avec un oxygraphe Oroboros.

La respiration endogène des cellules non perméabilisées placées en présence de substrats respiratoires et d'ADP est mesurée. La perméabilisation des cellules par addition successive de digitonine (flèche noire) est suivie grâce à l'augmentation de respiration provoquée par l'entrée de ces substrats et d'ADP présents dans le tampon, jusqu'à obtention d'un plateau défini comme l'état phosphorylant (Etat3, crochet noir). La respiration non-phosphorylante est mesurée grâce à l'ajout d'oligomycine permettant d'inhiber la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (Etat 4, crochet bleu). La respiration découplée est observée après ajouts successifs de CCCP (flèches vertes) jusqu'à obtention d'un plateau (Etat Découplée, crochet vert).

Afin, de discriminer les flux respiratoires provenant des complexes I, II et de la mG3PDH, lorsque la respiration est mesurée en présence des substrats de ces trois ubiquinone oxydoréductases, une stratégie utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces complexes a été utilisée. Une fois la respiration maximale atteinte, l'ajout d'inhibiteurs du complexe I tels que la piéricidine A (PinA, 1,2 μ M) ou la roténone (rot, 30nM) permet d'avoir la respiration dépendante de l'activité du complexe I (PinA-Sens-Resp). L'ajout d'inhibiteurs du complexe II tel que le malonate (malo, 3mM) ou l'atpenine A5 (AtpnA5, 20nM) permet d'avoir la respiration dépendante de l'activité du complexe II (Malo-Sens-Resp). Chacune des respirations est terminée par l'ajout d'antimycine A (0,5 μ M) permettant d'obtenir la respiration résiduelle dépendante de la chaîne respiratoire (AA-Sens-Resp) qui peut être liée à la respiration de la mG3PDH. (Figure 34).

Notes :

1. La perméabilisation des cellules dépend du type cellulaire et du processus de récolte des cellules. Il faut donc systématiquement titrer la digitonine pour chaque respiration et ne pas se fixer à une seule concentration de digitonine. De plus, l'utilisation de différents lots de digitonine, ainsi que le

nombre de congélation/décongélation de celle-ci peut induire des variations dans la perméabilisation.

2. La digitonine peut être remplacées par l' α -tomatine. Ce détergent semble posséder une meilleure reproductibilité pour la perméabilisation des cellules. Néanmoins, ces conditions de conservation et de solubilisation vont grandement faire varier ses capacités de perméabilisation.

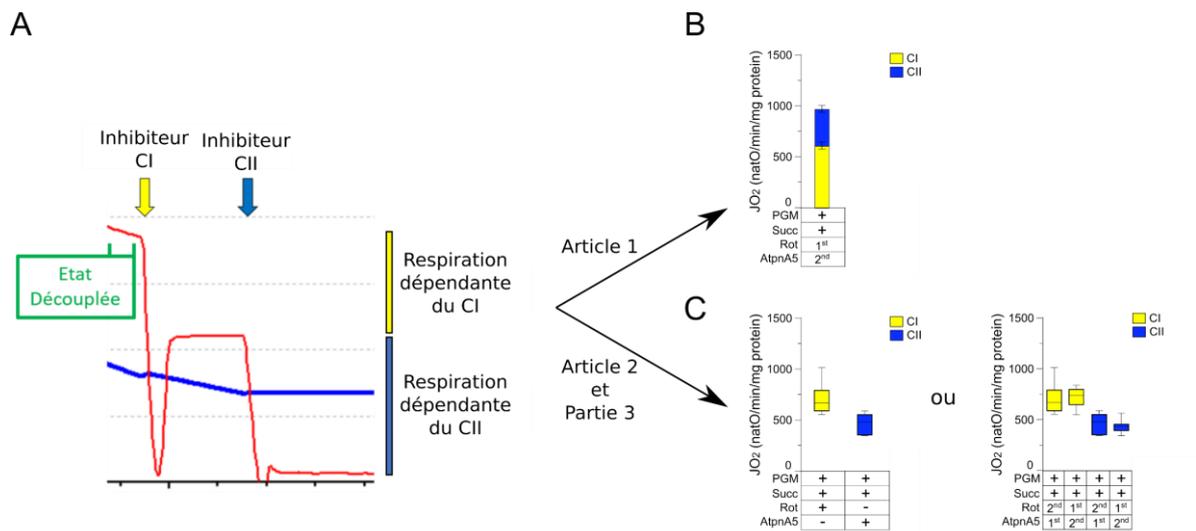


Figure 34. Illustration de la discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II.

Les flux respiratoires sont déterminés par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques des complexes de la chaîne respiratoire. (A) La respiration dépendante de l'activité du complexe I (CI, en jaune) ou du complexe II (CII, en bleu) est le rapport de respiration entre la respiration avant l'ajout de l'inhibiteur et après l'ajout de l'inhibiteur. Deux représentations ont été utilisées suivant les projets. (B) La représentation en barres utilisée dans *la partie 3* permet d'appréhender la respiration maximale du flux respiratoire et la proportion de chaque flux dans cette respiration. (C) La représentation en boîtes utilisée dans *les parties 4 et 5* permet de comparer la proportion de flux dépendante de chaque complexe entre les conditions de substrats.

2.2 Matériels et méthodes Partie 4 et Partie 5 : Détermination du mécanisme régulant la provenance du flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire à travers l'étude du métabolisme et de la tissu- spécificité.

2.2.1 Isolement de mitochondries.

Les tissus qui ont été utilisés durant cette étude proviennent de souris *Mus musculus* dans un fond génétique C57BL/6N. Les souris ayant entre 20 et 40 semaines ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les différents tissus utilisés, comme le cœur ou le foie, ont été rapidement prélevés après le sacrifice, sommairement découpés et abondamment rincés au PBS. Le lavage permet d'évacuer le sang présent dans les différents organes qui, s'il n'est pas éliminé, altère la qualité des mitochondries. L'isolement des mitochondries repose sur une extraction mécanique des mitochondries et la purification des mitochondries est réalisée à l'aide de centrifugations différentielles. Différents protocoles ont été mis en place pour isoler les mitochondries des différents tissus et sont décrits ci-dessous.

2.2.1.1 Isolement de mitochondries cardiaques.

Après avoir été prélevé, le cœur est découpé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel. Les morceaux sont lavés à l'aide d'un tampon isolement sucrose (MIB), composé de 310mM sucrose, 20mM Tris-HCl, and 1mM EGTA (pH 7,4). Ce tampon isoosmotique pour les mitochondries, permet de conserver l'intégrité des mitochondries lors de l'extraction. Les fragments de tissus sont placés dans un Potter S homogenizer (Sartorius) et 2ml d'un mix trypsine (0,5g/l) - EDTA (0,5g/l) et de MIB est ajouté. L'extraction mécanique est faite à l'aide d'un piston limé, permettant d'amoinrir la contrainte mécanique appliquée aux mitochondries. Elle permet de casser le sarcolemme et de libérer les mitochondries dans le tampon isoosmotique. Afin d'extraire les mitochondries piégées entre les fibres musculaires cardiaques, une digestion enzymatique de ces myofibrilles est réalisée à l'aide de la trypsine. Après quelques allers-retours avec le piston, et lorsque la majorité des bouts de tissus ne sont plus visibles, le potter est mis dans la glace et 2ml de MIB supplémentés avec de l'albumine de sérum bovin délipidé (BSA, 0,25mg/ml)

préalablement refroidit à 4°C est rajouté à l'homogénat pour finir de casser les fragments de tissus restants. La BSA rajouté au tampon isolement est cruciale pour la qualité de la préparation. En effet, elle a pour effet de diminuer l'activité de la trypsine en la saturant, mais elle joue également le rôle de tampon permettant de capter les acides gras libres pouvant être relargués durant le broyage des tissus. Les acides gras libres peuvent découpler les membranes. Ils altèrent donc grandement la qualité des mitochondries, et par conséquent le rendement de l'isolement des mitochondries et la qualité des résultats. L'homogénat est transvasé dans un tube Falcon pour être centrifugé à 1000g pendant 10min à 4°C, avec un rotor de type *swing-out*. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube, pour une seconde centrifugation à 3500g pendant 10min à 4°C dans un rotor fixe. La totalité du surnageant de la deuxième centrifugation est enlevée, le culot qui contient les mitochondries cardiaques est resuspendu dans un minimum de tampon MIB-BSA.

2.2.1.2 Isolement de mitochondries hépatiques.

Après que le foie ait été collecté, il est découpé afin d'avoir les morceaux les plus petits possibles. Les morceaux de tissus sont lavés avec du MIB-BSA délipidé (0,25mg/ml). Les fragments de foie sont déposés dans un potter et sont broyés mécaniquement à l'aide d'un piston. L'homogénat est ensuite transféré dans un tube Falcon pour être centrifugé une première fois à 1000g pendant 10min à 4°C avec un rotor de type *swing-out*. Le surnageant est ensuite transvasé dans un autre tube afin de faire une seconde centrifugation à 3500g pendant 10min à 4°C à l'aide d'un rotor fixe, puis le surnageant est une nouvelle fois centrifugé à 10000g pendant 10min à 4°C. La totalité du surnageant de la troisième centrifugation doit être enlevé, en prenant soin d'aspirer les couches de lipides présentes à la surface du tampon et sur les parois du tube, afin d'éviter que ces couches de lipides ne se retrouvent dans le culot. Le culot contenant les mitochondries hépatiques est resuspendu dans un minimum de volume de MIB-BSA.

Note : La présence de BSA délipidée est cruciale pour l'isolement de mitochondries de foie. Le foie est un tissu dont l'une des propriétés est le stockage des lipides. Lors de l'extraction une grande quantité de lipides est libérée. L'absence de BSA délipidée entraine une diminution drastique de la qualité des mitochondries.

Afin de pouvoir comparer et corréler les expériences entre elles, pour chaque isolement mitochondrial, la concentration en protéines est quantifiée à l'aide du kit Bio-Rad

DC Protein Assay, qui est un test colorimétrique basé sur la quantification de protéines de Lowry. L'absorbance est mesurée à 595nm sur un lecteur de plaque Tecan Infinite M200 plate reader.

2.2.2 Mesure du flux de consommation d'oxygène de mitochondries isolées de différents tissus.

La consommation d'oxygène des mitochondries de tissus a été faite sur mitochondries isolées intactes et sur mitochondries perméabilisées, dont les respirations sont appelées activités I-III-IV, II-III-IV, I-II-III-IV. L'intérêt est d'étudier l'impact de l'organisation supramoléculaire sur l'activité des complexes I et II, dans ces deux systèmes très différents :

- Le premier étant un système intégré (mitochondries intactes). Il permet d'étudier la totalité du métabolisme mitochondrial, dans lequel la respiration du complexe I et complexe II dépend de l'activité de la chaîne respiratoire, mais également du transport des substrats de ces deux complexes, des systèmes générateurs de NADH à l'intérieur des mitochondries (pour le Complexe I) et des contraintes thermodynamiques du système (force proton motrice).
- Le deuxième étant un système plus simple (mitochondries perméabilisées). Dans lequel les complexes de la chaîne respiratoire sont approvisionnés directement en substrats, sans dépendre du transport et indépendamment du métabolisme mitochondrial. Les flux mesurés sont donc uniquement dépendants de l'activité de la chaîne respiratoire.

2.2.2.1 Mesure du flux respiratoire sur mitochondries isolées intactes.

Pour la mesure du flux respiratoire de mitochondries isolées, 50µg de mitochondries de cœur (ou 100µg pour le foie) sont placées dans une chambre de l'Oroboros contenant du tampon de respiration supplémenté avec de la BSA (RB-BSA), composé de Sucrose (120mM), KCl (50mM), Tris-base (20mM), KH₂PO₄ (4mM), MgCl₂ (2mM), BSA délipidé (0,25mg/ml). Le tampon RB-BSA contient également de l'ADP (5mM) et les différents mélanges de substrats respiratoires qui sont décrits pour chacune des conditions expérimentales : de Succinate (Succ, 10mM), Pyruvate (Pyr, 10mM), Glutamate (Glut, 5mM) ou du Malate (Mal, la concentration est décrite pour chaque section). L'addition de

certains composés au cours de la respiration, tels que l'oligomycine (50ng/ml) ou le CCCP (0,5µM), permet d'observer des états respiratoires extrêmes comme décrit au-dessus (*Matériels et Méthodes partie 2.1.4*). L'ajout d'inhibiteurs spécifiques des complexes I et II sont utilisés afin de déterminer la proportion du flux respiratoire dépendante de l'activité du complexe I ou du complexe II, lorsque les mitochondries sont incubées en présence de plusieurs substrats respiratoires. Les concentrations optimales de Roténone (rot ; 30nM) et d'Atpenin A5 (atpn ; 20nM) sont rajoutées durant la respiration découplée (*partie 4*) ou en conditions de respiration phosphorylante (*partie 5*) (*Figure 34*). L'Antimycine A (AA, 100nM) est rajoutée à la fin de chaque respiration afin d'obtenir la respiration résiduelle dépendant de la chaîne respiratoire, s'il y en a une.

2.2.2.2 Mesure des activités I-III-IV, II-III-IV et I-II-III-IV.

La consommation d'oxygène de mitochondries perméabilisées, autrement appelée activité I-III-IV, II-III-IV ou I-II-III-IV, est réalisée également avec l'oxymétrie à haute résolution (Oxygraph-2K, Oroboros). Les mitochondries sont perméabilisées par des cycles de congélation-décongélation. La perméabilité des mitochondries est vérifiée par des mesures de respiration en PGM, NADH et succinate sans cytochrome *c*. Dans ces diverses conditions, le flux doit être égal à 0natO/min/mg de protéine. En effet, l'absence de respiration sans ajout de cytochrome *c* montre que la membrane externe est perméabilisée, et l'absence de respiration en PGM et cytochrome *c* prouve la perméabilité de la membrane interne. Si cette dernière est perméable, les déshydrogénases matricielles seront diluées dans le tampon respiration et ne permettront pas d'observer un flux respiratoire lié au complexe I. Les activités I-III-IV, II-III-IV et I-II-III-IV sont réalisées dans un tampon phosphate (KH₂PO₄ 50mM ; qui est neutralisé à pH 7,4 avec du KOH) contenant les différentes conditions substrats composé de NADH (0,625mM), de Succinate (10mM) et supplémenté avec du cytochrome *c* (62,5µg/ml). Afin de déterminer la proportion du flux respiratoire provenant des complexes I ou II, des inhibiteurs spécifiques des complexes I et II comme décrit dans le *Matériel et méthodes dans la partie 2.1.4* ont été utilisés (*Figure 34*).

Notes :

1. Sur mitochondries perméabilisées plusieurs observations ont été faites. Premièrement, l'ajout de substrats des déshydrogénases (Malate, Glutamate, Pyruvate) pour générer du NADH dans les mitochondries n'a aucun impact sur

la respiration, seul l'ajout de NADH permet d'avoir une respiration provenant du complexe I, dénotant de la perte du métabolisme mitochondrial et de la perméabilité de la membrane interne. Deuxièmement l'ajout de cytochrome c est nécessaire pour avoir un flux respiratoire provenant du complexe I ou II. La perméabilisation de la membrane externe des mitochondries entraîne une dilution du cytochrome c qui devient limitant pour transférer les électrons entre les complexes III et IV.

- 2. Afin d'avoir la capacité maximale de respiration provenant du complexe II, l'activité II-III-IV doit être mesurée dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 50mM). Lorsqu'elle est réalisée en tampon RB le flux de consommation d'oxygène est divisé par deux par rapport aux respirations en mitochondries intactes. Cette inhibition est sûrement liée à un des composants du tampon RB, l'osmolarité du tampon ne semble pas avoir d'impact sur l'activité II-III-IV (data non montrées).*
- 3. De manière surprenante, l'ajout simultané de NADH et de cytochrome c, sur mitochondries hépatiques, induit un transfert d'électrons insensible à l'Antimycine A. Il faut donc toujours finir les respirations, par l'inhibition du Complexe III, afin de ne pas surestimer les capacités respiratoires des mitochondries et la proportion du flux provenant du complexe I (pour les activités I-III-IV et I-II-III-IV et également pour les mesures de J_{NAD^+}).*

2.2.3 Quantification et étude de la stœchiométrie des complexes de la chaîne respiratoire.

2.2.3.1 Western Blot (SDS-PAGE).

Une quantification relative des protéines de la chaîne respiratoire a été réalisée dans un premier temps par Western Blot en conditions dénaturantes. Cette technique permet, à l'aide d'un gel d'acrylamide, de séparer les protéines dénaturées suivant leurs tailles et leurs charges à l'aide d'une électrophorèse.

Une fois la concentration protéique déterminée, les protéines provenant de l'isolement des mitochondries ont été solubilisées et dénaturées avec une solution de RIPA (300mM de NaCl, 50mM de tris, 2% poids/volume (p/v) de NP40, 2% p/v de SDS, 0,5% p/v de deoxycholate et 2mM d'EGTA, pH 8) ajoutée volume/volume (v/v). Une fois les protéines dénaturées, un tampon de charge (Tris pH 6,8 (0,3 M), Glycerol (10%),

Thioglycerol (6%), SDS (2%), bromophenol blue (0,01%)) est rajouté aux échantillons, afin de les densifier et d'ajouter des charges aux échantillons. Les protéines dénaturées sont ensuite déposées sur un gel d'acrylamide (15% p/v d'acrylamide). La migration des protéines se fait à 100V, dans un tampon de migration (0,15% p/v de SDS, 0,6% p/v de Tris, 2,5% p/v de glycine).

Une fois la migration terminée, les protéines ayant migrées sur le gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran Premium, 0,2 μ m NC). Le transfert des protéines se fait par transfert liquide à l'aide d'un tampon de transfert (0,3% p/v de Tris, 0,44% p/v de glycine, 15% v/v d'éthanol) à un voltage de 100V pendant 50 minutes. L'efficacité du transfert et l'absence de bulle sur les membranes sont contrôlées par une coloration au rouge Ponceau (2g/L de Ponceau, 5% v/v d'acide acétique), et grâce à une coloration au bleu de Coomassie sur le gel d'acrylamide.

Les membranes sont ensuite lavées 3 fois avec du TBS-Tween 20 (150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl, 0,05% de Tween 20, pH 7,6), puis une fois avec du TBS (150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl, pH 7,6), avant d'être incubées pendant une heure avec 3% p/v de lait délipidé solubilisé dans le TBS. Le lait permet de saturer la membrane de nitrocellulose en protéines et de diminuer le bruit de fond lié à une fixation non spécifique des anticorps. La membrane ainsi saturée en protéine, est incubée avec les anticorps primaire sur la nuit à 4°C, sous agitation constante. L'anticorps primaire utilisé est un cocktail d'anticorps anti-OXPHOS (hôte : Souris ; dilution : 1/1000, dilué : lait 3% ; réf : ab110413) qui se compose de cinq anticorps monoclonaux dirigés contre le Complexe I (Abb. : NDUFB8 ; réf : ab110242), contre le Complexe II (Abb. : SDHB ; réf : ab14714), contre le Complexe III (Abb. : UQCRC2 ; réf : ab14745), contre le Complexe IV (Abb. : MTCO1 ; réf : ab14705), et contre l'ATPsynthase (Abb. : ATP5A; réf : ab14748). Les membranes sont ensuite lavées (3 fois au TBS-Tween 20 puis une fois au TBS) avant d'être incubées en présence de l'anticorps secondaire fluorescent, couplé à de la Cyanine 5 (Abb. : Cy5 ; TBS ; dil. : 1/2000). Les membranes sont incubées pendant deux heures à 4°C avec l'anticorps secondaire, sous agitation constante et à l'obscurité pour éviter le quenching de la fluorescence. Une fois l'incubation terminée, les membranes sont lavées avec du TBS. La révélation des anticorps se fait à l'aide du Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences), la fluorescence est mesurée à 635 nm pour la Cy5. La quantification relative des protéines des OXPHOS été réalisée avec le logiciel Image J.

Notes :

1. *La nature de la membrane pour le transfert est très importante. Elle permet d'améliorer le transfert des protéines. Suivant la nature du gel utilisé, la taille des protéines d'intérêt, il faut adapter la membrane (porosité, type de membrane) et le protocole de transfert. Mais elle devra, comme c'est le cas ici, être adaptée à la méthode de détection qui suit le transfert. Le système de détection utilisé pour les Western Blot est la fluorescence. Des membranes, ayant la propriété d'être faiblement auto-fluorescente, ont été utilisés lors de mes travaux.*
2. *Afin de diminuer le bruit de fond en fluorescence, il est nécessaire de solubiliser le lait (ou autre agent bloquant) dans le TBS et de faire les derniers lavages sans Tween. Le Tween est un détergent qui améliore l'efficacité du lavage des membranes (il permet notamment de limiter les agrégats de lait non solubilisés sur la membrane). Cependant, il est fluorescent donc il ne faut l'utiliser que lors des étapes clés pour ne pas avoir un bruit de fond trop important.*
3. *Le choix de l'agent bloquant est aussi important pour la détection en immunofluorescence. Par exemple, l'utilisation de la BSA est à proscrire en fluorescence surtout pour les filtres cyanine 3 et cyanine 5 car la BSA possède une forte fluorescence à ces longueurs d'ondes.*

2.2.3.2 Quantification des cytochromes.

La quantification de certaines entités de la chaîne respiratoire a été faite en s'appuyant sur l'absorption des cytochromes. Les cytochromes sont des hémoprotéines présentes dans le complexe III, le complexe IV, et ils sont également un transporteur mobile d'électrons entre ces complexes. Ils sont en charge du transfert mono-électronique des électrons dans la chaîne respiratoire. Les hèmes qui composent les cytochromes vont, en fonction de l'environnement protéique dans lequel ils sont localisés, posséder des propriétés d'absorption différentes et dépendantes de l'état redox de l'hème (Chance, 1952; Chance and Williams, 1955). Ces propriétés permettent, à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceaux, de quantifier les cytochromes en faisant la différence entre le spectre d'absorption du cytochrome à l'état réduit (forme qui absorbe) et celui de l'état oxydé (forme sans propriété spectrale particulière).

Dans chacune des cuves sont dilués 2mg de mitochondries isolées de cœur ou 16mg de mitochondries isolées de foie, dans 1ml de tampon phosphate (50mM, pH7.2) contenant 0.05% (v/v) de Triton X-100. De plus, 5mM de ferricyanure de potassium sont ajoutés à la cuve « oxydée » et quelques grains d'hydrosulfite de sodium (dithionite) sont rajoutés dans la cuve « réduite ». Ceci permettra de mesurer le spectre d'absorption des cytochromes oxydés dans une cuve et le spectre d'absorption des cytochromes réduits dans l'autre cuve. Le spectre d'absorption de ces cuves est mesuré entre 500 et 650nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis V760 (Jasko).

Une fois le spectre différentiel réalisé, la quantité de cytochromes est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$q_{\text{cytochrome}} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg}} \right) = \frac{\Delta \text{Absorbance}}{\epsilon_{\text{cytochrome}} * \text{mg de protéines}}$$

Les propriétés des différents cytochromes sont définies ci-dessous :

Les cytochromes *c* et *c1* présentent un pic d'absorption entre 550–540 nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de 18 mM⁻¹/cm.

Les cytochromes *b_l* et *b_h* ont leur pic d'absorption à environ 563–575 nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de 18 mM⁻¹/cm.

Les cytochromes *a* et *a₃* ont leur pic d'absorption à environ 605–630 nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de 24 mM⁻¹/cm.

2.2.4 Etude de l'organisation supramoléculaire du système des oxydations phosphorylantes par électrophorèse non dénaturante (BN-PAGE).

Comme décrit dans l'introduction, c'est la création et le développement du gel natif (Schagger et al., 1994) qui ont permis d'étudier l'organisation supramoléculaire de l'OXPPOS. Cette technique permet de solubiliser par l'intermédiaire de détergent non ionique, tel que la digitonine, les complexes protéiques des membranes lipidiques, sans les dénaturer et en conservant leurs activités enzymatiques. Une fois les protéines solubilisées, l'électrophorèse permet de séparer les protéines et les complexes protéiques suivant leur taille, leur forme et leurs charges. Le gel d'acrylamide permet de séparer et d'augmenter la résolution de séparation entre les protéines de charges proches, en jouant le rôle de tamis moléculaire. En effet, les gros complexes, notamment ceux de la chaîne respiratoire, sont retenus et bloqués par la maille du gel d'acrylamide, alors que les plus petits complexes ou

protéines seront également retenus mais pourront être élués du gel suivant les conditions de migration.

Les mitochondries isolées de cœur ou de foie sont resuspendues dans un tampon d'extraction digitonine composé d'HEPES (30mM), potassium Acetate (150 mM), Glycerol (12%), acide 6 Aminocaproic (2mM), EDTA disodique (2mM), contenant un ratio digitonine/protéines de 3g/g pour les mitochondries cardiaques et hépatiques (Merck ; 300410 -5GM), l'ensemble est vortexé 1h à 4°C. Cette étape permet d'extraire et solubiliser les complexes protéiques des membranes lipidiques. A la suite de cette incubation, les protéines sont mises à centrifuger à 30 000g pendant 10min à 4°C, afin de culoter les membranes qui n'ont pas été solubilisées. Le type de gel natif utilisé est un LBN-PAGE (Light Blue Native Poly Acrylamide Gel) (Wittig et al., 2007). Dans ce protocole, la quantité de Coomassie Brilliant Blue du tampon de charge des échantillons et du tampon cathode (Thermo Fisher Scientific ; BN2002) est diminuée par rapport à un BN-Page classique (Schagger et al., 1994; Schägger and Pfeiffer, 2000). Le surnageant est prélevé et est mélangé avec un tampon de charge (0,02% [p/v] Coomassie Brilliant Blue G-250). Ce tampon permet d'ajouter des charges aux protéines sans les dénaturer. Les échantillons sont déposés sur des gels Invitrogen™ Gels de protéines Bis-Tris Novex™ NativePAGE™ qui, suivant les conditions, sont des gels gradients de 3-12% ou 4-16 % d'acrylamide. Le tampon de migration se compose d'un tampon cathode (Thermo Fisher ; BN2002 ; 0,002% de Coomassie Brilliant Blue G-250) et de NativePAGE™Running Buffer (Thermo Fisher Scientific ; BN2001 ; 50 mM BisTris 50 mM Tricine pH 6,8). Les gels sont mis à migrer à 10mA constant à 4°C pour une durée qui peut varier de 8h à 18h. Lorsque le front de migration atteint la moitié du gel, le tampon de migration est remplacé par un tampon de migration ne contenant pas de tampon cathode, afin de diluer le bleu de Coomassie présent dans le gel natif.

Notes :

- 1. Comme décrit plus haut, le gel natif joue le rôle de tamis moléculaire où les plus gros complexes peuvent s'arrêter et être piégés dans la maille. Suivant les expériences les gels vont migrer entre 8h et 18h, la migration durant 8h sera considérée comme une sous migration des échantillons, lors de laquelle le front de migration est gardé. Et la migration 18h, est considérée comme une sur-migration dans laquelle seules les protéines pouvant être retenues dans la maille d'acrylamide sont présentes. Une migration lente est préconisée pour la*

migration de 8h car elle permet d'augmenter la définition des bandes même si les protéines sont sous migrées.

- 2. Afin d'avoir la meilleure résolution des bandes, une titration de la quantité de digitonine par rapport à la quantité de protéine doit être réalisée pour chaque modèle (cellulaires, tissulaires) et pour chaque référence et lot de digitonine.*
- 3. La quantité de bleu de Coomassie peut être problématique lors de la détection des protéines étudiée, soit en affectant l'activité des protéines et donc en rendant inutilisable la détection par activité enzymatique de certaines protéines dans le gel (Matériels et méthodes partie 2.2.4.1), soit en affectant la détection des anticorps fluorescents (Matériels et méthodes partie 2.2.4.2). Le Coomassie émet dans une longueur d'onde proche de la Cy5, fluorophore utilisé pour l'immunodétection par fluorescence. Ainsi, certaines bandes peuvent être artefactuelles et peuvent ne pas dépendre de l'immunodétection.*
- 4. Afin d'étudier comment varie l'organisation supramoléculaire de l'OXPPOS dans différentes conditions de substrats métaboliques, les mitochondries isolées de cœur ont été incubées dans une chambre d'Oroboros comme décrit dans le Matériels et méthodes partie 2.2.2, et ont été placées dans des conditions de respirations découplées (50µg par conditions). Les mitochondries ont été par la suite centrifugées à 10000g pendant 10min à 4°C, le surnageant est enlevé et le culot est repris dans un mélange de tampon extraction digitonine contenant 3g/g de digitonine (invitrogen - BN20061). Les protéines sont mises à migrer comme décrit dans le Matériels et méthodes partie 2.2.4 et la présence des protéines de chacun des complexes est révélée par activité enzymatique (Matériels et méthodes partie 2.2.4.1).*

2.2.4.1 Détection des supercomplexes de la chaîne respiratoire par activité enzymatique dans le gel.

Une fois que les complexes de la chaîne respiratoire ont été séparés par gel natif, les complexes I, les complexes II, et les complexes IV sont révélés en utilisant l'activité enzymatique de ces protéines. Pour cela, deux molécules sont utilisées, lorsqu'ils sont réduits par l'activité enzymatique des complexes étudiés, ces colorants précipitent et changent de couleur, permettant de les observer dans le gel.

L'une de ces molécules est le 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium ou IodoNitroTetrazolium qui une fois réduite forme du iodonitrotetrazolium

formazan (INT). C'est cette forme qui est observée dans le gel. L'INT est utilisée pour révéler l'activité du complexe I et complexe II :

- Afin de détecter le complexe I, une solution de potassium phosphate (50mM ; pH 7,4) contenant du NADH (400µM) et de l'INT (0,5mg/ml). Le gel est incubé avec le tampon sous agitation constante à température ambiante (pendant quelques minutes), jusqu'à l'apparition de bandes rouges traduisant la présence de complexe I.
- Afin de détecter le Complexe II, une solution de potassium phosphate (50mM, pH 7,4) contenant du Succinate (50mM), Phénazine Méthosulfate (PMS, 20mM) et de l'INT (0,5mg/ml) est rajouté sur le gel. Le gel est incubé sous agitation constante à 37°C (pendant quelques minutes voire heures) jusqu'à l'apparition de bandes rouges traduisant la présence de Complexe II.

Notes :

1. *Le NADH pouvant réagir directement avec l'INT, le gel ne devra pas être incubé trop longtemps avec la solution de coloration, afin de limiter le bruit de fond lié à la coloration du gel et la saturation des bandes contenant des complexes I.*
2. *La coloration du complexe I liée à l'INT n'est pas inhibable à la roténone. cette inhibiteur inhibe le complexe I au niveau de la poche à quinone du complexe I (Figure 8). Il est donc probable que le transfert d'électrons entre le complexe I et l'INT se fasse au niveau du FMN ou des centres fer-souffre.*
3. *L'activité du complexe II doit être nécessairement faite dans un tampon phosphate (type KH_2PO_4) et non dans un tampon respiration (Matériels et méthodes partie 2.2.2.2).*
4. *Il est également nécessaire de faire l'activité du complexe II directement après la migration et dans un tampon phosphate fait avec de l'eau distillée (milli Rho) et non à l'eau ultrapure (milliQ).*
5. *Afin de favoriser la solubilisation de l'INT dans le tampon phosphate, l'INT est rajouté au tampon, puis le tampon soniqué et chauffé (à 37°C) avant l'ajout des autres composants du tampon.*

L'autre molécule est du Diaminobenzidine (DAB) qui lorsqu'il est réduit génère un précipité marron. Le complexe IV est détecté *via* un mélange contenant du tampon RB (pH 7,4), du DAB (1mg/ml) et du cytochrome *c* de cœur de bœuf (0,5mg/ml). Le gel est incubé

sous agitation constante à 37°C (pendant quelques minutes, voir heures), jusqu'à l'apparition de bandes marrons traduisant la présence de complexe IV.

Notes :

1. *L'activité du complexe IV peut être accélérée par l'ajout de cytochrome c, cependant l'ajout de cytochrome c induit une coloration non spécifique du gel. Il faut par conséquent ne pas laisser le tampon d'activité trop longtemps sur le gel.*
2. *Une autre technique pour diminuer le bruit de fond sur le gel est la solubilisation du cytochrome c dans de l'eau milli rho contenant 10mM de tris pH7,4, avant de le rajouter dans le tampon d'activité du complexe IV.*

2.2.4.2 Détection des supercomplexes de la chaîne respiratoire par Immunoblot.

2.2.4.2.1 Western Blot (Native-PAGE).

Une autre méthode pour détecter la présence des complexes de la chaîne respiratoire est de marquer les protéines à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines de ces complexes, comme décrit dans la partie Western blot (SDS-PAGE) (*Matériels et méthodes partie 2.2.3.1*). Une fois la migration terminée, le gel natif est pré-incubé pendant 30min dans du tampon de transfert (0,3% p/v de Tris, 0,44% p/v de glycine, **sans éthanol**) supplémenté avec du SDS (0,2% v/v) et du β -mercaptoethanol (0,2% v/v) pour dénaturer les protéines. Le gel est ensuite lavé à l'eau milli Rho et équilibré dans du tampon de transfert contenant 5% d'éthanol. Un transfert semi-sec du gel est ensuite réalisé à 0.2A pour 2h sur une membrane de PVDF, préalablement activée à l'éthanol et équilibrée dans le tampon de transfert. Une fois le transfert terminé, les protéines et le Coomassie Brilliant Blue permettant de faire migrer les protéines, se trouvent sur la membrane de PVDF et peuvent, comme décrit dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.3.1*, gêner la révélation par fluorescence. Il est donc nécessaire d'enlever cette coloration de la membrane, l'éthanol est l'un des moyens le plus efficace pour cela.

Le PVDF a l'avantage de pouvoir être mis dans un bain d'éthanol sans que la structure de la membrane ne soit altérée. Les membranes de PVDF sont donc incubées dans des bains d'éthanol afin d'enlever le bleu de Coomassie. Une fois le bleu de Coomassie enlevé de la membrane, le PVDF est réactivé dans un tampon TBS et le protocole de saturation-immunodécoration et de révélation décrits dans le *Matériels et méthodes partie*

2.2.3.1 peuvent être utilisés. Les anticorps primaires utilisés pour ces expériences sont les suivants : anti-NDI1 (hôte : lapin ; dilution : 1/1000 ; dilué dans du lait 3% ; réf abcam: ab181848), anti-SDHC (hôte : lapin ; dilution : 1/1000 ; dilué dans du lait 3% ; réf proteintech : 14575-1-AP), anti-CORE1 (hôte : souris ; dilution : 1/1000 ; dilué dans du lait 3% ; réf abcam: ab110252), anti-COX1 (hôte : souris ; dilution : 1/1000 ; dilué dans du lait 3% ; réf thermofisher: #459600), anti-COX5b (hôte : lapin ; dilution : 1/2000 ; dilué dans du lait 3% ; réf proteintech : 11418-2AP).

Notes :

1. *Les protéines n'étant pas dénaturées classiquement comme pendant un SDS-PAGE, il est probable que les anticorps primaires communément utilisés pour les Western Blot (SDS-PAGE) ne fonctionnent pas pour les Western Blot (Native-PAGE). Par ailleurs, comme pour un SDS-PAGE classique, la présence de bande non-spécifique de la bande d'intérêt peut être observée. L'utilisation d'un KO et d'une deuxième dimension (Matériels et méthodes partie 2.2.4.2.2) peut être nécessaire pour contrôler que le signal observé soit le signal d'intérêt.*
2. *Il faut éviter d'agiter et de laisser le gel dénaturer trop longtemps car il induit un élargissement des bandes protéiques et donc une diminution de la résolution de ces bandes.*

2.2.4.2.2 Western Blot (2^{ème} dimension : Native-PAGE/SDS-PAGE)

Lors d'un gel natif les complexes protéiques migrent suivant leurs tailles, leurs charges, leurs formes. Afin d'étudier la composition protéique des différents complexes de la chaîne respiratoire. Pour cela une électrophorèse dénaturante peut être réalisée à partir d'un gel natif. Cette deuxième électrophorèse se fait dans un autre sens de migration (*Figure 35*), cette expérience est également appelée gel 2ème dimension (ou 2D).

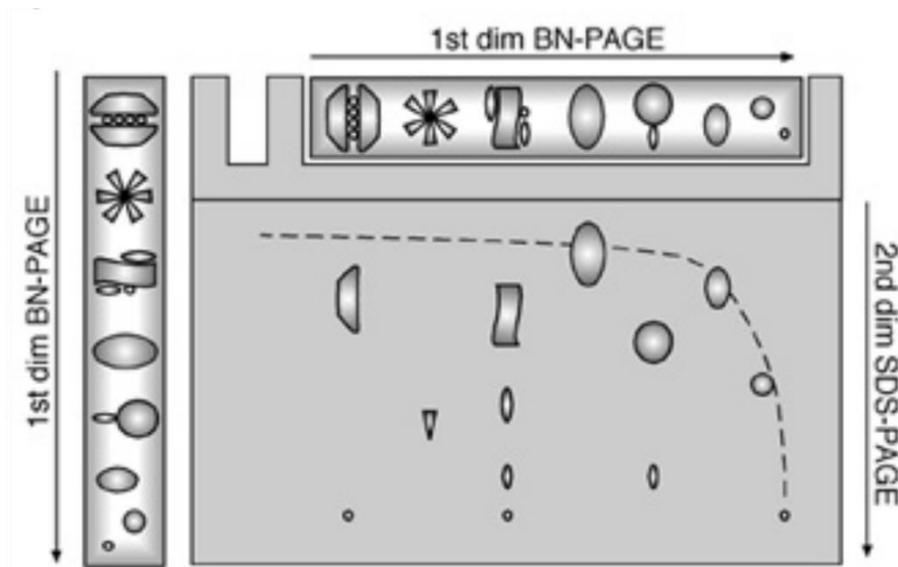


Figure 35. Illustration d'une migration d'un gel deuxième dimension : Native-PAGE/SDS-PAGE (Issue de Fiala et al., 2011).

Les protéines sont d'abord séparées dans une première dimension en condition native (1st dim BN-PAGE). Pour la deuxième dimension, les protéines sont dénaturées au sein du gel d'acrylamide. Les protéines sont ensuite séparées par une nouvelle électrophorèse (2nd dim SDS-PAGE).

Une fois la migration du gel natif terminée, il est pré-incubé pendant 30min dans du tampon de migration qui est, ici, le NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, NP0001) supplémenté avec du β -mercaptoethanol (0,2% v/v) pour dénaturer les protéines. Le gel est ensuite lavé à l'eau milli Rho et équilibré dans du tampon de migration sans β -mercaptoethanol. Une piste du gel est découpée et déposée à l'horizontal dans un gel Invitrogen™ Novex™ NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, 2DWell (Fisher Scientific ; réf : 12090156). Les protéines sont ensuite mises à migrer à 70V. Lorsque la migration de la deuxième dimension est terminée, le gel est transféré sur une membrane de PVDF comme décrit dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.4.2.1*. Les anticorps primaires utilisés sont les mêmes anticorps que ceux décrits dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.4.2.1*.

2.2.5 Dosage des métabolites liés au OXPHOS et au cycle de Krebs.

2.2.5.1 Quantification de métabolites par dosages enzymatiques.

2.2.5.1.1 Dosage du NAD⁺.

En mesurant les flux de consommation d'oxygène (flux de sortie des électrons) la stratégie d'inhibition permet de discriminer les flux respiratoires dépendant des complexes

I et II. Cette stratégie peut être utilisée sur mitochondries intactes et mitochondries perméabilisées. L'étape suivante a été de développer une deuxième approche, permettant de mesurer le flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, notamment en quantifiant le flux de production du NAD^+ sur mitochondries perméabilisées.

Les mitochondries perméabilisées de cœur et de foie (respectivement 50 μg et 100 μg) sont incubées dans une chambre de l'Oroboros contenant 2.1ml de tampon KH_2PO_4 50mM et les différents substrats (NADH, Succinate et Cytochrome *c*, comme décrit dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.2.2*). Lorsque le flux de consommation d'oxygène atteint l'état stationnaire, 150 μl de tampon sont prélevés et sont ajoutés à 50 μl acide perchlorique 7% (PCA ; VWR ; réf : 20587.296). Le PCA permet l'extraction acide des métabolites, l'extraction arrête toute activité métabolique et dégrade le NADH présent dans l'échantillon (Bunoust et al., 2005). Afin de mesurer le flux de production du NAD^+ , une cinétique de cinq prélèvements est réalisée (à t0min, t2,5min, t5min, t7,5min et t10min). Une fois la cinétique terminée, les échantillons sont centrifugés 10min à 30000g à 4°C. Une partie du surnageant est prélevée afin d'être neutralisée (pH 7,4) à l'aide de KOMO (KOH 2M et 0,5M de MOPS). Les échantillons ainsi neutralisés sont centrifugés à 30000g 10min 4°C. Une partie du surnageant est prélevée pour être rajoutée au tampon de dosage du NAD^+ composé de 5mM de G6P, 5U/ml de G6PDDH de *Leuconostoc mesenteroides* (réf : 11079122), dilué dans un tampon triéthanolamine à 50mM) (Bunoust et al., 2005). La G6PDDH de *Leuconostoc mesenteroides* a la propriété de coupler l'oxydation du G6P à la réduction du NAD^+ (*Figure 36*). Le NADH ainsi produit est dosé par absorbance à 340nm, dans une plaques UV 96puits (Greiner bio-one ; UV star ; Réf 655801) sur un lecteur de plaque Tecan Infinite M200 plate reader. Une gamme étalon allant de 1nmol à 25nmol permettra par la suite de calculer la concentration de NAD^+ des échantillons.

Notes :

1. *L'extraction acide dégrade chimiquement le NADH, par conséquent seul le NADH provenant de la réduction du NAD^+ , produit lors de la respiration, par la G6PDH de Leuconostoc est dosé.*
2. *La G6PDH de Leuconostoc est une enzyme utilisant le NAD^+ et non le NADP^+ a contrario des G6PDH de mammifère.*

3. L'ajout d'une concentration connue de NAD^+ est fait après une première lecture de la plaque. Ce contrôle interne permet de contrôler que les conditions expérimentales n'affectent pas la quantification du NAD^+ .

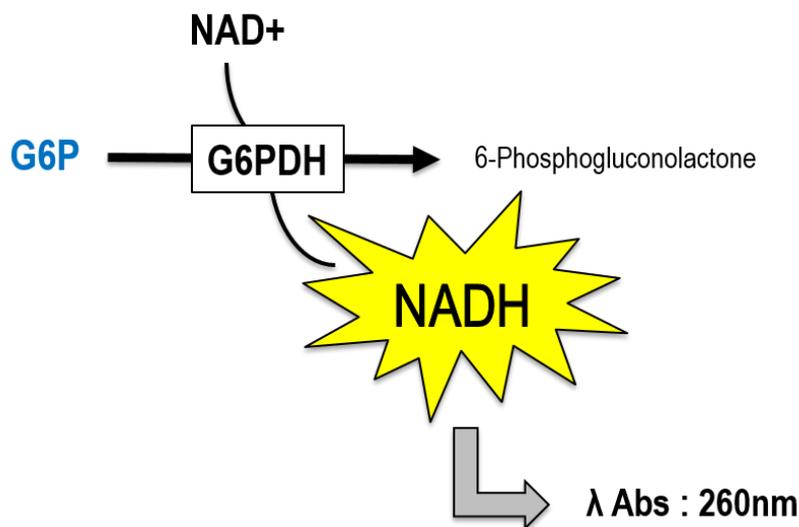


Figure 36. Illustration du principe de quantification de NAD^+ par la G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*.

2.2.5.1.2 Dosage de l'Oxaloacetate.

L'oxaloacetate est un métabolite clé de notre étude et sa quantification est difficile, à cause de sa faible quantité mais également à cause de sa stabilité en solution. Un dosage enzymatique utilisant la citrate synthase a été mis en place pour doser l'oxaloacetate produit dans les différentes conditions de respiration (*Matériels et méthodes partie 2.2.2.1*).

Afin de mesurer la quantité d'oxaloacetate présent dans les différentes conditions de substrats, un minimum de tampon respiration (1ml) est déposé dans l'Oroboros, ainsi que le maximum de mitochondries cardiaques (200 μg) ou hépatiques (1mg) permettant de maintenir des états stationnaires sur plusieurs minutes. Les mitochondries sont incubées 5min dans des conditions de respiration phosphorylante. Suite à l'ajout de 4 μl d'oligomycine (50 $\mu\text{g/ml}$), les mitochondries sont placées 1min en respiration non phosphorylante. Les mitochondries sont placées pendant 2min en respiration découplée, grâce à l'ajout d'une concentration de CCCP comprise entre 0,25 μM et 0,4 μM (qui est définie au préalable à l'aide d'une respiration test pour chacune des conditions).

A la fin de l'incubation, 150µl de tampon respiration sont prélevés, et toute activité métabolique est arrêtée par extraction acide à l'aide de 50µl de PCA 7% w/o EDTA. Cet extrait de métabolites est ensuite centrifugé 10min à 10000g et à 4°C. Une partie du surnageant est prélevée afin d'être neutralisée (pH 7,4) à l'aide de KOMO (KOH (2M), MOPS (0,5M)). Les échantillons ainsi neutralisés sont centrifugés à 30000g 10min 4°C. Une partie du surnageant est prélevée pour être ajoutée au tampon de dosage du Citrate Synthase composé de 200µM de d'acétyl-CoA, 200µM de DTNB ((5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 4U/ml de Citrate Synthase de cœur de porc (réf : Sigma-Aldrich, C3260-200UN), dilué dans un tampon phosphate (50mM, pH7,4). La Citrate synthase utilise l'oxaloacetate pour générer du CoA-SH à partir de l'acétyl-CoA. Le CoA-SH, ainsi produit, réagit avec le DTNB pour former du TNB (5-thio-2-nitro-benzoic acid) qui est un composé absorbant à 412nm (*Figure 37*), Le TNB est dosé ensuite par absorbance à 412nm, dans une plaque UV 96puits (Greiner bio-one ; UV star ; Réf 655801). Une gamme étalon d'OAA allant de 0 à 3nmol est également réalisée afin de pouvoir connaître la quantité d'OAA présente dans chacun des échantillons à partir de l'absorbance mesurées à 412nm. Les dosages sont réalisés dans des plaques UV 96puits (Greiner bio-one ; UV star Ref 655801) sur un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG Labtech).

Notes :

- 1. L'oxaloacetate étant un composé difficile à doser à cause de sa concentration et de sa stabilité (dégradé au cours du temps et très sensible à la température) il est nécessaire de quantifier l'OAA dans les 24h après la neutralisation de l'extrait de métabolites.*
- 2. L'oxaloacetate étant présent en faible quantité, les échantillons doivent être le plus concentrés possible, cependant les conditions choisies doivent permettre de maintenir le système dans un état stationnaire.*
- 3. L'ajout d'une concentration connue de d'OAA est ajouté après une première lecture de la plaque. Ce contrôle interne permet de contrôler si les métabolites présents dans les échantillons ne vont pas affecter la quantification.*

4. Le DTNB doit être solubilisé dans du Tris pH 7,2 avant d'être ajouté à la solution pour éviter qu'il vire trop au jaune et qu'il augmente la ligne de base.

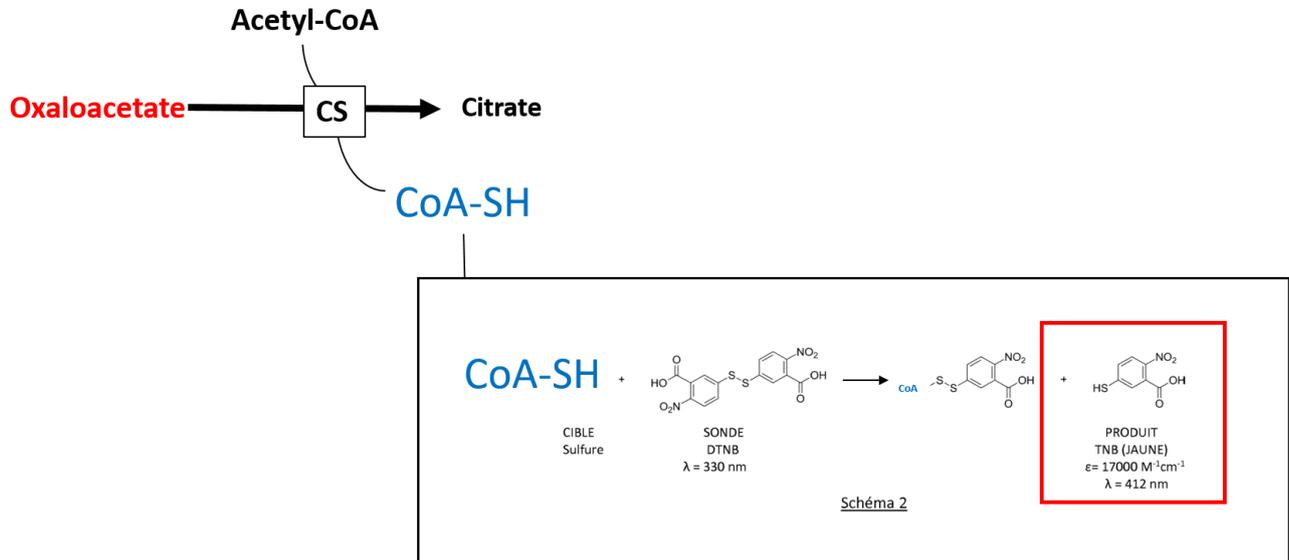


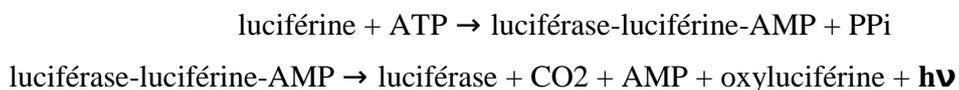
Figure 37. Illustration du principe de quantification de l'oxaloacetate par la citrate synthase de cœur de *Sus scrofa*.

2.2.5.2 Mesure des $J_{\text{ATP}}/J_{\text{O}_2}$.

La mesure du $J_{\text{ATP}}/J_{\text{O}_2}$ traduit le rendement avec laquelle l'énergie provenant de l'oxydation des substrats est convertie en énergie permettant la synthèse d'ATP. Pour avoir accès à cette information, il faut mesurer en simultanée le flux de consommation d'oxygène et le flux de production d'ATP.

Pour cela, les mitochondries cardiaques sont placées dans des conditions de respiration phosphorylante (*Matériels et méthodes partie 2.2.2*). Une fois l'état stationnaire de la respiration obtenue, une première cinétique de quatre prélèvements de 150 μl est faite avec un intervalle de 1 min entre chaque point. Toutes les activités métaboliques de ces prélèvements sont arrêtées par extraction acide à l'aide de 50 μl de PCA 7% w/o EDTA. Afin de connaître les flux parasites, de consommation ou production d'ATP indépendant de l'OXPPOS, de l'oligomycine (50 ng/ml) est rajoutée et une deuxième cinétique de quatre prélèvements est réalisée. Les échantillons sont centrifugés et neutralisés à pH 7,4 comme décrits dans la partie 2.2.5.1.

Une partie du surnageant est prélevée, diluée au dixième (dans un tampon tris 10mM pH 7,4) et quantifiée à l'aide du kit ATPlite 1step PerkinElmer[®]. Ce kit utilise la bioluminescence pour doser l'ATP, cette réaction est catalysée par une luciférase (voir réactions ci dessous).



Chaque extrait est dilué, et une partie est déposée dans un tampon de dosage ATP (contenant 10mM de Tris pH7,4 (qsp 75µl) et 25µl d'ATPlite du kit. L'ATP ainsi produit est dosé par luminescence dans une plaques noire 96puits à fond plat (PS, F-Bottom (chimney well), black cellstar ; REF 655086), et la bioluminescence est dosée sur un lecteur de plaque Tecan Infinite M200 plate reader. Une gamme étalon allant de 10pmol à 1nmol permettra par la suite de calculer la concentration de ATP des échantillons.

2.2.5.3 Etat stationnaire de NADH.

La quantité de NAD(P)H a été mesurée sur mitochondries isolées dans des conditions de respiration phosphorylante, en utilisant respectivement 100µg/ml de mitochondries de cœurs et 250µg/ml de mitochondries de foie, par fluorescence (λ_{exc} 340 nm ; λ_{em} : 460 nm) à 37°C, sous agitation constante avec un spectrofluorimètre FP-8500 (Jasco). Les mitochondries de cœur et de foie ont été diluées dans du tampon MIB+BSA et incubées avec les différentes conditions de substrats respiratoires dans des cuves High Precision Cell quartz glass (10x10mm ; HellmaAnalytics).

2.2.5.4 Dosage de métabolites liés au métabolisme du cycle de Krebs.

2.2.5.4.1 Mesure du flux de production de métabolites du cycle de Krebs.

2.2.5.4.1.1 Cinétique de collecte des échantillons.

De la même manière que décrit dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.2 ci-dessus*, 100µg de mitochondries de cœur sont placées dans 2ml de tampon RB avec différentes conditions de substrats aux concentrations suivantes : ADP (5mM), Succinate (5mM), Pyruvate (5mM), Glutamate (5mM), Malate (1mM) et une concentration de CCCP comprise entre 0,25µM et 0,4µM (définie au préalable à l'aide d'une respiration test pour chacune des conditions). Ainsi, quatre prélèvements de 500µl vont être faits à 0min, 5min,

8min et 12,5min. Toutes les réactions métaboliques sont arrêtées par congélation instantanée (snap freezing) dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés au -80°C.

2.2.5.4.1.2 Quantification en RMN.

Les échantillons sont analysés par RMN à la Plate-forme de Métabolomique et Fluxomique Metatoul (INSA-Toulouse). Les métabolites sont extraits avec un mélange contenant de l'acétonitrile, du méthanol et de l'eau. La proportion finale de chaque solvant est de 2:2:1 en prenant compte le volume de l'échantillon à doser. Ce mélange est vortexé et incubé 20min à -20°C. Ce mix est par la suite évaporé avec un ThermoFisher SpeedVac SC250EXP concentrator. Une fois secs, les échantillons sont ensuite dissous dans 200µl d'eau deutérée (D₂O) contenant 20mM d'acide Trimethyl-silyl-propionique (TSPd4) utilisés comme standard de référence en RMN. Une centrifugation est réalisée pour culoter les débris non solubilisés. Un volume final de 180µl du surnageant est déposé dans un tube RMN de 3mm. Les échantillons sont analysés par RMN 1H-1D avec un spectromètre Bruker Ascend 800 MHz NMR équipé d'un QPCI cryoprobe de 5mm. Une séquence quantitative zgpr30 a été utilisée avec 64k points acquisitions pendant 128scans. Le temps total de répétition entre les scans a été fixé à 7 secondes. La concentration de malate, de fumarate, d'aspartate et d'α-cétoglutarate a été quantifiée en fonction de leurs spectres RMN 1H-1D en utilisant le standard interne TSPd4.

Notes :

1. *La quantification RMN est quantitative par elle-même, elle ne nécessite pas de rajouter de standard interne à l'intérieur de chaque expérience pour chaque métabolite a contrario de la spectrométrie de masse. Néanmoins il est nécessaire d'avoir une gamme étalon avec les métabolites à doser pour pouvoir appréhender l'impact de la préparation des échantillons sur la concentration finale mesurée.*
2. *L'un des problèmes majeurs de la détection de métabolites est leurs prévalences au sein des échantillons, la RMN est moins sensible que la spectrométrie de masse. Cependant, la RMN offre l'avantage d'être moins restrictive en termes de solvant et de concentration de sels dans les échantillons. Une grande quantité de sels est présente dans nos échantillons (à cause du PCA, KOMO ou RB) ne permettant pas l'utilisation de la spectrométrie de masse.*

2.2.5.4.2 Discrimination des métabolites intra-mitochondriaux et extra-mitochondriaux.

2.2.5.4.2.1 Collecte des échantillons.

Afin de pouvoir déterminer quels sont les métabolites qui peuvent être produits, transportés, qui peuvent s'accumuler à l'intérieur des mitochondries, il est nécessaire de pouvoir discriminer les métabolites intra-mitochondriaux et extra-mitochondriaux. Pour cela, j'ai utilisé des stratégies de filtration à l'aide de filtre PVDF ou la filtration à l'aide d'huile.

Les mitochondries cardiaques (800µg/ml) sont incubées dans du tampon RB-BSA avec les différentes conditions de substrats (*Matériels et méthodes partie 2.2.2.1*), l'Oroboros servant de chambre d'incubation. Les mitochondries sont incubées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.5.1.2*.

2.2.5.4.2.2 Séparation du milieu intra et extra-mitochondrial.

Une fois l'incubation faite, la totalité du tampon RB-BSA est prélevée (soit environ 800µg de mitochondries). Les 1ml de mitochondries sont déposées sur une couche d'huile nommée AR-20-AP150 (6 : 4), composée d'un mélange de deux huiles : la Silicone oil AR 20, (Sigma-Aldrich ; réf : 10836-100ML) et la Silicone oil AP 150 Wacker, (Sigma-Aldrich ; réf : 50384-250ML-F) avec un ratio (6:4) (*Figure 38*). L'huile permet de créer une barrière physique séparant, d'une part, la fraction supérieure contenant les mitochondries et le milieu extra-mitochondrial, et de l'autre part, le solvant dans lequel seront transférées les mitochondries ayant traversées l'huile. Ce solvant se trouvant sous l'huile est soit du MIB, permettant de caractériser les mitochondries passées à travers l'huile (intégrité membranaire, rendement de passage à travers l'huile, soit du PCA 7% permettant d'arrêter toutes activités métaboliques des objets assez denses pour pouvoir passer l'huile (notamment les mitochondries). Une fois que les mitochondries ont été déposées sur l'huile, les tubes sont centrifugés 10min à 30000g à température ambiante. Par la suite, la fraction supérieure peut être prélevée et quenchée au PCA 7% afin de doser les métabolites du milieu extra-mitochondrial, notamment par analyse RMN. Enfin, un maximum de la fraction inférieure (de PCA ou DMSO) contenant les métabolites mitochondriaux est prélevé (en prenant garde de ne pas prélever d'huile et des protéines) soit pour être conservée au -80°C, soit pour tenter de quantifier l'OAA comme décrit dans le *Matériels et méthodes partie 2.2.5.1.2*.

Notes :

1. *En étant relargués à l'extérieur de la mitochondrie, les composés peuvent s'accumuler et être présents dans de fortes concentrations par rapport aux concentrations présentes à l'intérieur des mitochondries. Le volume matriciel des mitochondries étant intrinsèque à ces dernières (voir partie 5), il est nécessaire d'avoir les concentrations intra-mitochondriales pour avoir la concentration réelle des métabolites dans les mitochondries.*
2. *Lors de la mise au point des expériences, il a été observé que les mitochondries peuvent passer la couche d'huile sans que leurs qualités ne soient altérées, avec un rendement approchant les 100% (par rapport à la respiration et à la quantité de protéines) (Figure 47).*
3. *Afin de savoir si certains métabolites comme l'OAA peuvent traverser l'huile par eux même, le même protocole a été suivi en remplaçant les mitochondries par de l'OAA. Le résultat de ces expériences montre que l'OAA n'est pas échangé entre les deux fractions.*
4. *Le meilleur contrôle permettant de savoir si la fraction supérieure s'est mélangé avec le solvant d'extraction (PCA) est le sucrose en RMN. S'il est détecté dans la fraction inférieure en RMN ou en spectrométrie de masse, c'est qu'il y a eu échange et donc que les métabolites intra-mitochondriaux sont contaminés avec les métabolites extra-mitochondriaux.*
5. *Afin de rendre compatible cette stratégie avec la spectrométrie de masse, le PCA (composé de beaucoup de sel) a été remplacé par le DMSO. Les datas préliminaires montrent qu'il est possible d'avoir toujours trois phases, que les mitochondries peuvent traverser le DMSO. Il semble y avoir un problème lors de l'évaporation des échantillons en DMSO. Néanmoins, l'utilisation de DMSO ou d'acide formique peuvent être des pistes intéressantes à développer pour rendre cette technique compatible avec la spectrométrie de masse.*

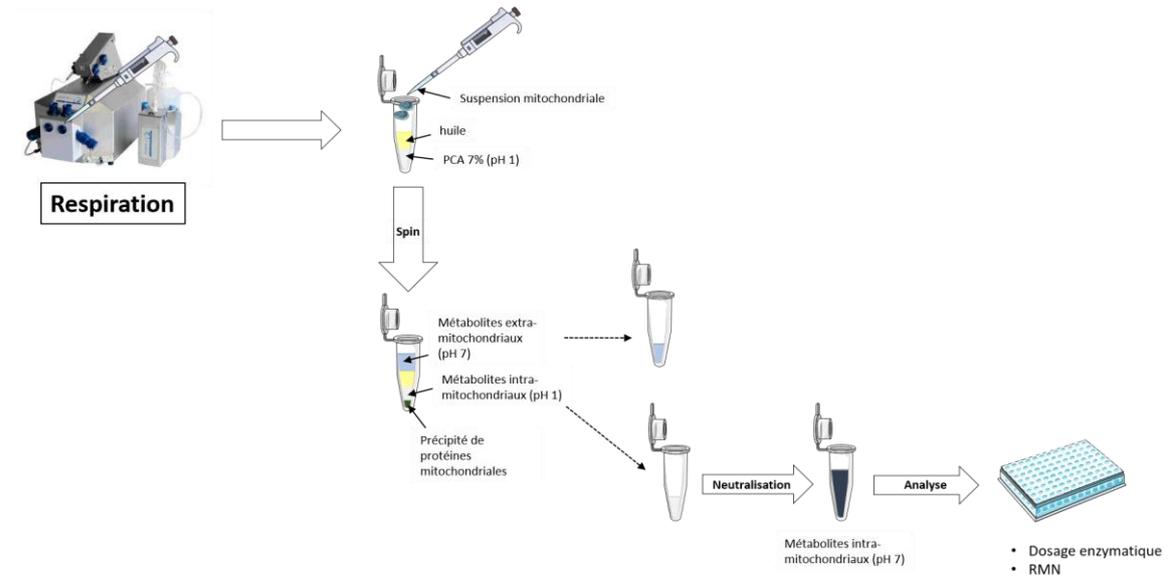
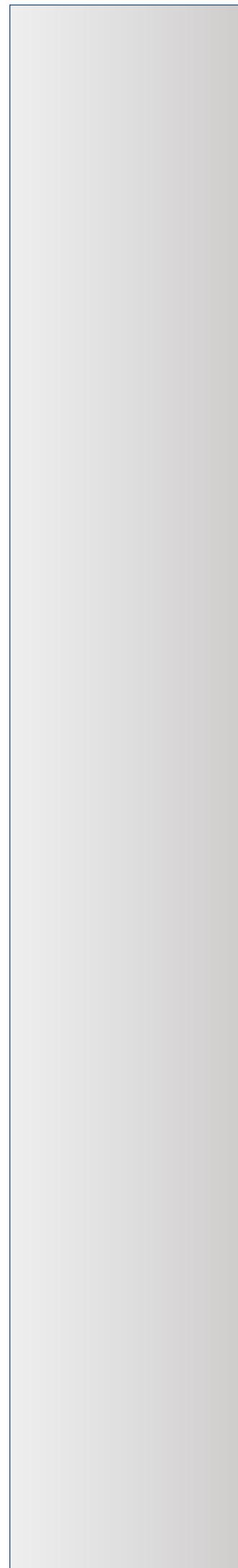


Figure 38. Illustration du protocole de séparation du milieu extra-mitochondrial et intra-mitochondrial grâce à la filtration sur huile.

**COX7A2L promeut la
réorganisation de
supercomplexes sans affecter la
bioénergétique mitochondriale**



3 Article 1.

3.1 Etat de l'art :

Afin d'étudier le rôle fonctionnel des supercomplexes plusieurs modèles sont utilisés (1) ceux caractérisant la perte des supercomplexes induite par une forte diminution d'un complexe de la chaîne respiratoire (Moreno-Lastres et al., 2012; Protasoni et al., 2020), et (2) ceux caractérisant la perte des supercomplexes induite par la perte d'un de leur facteur assemblage (*partie 1.2.3.2*) (Chen et al., 2012; Desmurs et al., 2015; Hock et al., 2020; Lapuente-Brun et al., 2013; Timón-Gómez et al., 2020). Ces modèles génétiques permettent d'étudier et d'observer une désorganisation ou une réorganisation des supercomplexes, mais génèrent de vifs débats au sein de la communauté scientifique. Et pour cause, ces modèles possèdent également une diminution drastique du niveau protéique de certains complexes, dont certains induisent un défaut bioénergétique massif (Hock et al., 2020; Protasoni et al., 2020; Timón-Gómez et al., 2020; Vempati et al., 2009). Ces changements de stœchiométrie entre les différents complexes de la chaîne respiratoire ne permettent pas de déterminer si les capacités bioénergétiques, les remodelages, l'assemblage dépendent de la réorganisation des supercomplexes ou bien du changement de stœchiométrie entre les complexes. De plus, les facteurs d'assemblages étudiés induisent une diminution de l'enrichissement de certains supercomplexes mais pas une absence totale de ces derniers. Introduisant donc des nuances quant à leurs rôles : sont-ils des facteurs d'assemblages des supercomplexes, ou des facteurs intervenant dans la biogenèse ou la stabilité des complexes isolés.

3.1.1 COX7A2L, la première protéine découverte comme étant impliquée dans le remodelage des supercomplexes de mammifère.

Dans cette première partie de ma thèse, je me suis attaché à caractériser le rôle hautement controversé de COX7A2L, décrite comme permettant de modifier l'organisation supramoléculaire des supercomplexes. Cette protéine, initialement nommée COX7RP ou COX7AR, est l'acronyme de « Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like » également appelée SCAFI pour « supercomplex assembly factor 1 ». Elle possède un haut degré d'homologie avec la protéine COX7A, une protéine présente dans le complexe IV (Lapuente-Brun et al., 2013). L'étude du rôle de COX7A2L dans l'organisation des

supercomplexes a été initié par les travaux du Pr. ENRIQUEZ, qui a été le premier a proposé que cette protéine permettrait de moduler l'organisation des supercomplexes chez le mammifère (Lapunte-Brun et al., 2013). Pour cela, son équipe a solubilisé les protéines mitochondriales à l'aide de digitonine, et les supercomplexes ont été séparés par BN-PAGE. Par la suite, ils ont découpé les bandes du gel d'acrylamide contenant les supercomplexes pour analyser la composition protéique de chacune d'entre elles par spectrométrie de masse (Lapunte-Brun et al., 2013). Par cette stratégie, nommée « complexome profiling », ils ont pu mettre en évidence que COX7A2L semblait être présente dans les SC III₂-IV et les respirasomes (SC I-III₂-IV) mais pas dans les complexes III et IV isolés (Lapunte-Brun et al., 2013; Müller et al., 2016). Cette protéine interagirait préférentiellement avec le complexe III mais pourrait également interagir avec le complexe IV lorsque ceux-ci sont associés en supercomplexes. Des travaux plus récents sembleraient montrer que cette protéine est assemblée dans les étapes intermédiaires de formation du complexe III (pré-CIII non fonctionnel), alors qu'il semble s'associer avec le complexe IV lorsque celui-ci est pleinement assemblé (*Figure 39*) (Fernández-Vizarra and Zeviani, 2015; Pérez-Pérez et al., 2016).

De plus, l'équipe du Pr. ENRIQUEZ a pu mettre en évidence l'existence de deux isoformes de COX7A2L : une forme longue, de 113 acide aminés, et une forme courte, de 111 acide aminés, la première étant plus stable que l'autre (Lapunte-Brun et al., 2013). Ils ont pu observer que les fonds génétiques de souris CBA, 129, NZB et CD1 étaient

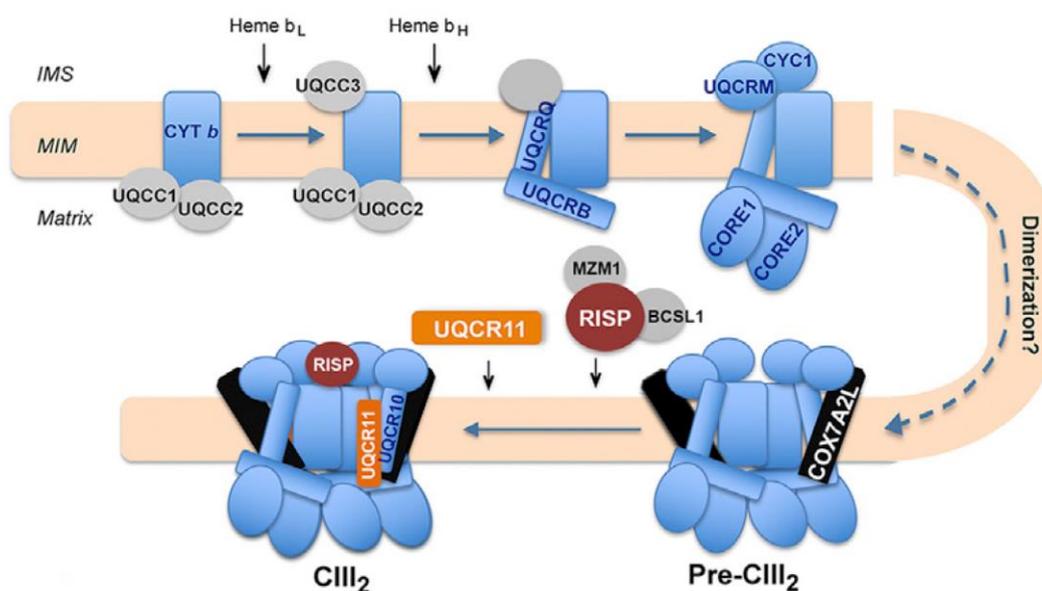


Figure 39. Illustration du modèle d'assemblage du complexe III et de l'incorporation de COX7A2L dans ce dernier (Issue de la Figure 3G de l'Article 1, Lobo-Jarne et al., 2018).

naturellement homozygotes pour l'isoforme longue alors que les fonds génétiques C57BL/6J et Balb/cJ, qui sont les fonds génétiques les plus utilisés, étaient homozygotes pour la forme courte. Le débat qui a découlé de cette observation provient de l'analyse du rôle de COX7A2L dans le fonctionnement des supercomplexes et du rôle de ces derniers dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, en comparant différents fonds génétiques de souris, ils ont observé que COX7A2L sous sa forme longue était nécessaire pour la formation des supercomplexes, notamment des SC III₂-IV et, de manière surprenante, des respirasomes (SC I-III₂-IV). De plus, ils ont observé que seule la réexpression de l'isoforme longue de COX7A2L, dans les lignées cellulaires possédant la forme courte, permettrait la formation de ces supercomplexes (Lapiente-Brun et al., 2013). Ils en ont donc déduit que seule l'isoforme longue était fonctionnelle. Ils ont, par la suite, utilisé ces différents fonds génétiques de souris pour étudier l'impact de la réorganisation des supercomplexes sur les caractéristiques bioénergétiques de ces lignées. Ils en ont déduit que les différences de flux de production d'ATP, ainsi que les différences de flux de consommation d'oxygène et de production de fumarate entre les fonds génétiques dépendaient de l'association en supercomplexe du complexe IV, liées à la présence de l'isoforme fonctionnelle de COX7A2L, s'affranchissant des nombreuses autres modifications génétiques et métaboliques existant et distinguant les différents fonds génétiques souris (Lapiente-Brun et al., 2013).

3.1.2 Le « plasticity model ».

Comme décrit en introduction, le modèle « solid state » propose que l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire canalise les transporteurs mobiles d'électrons. Cette canalisation permettrait, notamment, d'améliorer les capacités de la chaîne respiratoire et de favoriser le flux d'électrons provenant des complexes associés en supercomplexes (*Partie 1.2.2*). Par conséquent, d'après ce modèle, chez le mammifère, l'entrée des électrons par le complexe I serait favorisée sur ceux du complexe II, et l'association des complexes III et IV devrait améliorer le flux d'électrons. A partir du modèle « solid state » et d'après les observations obtenues dans leurs travaux, Pr. ENRIQUEZ a proposé un modèle alternatif, appelé « plasticity model », afin d'expliquer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et du rôle de l'organisation supramoléculaire, notamment l'impact de COX7A2L sur les capacités des complexes, ainsi que sur la priorisation des flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il pose l'hypothèse, que COX7A2L permettrait de segmenter la chaîne respiratoire et ainsi de distinguer

plusieurs populations de complexes IV (*Figure 40A*). Le complexe IV, en étant associé ou non en supercomplexes, permettrait de donner des voies alternatives aux flux d'électrons provenant du complexe I associé ou du complexe II non associé. Dans ce modèle, lorsque l'isoforme courte de COX7A2L (non fonctionnelle) est exprimée, les complexes III et IV ne sont plus associés en supercomplexes, une seule population de complexes IV est donc présente. Ces derniers reçoivent tous les électrons de la chaîne respiratoire, provenant de toutes les ubiquinone oxydoréductases approvisionnées en substrats (*Figure 40B*). Lorsque l'isoforme longue (fonctionnelle) est exprimée, trois populations de complexe IV seraient présentes pour recevoir les électrons provenant : du complexe I (CIV_{NADH}), du complexe II (CIV_{FAD}) ou des deux (CIV_{both}) (*Figure 40A*).

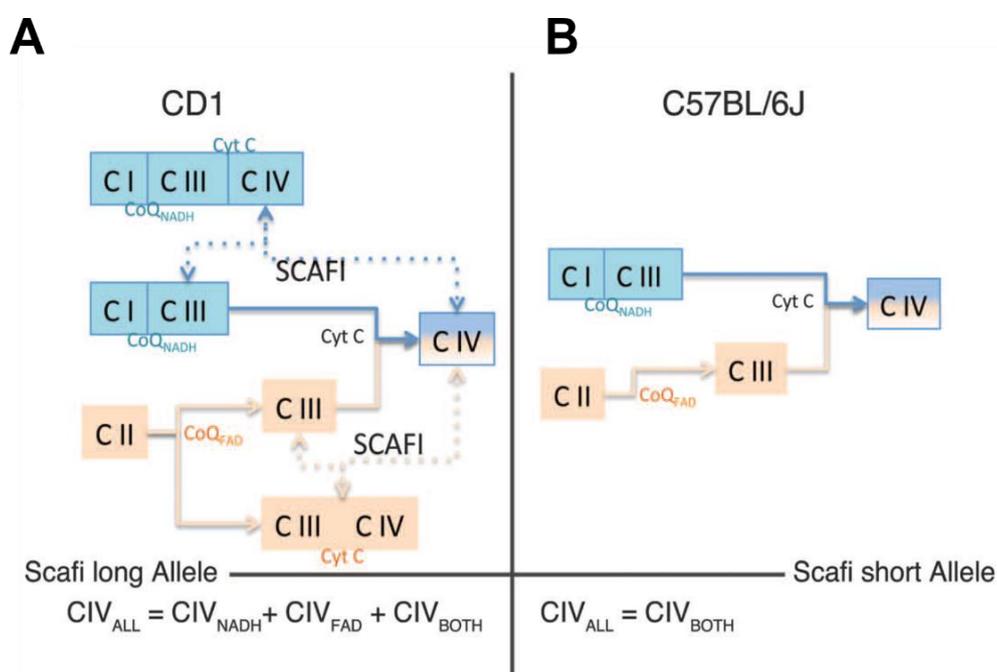


Figure 40. Illustration décrivant le « plasticity model » (Issue de Lapuente-Brun et al., 2013).

Ce modèle décrit l'implication fonctionnelle des isoformes de COX7A2L dans les remodelages des supercomplexes. La présence de l'isoforme longue permet de réguler l'association du complexe IV en supercomplexes et de générer trois populations de complexes IV recevant les électrons de diverses déshydrogénases (CIV_{NADH} , CIV_{succ} , CIV_{Both}) (illustration de gauche, des souris CD1). Ce modèle montre l'association en supercomplexes du complexe I avec sa population d'ubiquinones, canalisant les électrons au sein des respirasomes (SC I-III₂-IV) et des SC I-III₂ (en bleu). Ces supercomplexes coexistent avec les SC III₂-IV et les complexes II, III et IV libres. Les électrons provenant du complexe II, par les ubiquinones non canalisées (en jaune), passent spécifiquement par le SC III₂-IV, mais partage avec le complexe I la population de complexe IV libre. L'isoforme courte de COX7A2L non fonctionnelle entraîne une perte de l'association du complexe IV en supercomplexe (illustration de droite, des souris C57BL/6J), impliquant une seule population de complexes IV libre, recevant les électrons des complexes I et II.

Ils émettent l'hypothèse que ces différentes populations de complexes IV, associées en supercomplexe permettraient d'éviter la saturation du système avec les électrons provenant d'un seul des complexes, afin d'éviter le phénomène de compétition entre les donneurs d'électrons décrit dans la *partie 1.2.3.3.3*, et donc permettraient d'optimiser l'oxydation de plusieurs substrats en même temps (Lapiente-Brun et al., 2013).

De ces travaux ont découlés de nombreuses hypothèses sur le fonctionnement des supercomplexes (Acin-Perez and Enriquez, 2014), ainsi que sur leurs rôles physiologiques voire pathologiques (Protasoni and Zeviani, 2021). Cependant, ces travaux sont vivement remis en question, notamment à cause de la stratégie expérimentale reposant sur la comparaison de différents fonds génétiques de souris et par l'absence de réelles lignées *knockout* de *COX7A2L*. Ces résultats sont très débattus du fait qu'ils soient en contradiction avec ceux obtenus par plusieurs laboratoires indépendants, que ce soit pour le rôle de *COX7A2L* ou par rapport au modèle de fonctionnement des supercomplexes (Fedor and Hirst, 2018; Mourier et al., 2014a; Pérez-Pérez et al., 2016).

3.2 Résumés des résultats de l'article.

Mon premier article de thèse avait pour objectif de déterminer le rôle de *COX7A2L* dans l'organisation des supercomplexes et le rôle que pouvait jouer le désassemblage de ces derniers dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. C'est dans le cadre d'une collaboration avec les Pr. UGALDE et Pr. BARRIENTOS, que j'ai pu caractériser bioénergétiquement les premières lignées KO *COX7A2L*, sur deux modèles de lignées cellulaires immortalisées en culture : des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK293), et des glioblastomes astrocytaires humains (U87). Mon travail dans ce projet a été de mettre en place une stratégie permettant de distinguer le flux respiratoire dépendant de l'activité du complexe I et du complexe II dans des conditions où les deux sont approvisionnés en électrons. Dans ces travaux, j'ai étudié les caractéristiques bioénergétiques de ces lignées afin de déterminer (1) si le remodelage des supercomplexes influençait les capacités bioénergétiques des cellules, (2) si la réorganisation des supercomplexes influençait le fonctionnement des complexes I et II et leurs capacités à alimenter la chaîne respiratoire en électrons, et (3) si des conditions de stress modifiaient la répartition du flux respiratoire provenant du complexe I et du complexe II, afin d'observer si la perte de *COX7A2L* limitait la flexibilité métabolique de ces chaîne respiratoire.

3.2.1 Mise en place du premier mutant *COX7A2L*.

Les lignées stables KO *COX7A2L* ont été générées par le laboratoire du Pr. BARRIENTOS grâce à la technologie TALEN (transcription activator-like effector nucleases). Cette technologie permet d'insérer des erreurs dans un des codons du gène d'intérêt afin de rendre la protéine non fonctionnelle, voire absente. Une paire de TALEN a été générée pour cibler une séquence à l'intérieur du premier exon du gène *COX7A2L* (*Article1 Figure 1A*). Une sélection clonale ainsi que l'analyse protéique, par immunodétection de *COX7A2L*, d'une centaine de clones a été réalisée et cinq clones dans lesquels *COX7A2L* n'était plus exprimée ont été sélectionnés (*Article1 Figure 1B*).

Cette stratégie a permis l'obtention du premier modèle de lignées cellulaires humaines dans lequel la protéine *COX7A2L* est absente de manière stable. L'utilisation de cellules en culture présente plusieurs avantages. Le premier étant l'expression ectopique des isoformes courtes ou longues de *COX7A2L*, permettant d'étudier le rôle de ces deux isoformes dans la structuration des supercomplexes. Le deuxième étant de pouvoir challenger le modèle en le stressant, en changeant la source de carbone ou en inhibant les complexes de la chaîne respiratoire, par exemple, afin d'étudier l'adaptabilité du système et le rôle de *COX7A2L* dans cette flexibilité métabolique.

3.2.2 *COX7A2L* est nécessaire pour le maintien de certains supercomplexes.

Une fois les clones sélectionnés, ils ont observé que *COX7A2L* était nécessaire pour le maintien ou la formation du SC III₂-IV mais pas pour le respirasome (SC I-III₂-IV), sur les lignées HEK et U87 par électrophorèse non dénaturante (BN-PAGE) (*Article1 Figure 1D*), confirmant les résultats obtenus chez la souris (Mourier et al., 2014a; Pérez-Pérez et al., 2016). L'isolement de mitochondries de cellules leur a permis d'enrichir et d'observer des supercomplexes moins abondants tels que les mégacomplexes, qui sont des respirasomes comportant une stœchiométrie des complexes supérieure à I₁-III₂-IV₁ (*Article1 Figure 2A*) (Bultema et al., 2009; Guo et al., 2017). Ils ont pu montrer que la perte de *COX7A2L* induit une diminution de la quantité de ces mégacomplexes, qui restent cependant toujours présents. Ainsi, *COX7A2L* n'est pas nécessaire pour leurs formations, mais elle pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de ces mégacomplexes.

Ils ont pu observer que le désassemblage du SC III₂-IV était corrélé avec une légère augmentation de la quantité de complexe III₂ libre dans les KO, mais pas des autres

complexes de la chaîne respiratoire, comme le montre les activités enzymatiques (*Article1 Figure 2E*). C'est donc le premier modèle permettant l'abolition absolue d'un type de supercomplexes sans affecter drastiquement la quantité des complexes de la chaîne respiratoire chez le mammifère.

Pour aller plus loin, des expériences visant à étudier la cinétique d'assemblage des supercomplexes a été faite grâce à de la doxycycline. La doxycycline permet d'arrêter la traduction des protéines mitochondriales (Moreno-Lastres et al., 2012). Un traitement de plusieurs jours permet de drastiquement réduire la quantité des complexes de la chaîne respiratoire partiellement encodés par l'ADN mitochondriale, le niveau résiduel est inférieur à 5-10% par rapport à la condition non traitée. En effet, les sous-unités de la chaîne respiratoire codées par le génome mitochondrial sont essentielles pour le maintien des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire. Cette expérience permet d'observer les cinétiques de formation des différents supercomplexes par BN-PAGE (*Article1 Figure 3A-E*). Les cinétiques d'assemblages montrent un léger retard dans la formation du complexe I et des respirasomes, bien que la cinétique d'assemblage du complexe IV ne soit pas affectée par l'absence de COX7A2L. Il semblerait également que l'augmentation de la quantité de complexe III₂ ne soit pas seulement liée au désassemblage du SC III₂-IV, mais pourrait être liée à une augmentation de la biogenèse du complexe III₂. Néanmoins, ces données semblent confirmer que COX7A2L a un rôle sur le remodelage du SC III₂-IV et le maintien des mégacomplexes, *via* celui de l'interaction entre les complexes III et IV. De plus, nos observations montrent que la formation des respirasomes est indépendante de COX7A2L, ainsi que du SC III₂-IV.

3.2.3 L'isoforme courte de COX7A2L ne permet pas le maintien du supercomplexe III₂-IV chez l'humain.

Chez l'humain, par opposition avec la souris, une seule forme de COX7A2L comportant 114 acides aminés a été répertoriée. Le COX7A2L humain est un homologue de la forme longue observée chez la souris. Afin d'étudier la possible implication d'une isoforme courte chez l'humain, par extension à l'isoforme courte observée chez la souris, nos collaborateurs ont généré une isoforme longue et une isoforme courte « artificielle » de COX7A2L humaine taguée avec un FLAG. Ils ont observé que l'expression de ces protéines n'allait pas influencer la quantité des complexes de la chaîne respiratoire (*Article1 Figure 6A*), ni la quantité des respirasomes (*Article1 Figure 6C-D*). Les expériences de gel natif deuxième dimension (2D-BN/SDS-PAGE) montrent que

l'isoforme courte n'affecte pas la liaison de COX7A2L avec le complexe III₂ ou le SC I-III₂, mais cette isoforme ne possède pas la capacité d'interagir avec le complexe IV ou de s'incorporer dans tous les supercomplexes contenant du complexe IV (*Article1 Figure 6B*), à l'instar de ce qui a été précédemment décrit chez la souris (Pérez-Pérez et al., 2016). De plus, ils ont pu observer que, contrairement à l'isoforme courte, l'expression de l'isoforme longue dans les cellules KO permettait de restaurer le niveau de complexes III₂, de mégacomplexes et de la formation du SC III₂-IV (*Article1 Figure 6B-D*). Ainsi, c'est l'interaction, médiée par COX7A2L, entre les complexes III₂ et IV qui permet le maintien de tous ces paramètres et non pas la présence de COX7A2L dans le complexe III.

3.2.4 La perte de COX7A2L n'affecte pas le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Au cours de ce projet, j'ai caractérisé bioénergétiquement ces nouvelles lignées. J'ai notamment déterminé si les restructurations des supercomplexes, observées lors de la perte de COX7A2L, modifiaient l'activité de la chaîne respiratoire ou les capacités des complexes I et II à approvisionner en électrons la chaîne respiratoire.

3.2.4.1 Stratégie expérimentale.

Afin, d'étudier les capacités d'approvisionnement de la chaîne respiratoire par le complexe I et le complexe II, lorsqu'ils sont alimentés seuls ou simultanément, il est crucial de pouvoir contrôler l'approvisionnement en substrats de ces complexes. Pour ce faire, j'ai perméabilisées les cellules afin de fournir aux mitochondries les métabolites choisis, en concentration non limitante. Le succinate, par exemple, ne passe pas la membrane plasmique mais peut être transporté à l'intérieur des mitochondries, la perméabilisation des cellules permet donc d'approvisionner *ad libitum* le complexe II en substrats.

Un autre de mes objectifs était de discriminer les flux respiratoires provenant du complexe I et du complexe II, dans des conditions où la chaîne respiratoire est simultanément approvisionnée en électrons par ces deux complexes. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs du complexe I, que sont la roténone ou la piericidine A (*partie 1.1.2.1.1*), des inhibiteurs du complexe II, que sont le malonate ou l'atpenine A5 (*partie 1.1.2.1.2*), et également un inhibiteur du complexe III, qu'est l'antimycine A (*partie 1.1.2.1.4*). Ce dernier permettant de déterminer que le flux respiratoire non inhibé par la

roténone et l'Atpenin A5 provient des autres ubiquinone oxydoréductases, telles que la mG3PDH (*partie 2.1.4*).

3.2.4.2 Caractérisation bioénergétique des lignées cellulaires HEK et U87 KO COX7A2L.

Dans un premier niveau d'analyse, j'ai pu caractériser (i) les capacités respiratoires provenant du complexe I lorsque le NADH est généré par les déshydrogénases matricielles (Pyruvate, Glutamate et Malate) et le complexe II est inhibé, et (ii) la respiration provenant du complexe II et de la mG3PDH en présence de succinate et de G3P et d'inhibiteurs du complexe I. J'ai pu mettre en évidence que la respiration provenant du complexe I était 2 et 4 fois supérieure, pour les respirations phosphorylante et découplée, aux respirations dépendantes du complexe II (*Article1 Figure 4A-D et 5F*). De plus, en conditions découplées, les capacités respiratoires en présence des substrats des complexes I et II sont égales à la somme des capacités respiratoires des respirations spécifiques des complexes I et II isolées (*Article1 Figure 4A-C*). L'absence de COX7A2L n'induit aucune différence de flux respiratoires quels que soient les substrats respiratoires en présence, et ce, pour tous les états énergétiques étudiés (*Article1 Figure 4A-C et 5F*).

Il est supposé que les supercomplexes pourraient permettre de favoriser le flux des électrons provenant des complexes associés (Schagger, 2000), ou bien limiter la compétition à l'entrée des électrons en optimisant le flux provenant des différentes ubiquinone oxydoréductases du système (Lapiente-Brun et al., 2013). L'utilisation d'inhibiteurs a permis d'observer que les respirations seulement dépendantes du complexe I (*Article1 Figure 4A*) ou du complexe II (*Article1 Figure 4B*) étaient égales aux respirations sensibles à l'inhibition des complexe I ou complexe II (*Article1 Figure 4C*), lorsque les complexes sont simultanément approvisionnés en substrats. Les mitochondries, dans ces conditions, réoxydent donc le NADH et le succinate au maximum de leurs capacités, que les complexes soient approvisionnés séparément ou simultanément.

En utilisant la stratégie d'inhibition, j'ai pu mettre en évidence que la répartition du flux respiratoire en substrats multiples est d'environ 70% de complexe I pour 25% de complexe II pour les lignées HEK, et d'environ 65% de complexe I pour 15% de complexe II pour les lignées U87, aucune différence dans la répartition des flux respiratoires n'est observable entre les lignées contrôles et KO COX7A2L (*Article1 Figure 4D et Figure 5F*). Cette observation montre que la réorganisation des SC III₂-IV dans ces lignées n'affecte pas les capacités respiratoires des complexes I et II quels que soient les états respiratoires.

Cela suppose que le flux respiratoire du complexe II ne dépend pas de l'organisation supramoléculaire des complexes III et IV. Ceci tend à montrer qu'il n'y a pas de canalisation du cytochrome *c* entre ces complexes. De plus, les capacités de réoxydation du NADH et succinate étant maximales et indépendantes de la présence de COX7A2L, cela montre qu'il n'y a pas de phénomène de compétition à l'entrée des électrons entre les complexes I et II lié à la présence de différentes populations de complexes IV, comme supposé par le « plasticity model » (Lapiente-Brun et al., 2013).

Afin de challenger le système pour étudier la flexibilité métabolique des chaînes respiratoires possédant ou non COX7A2L, le galactose a été utilisé comme source carbonée lors de la croissance des cellules pour solliciter le métabolisme mitochondrial (Robinson et al., 1992; Soderberg et al., 1980). Le galactose peut approvisionner la glycolyse par l'intermédiaire de la voie de Leloir, qui permet de transformer le D-galactose en glucose-6-phosphate. Cependant, l'entrée du galactose dans les cellules étant beaucoup plus lente que celle du glucose, et la voie de Leloir étant plus lente que l'hexokinase, le métabolisme du galactose impose un frein cinétique à la glycolyse contraignant les capacités de celle-ci à maintenir le potentiel phosphate. Les cellules favorisent, par conséquent, le métabolisme mitochondrial pour générer l'ATP manquant. La croissance en galactose induit une augmentation de la respiration, mais là encore la contribution respective des complexes I et II dans l'approvisionnement en électrons de la chaîne respiratoire reste inchangée (*Article1 Figure 5F*). De plus, la répartition des flux provenant du complexe I et du complexe II sont les mêmes que ceux observés en glucose (*Article1 Figure 5F, données non montrées pour les HEK*). La respiration provenant du complexe I est trois fois supérieure à celle du complexe II, et aucune différence n'est notable entre les lignées (*Article1 Figure 5F*). Ainsi, COX7A2L ne semble pas impacter les capacités respiratoires lorsque le métabolisme mitochondrial est favorisé, il ne semble pas non plus rediriger les flux de consommation d'oxygène entre les complexes I et II.

Afin d'étudier la réorientation des flux respiratoires et la possible compensation de respiration liée à une défaillance d'un des deux complexes, comme supposé par le « plasticity model », les cellules ont été cultivées pendant 48h en présence d'un inhibiteur du complexe I, la piericine A. Les concentrations de l'inhibiteur ont été optimisées pour que la totalité du flux respiratoire lié au complexe I soit abolie. Dans ces conditions, aucun flux respiratoire provenant du complexe I n'est détectable, la totalité du flux respiratoire provient du complexe II ou de la mG3PDH (*Article1 Figure 4G*). Dans ces conditions, les capacités respiratoires du complexe II et de la mG3PDH restent inchangées entre les

cellules qui ont été cultivées avec l'inhibiteur du complexe I et les cellules cultivées sans traitement (*Article 1 Figure 4B-G*). De plus, aucune différence significative entre les lignées contrôle ou KO *COX7A2L* n'est observable. Il n'y a donc pas de mécanisme permettant de compenser, même partiellement, la perte de respiration liée au complexe I par la respiration liée au complexe II comme supposé par Pr. ENRIQUEZ (Lapunte-Brun et al., 2013). Cette dernière observation démontre une nouvelle fois qu'il n'y a pas différentes populations de complexes IV. Si l'absence de *COX7A2L* induisait un partage du même pool de complexe IV par le complexe I et II, l'inhibition de la respiration liée au complexe I devrait être compensée par respiration provenant du complexe II.

3.3 Discussion.

L'étude de la protéine *COX7A2L* dans le remodelage et dans la compréhension du rôle des supercomplexes est un débat crucial qui a donné lieu à de nombreuses études, dont les résultats sont contradictoires. L'un des points de discordance provient du remodelage des supercomplexes impliqué par *COX7A2L*. Ce travail a permis de démontrer le rôle de cette protéine dans la formation et/ou le maintien des SC III₂-IV. Cependant, son rôle dans le maintien des autres supercomplexes, dont le respirasome n'est pas avéré, confirmant les travaux sur tissus murins (Mourier et al., 2014a; Pérez-Pérez et al., 2016), et infirmant les travaux pionniers du domaine (Lapunte-Brun et al., 2013). De plus, l'obtention du KO *COX7A2L* a permis de clairement démontrer que *COX7A2L* co-migrait avec les complexes III₂ et IV isolées ou associés en supercomplexe, confirmant des expériences antérieures du laboratoire sur souris (Pérez-Pérez et al., 2016). Dans cet article, il a été décrit que *COX7A2L* était une protéine du complexe III qui était assemblée dans un pré-complexe III avant l'ajout de la protéine RISP (*Figure 39*), son interaction avec le complexe IV se faisant seulement lorsque ce dernier était totalement formé (Pérez-Pérez et al., 2016).

Comme décrit dans l'introduction (*partie 1.2.3.3.2*) l'une des fonctions possibles des supercomplexes peut être liée à la formation et la maturation des complexes de la chaîne respiratoire. L'étude des complexes I, III et IV montrent qu'ils se forment dans leur intégralité (pas de sous-assemblage), dans des proportions qui sont les mêmes que celles observées dans la lignée contrôle pour les complexes I et IV (*article 1 Figure 2E et 3E*). Il semblerait donc que *COX7A2L* ainsi que les SC III₂-IV n'aient pas d'effet sur la quantité des complexes de la chaîne respiratoire. Cependant, l'absence de *COX7A2L* induit une

augmentation du niveau de complexe III₂. Dans l'article, l'hypothèse est qu'une augmentation de la biogenèse du complexe III₂ ainsi que le désassemblage des supercomplexes pourraient expliquer cette augmentation. Il semblerait donc que COX7A2L, en permettant la formation du SC III₂-IV, contrôle la quantité de complexe III₂ libre.

Nos expériences semblent indiquer également que le mécanisme de formation des supercomplexes et notamment des respirasomes est indépendant de COX7A2L et du SC III₂-IV. L'effet de l'absence de COX7A2L observé sur les mégacomplexes semble tenir d'avantage d'une diminution de stabilité de ces derniers liés à la perte de COX7A2L, que d'un rôle du SC III₂-IV dans leur formation car ils peuvent toujours se former. De plus, la réexpression de la forme longue de COX7A2L dans le KO permet de retrouver un niveau de complexe III₂ semblable à celui observé dans la lignée contrôle, alors que la réexpression de l'isoforme courte non fonctionnelle n'impact pas ces paramètres.

La réexpression ectopique de COX7A2L dans le KO a permis de mieux comprendre le rôle des isoformes longue et courte (homologue de celle présente chez la souris). Nos expériences démontrent que l'isoforme courte peut toujours s'incorporer dans le complexe III, mais n'a plus la capacité d'interagir avec le complexe IV, induisant la perte du SC III₂-IV, ainsi qu'une diminution du niveau des mégacomplexes, sans affecter la formation des respirasomes. L'absence de l'isoforme courte dans tous les supercomplexes comportant un complexe IV, bien que le complexe III soit présent, pose question (*article 1 Figure 6B*). Il semble y avoir plusieurs populations de complexe III, ceux possédant l'isoforme courte de COX7A2L ne pouvant interagir avec le complexe IV et ceux ne le possédant pas et pouvant former des supercomplexes avec le complexe IV. Cette observation suppose qu'il pourrait y avoir, au sein du même système, des complexes III avec des compositions différentes. La perte de ces deux acides aminés dans l'isoforme courte pose question sur leur rôle dans l'interaction avec le complexe IV : 1) sont-ils impliqués dans une interaction directe avec le complexe IV ou 2) induisent-ils un changement structural de COX7A2L qui altère sa fonction de connecteur avec le complexe IV, de manière directe ou indirecte. Il est possible de penser que les mutations, présentes dans l'isoforme courte, induisent un changement conformationnel de la protéine, et/ou du complexe III, qui ne permettrait pas, voire empêcherait, l'interaction entre le complexe III et le complexe IV. Si tel est le cas, il se pourrait que les complexes III, possédant COX7A2L, soient remplacés, dans les supercomplexes comportant un complexe IV, par des complexes III ne le possédant pas. L'association en supercomplexe

avec cet autre pool de complexes III pourrait être permise par le complexe I, ce qui expliquerait que les respirasomes peuvent se former, mais que les SC III₂-IV ne le peuvent pas. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi COX7A2L est présent dans les respirasomes mais n'est pas essentiel pour leur formation. Ceci laisse à penser également que les différents types de complexes III pourraient être spécifiques de la formation, maintien, et/ou stabilité de certains supercomplexes, comme avec les complexes III possédant COX7A2L qui sont essentiels de la formation du SC III₂-IV.

La conséquence de la structuration en supercomplexes sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire est une autre notion clé du débat pour la compréhension du rôle de ces derniers. Cette organisation supramoléculaire est supposée permettre la canalisation des transporteurs mobiles d'électrons, induisant un effet sur les capacités respiratoires des complexes I et II, et également de la provenance des électrons au sein de la chaîne respiratoire. Mes expériences montrent que la perte du SC III₂-IV ou de la diminution de la quantité des mégacomplexes, liées à l'absence de COX7A2L, n'impactent pas les capacités respiratoires des complexes I et II de ces cellules, et ceux, quelles que soient les conditions. En observant les modèles de « solid state » (*Figure 20*) et de plasticity model (*Figure 40*) (Lapunte-Brun et al., 2013; Schagger, 2000), s'il y a une canalisation du cytochrome *c*, le flux d'électrons provenant du complexe II devrait être affecté par la perte de ce SC III₂-IV, ce qui n'est pas le cas. Il semblerait donc que ce supercomplexe ne canalise pas le cytochrome *c* et n'impact pas les capacités des complexes I et II. Ces résultats vont dans le sens des travaux réalisés chez *S. cerevisiae* décrivant que le cytochrome *c* n'est pas canalisé (*partie 1.2.3.3.1.2*) (Boumans et al., 1998; Gupte et al., 1984; Trouillard et al., 2011).

L'autre interrogation du rôle des supercomplexes provient de l'impact de ces derniers sur le flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. En effet, la présence simultanée des substrats des complexes I et II implique que la chaîne respiratoire puisse réoxyder les deux au maximum de leurs capacités ou doivent privilégier l'un par rapport à l'autre. Mes données montrent que la répartition du flux provenant de l'activité des complexes I et II reste inchangée que COX7A2L soit présente ou non (*Article1 Figure 4D et 5F*). Pr. ENRIQUEZ a décrit dans son « plasticity model » que la segmentation du complexe IV en plusieurs pools allait permettre d'éviter un phénomène de compétition à l'entrée des électrons, évitant que l'oxydation d'un substrat prennent le monopole sur les autres (Lapunte-Brun et al., 2013). Toujours d'après ce modèle, l'absence de COX7A2L devrait abolir la segmentation du complexe IV, et induire un seul pool de complexe IV

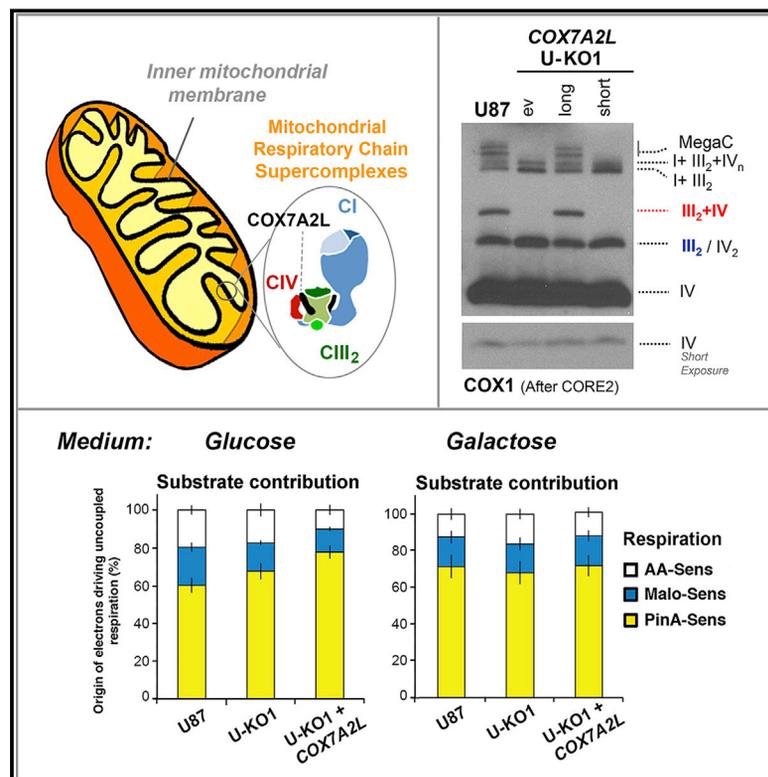
disponible pour recevoir les électrons provenant des complexes I et II, induisant *de facto* une compétition entre les donneurs d'électrons (*Figure 40*) (Lapiente-Brun et al., 2013). Mes observations ne vont pas dans ce sens et démontrent que, COX7A2L et le SC III₂-IV ne possèdent pas de rôle fonctionnel dans les capacités ou dans un phénomène de compétition entre la réoxydation du NADH et succinate.

Pour conclure, le KO COX7AL est le premier modèle permettant d'étudier le rôle des supercomplexes en s'affranchissant des variations d'enrichissement des complexes de la chaîne respiratoire. Notre étude semble montrer qu'il n'y a pas de corrélation entre les remodelages de supercomplexes, induit par la perte de COX7A2L, et les caractéristiques bioénergétiques de la chaîne respiratoire étudiées, notamment des capacités respiratoires des complexes I et II. Notre étude donne des arguments supplémentaires permettant de réfuter le « plasticity model » et le rôle des SC III₂-IV dans la canalisation du cytochrome *c*. Cependant, cette étude laisse entrevoir un peu plus le rôle des supercomplexes dans la formation, le maintien des complexes de la chaîne respiratoire, ainsi qu'une flexibilité quant à la composition des complexes associés dans les supercomplexes. Le KO COX7A2L permet d'étudier le rôle des supercomplexes sur la partie terminale de la chaîne respiratoire, néanmoins la question du rôle fonctionnel de l'association du complexe I en supercomplexe reste ouverte et ne peut être appréhendée par ce modèle.

Cell Reports

Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics

Graphical Abstract



Authors

Teresa Lobo-Jarne, Eva Nývltová, Rafael Pérez-Pérez, ..., Flavia Fontanesi, Cristina Ugalde, Antoni Barrientos

Correspondence

cugalde@h12o.es (C.U.),
abarrientos@med.miami.edu (A.B.)

In Brief

The role of COX7A2L in mitochondrial respiratory chain supercomplex biogenesis and function remains controversial. By analyzing COX7A2L-knockout human cells, Lobo-Jarne et al. report that this protein promotes specific respiratory chain complex assembly and organization remodeling but does not affect mitochondrial bioenergetics in physiological, nutritional, or oxidative stress conditions.

Highlights

- COX7A2L-knockout human cells lack SC III₂+IV and some megacomplexes
- COX7A2L-KO cells have enhanced CIII₂ steady-state levels and assembly rate
- COX7A2L-KO cells have slower respirasome assembly but normal steady-state levels
- COX7A2L-dependent MRC remodeling does not affect mitochondrial bioenergetics



Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics

Teresa Lobo-Jarne,^{1,6} Eva Nývltová,^{2,6} Rafael Pérez-Pérez,¹ Alba Timón-Gómez,² Thibaut Molinié,³ Austin Choi,² Arnaud Mourier,³ Flavia Fontanesi,⁴ Cristina Ugalde,^{1,5,*} and Antoni Barrientos^{2,4,7,*}

¹Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), 28041 Madrid, Spain

²Department of Neurology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA

³Université de Bordeaux and Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires UMR 5095, Bordeaux, France

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), U723, 28029 Madrid, Spain

⁶These authors contributed equally

⁷Lead Contact

*Correspondence: cugalde@h12o.es (C.U.), abarrientos@med.miami.edu (A.B.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.058>

SUMMARY

The mitochondrial respiratory chain is organized in a dynamic set of supercomplexes (SCs). The COX7A2L protein is essential for mammalian SC III₂+IV assembly. However, its function in respirasome (SCs I+III₂+IV_n) biogenesis remains controversial. To unambiguously determine the COX7A2L role, we generated COX7A2L-knockout (COX7A2L-KO) HEK293T and U87 cells. COX7A2L-KO cells lack SC III₂+IV but have enhanced complex III steady-state levels, activity, and assembly rate, normal *de novo* complex IV biogenesis, and delayed respirasome formation. Nonetheless, the KOs have normal respirasome steady-state levels, and only larger structures (SCs I₁₋₂+III₂+IV_{2-n} or megacomplexes) were undetected. Functional substrate-driven competition assays showed normal mitochondrial respiration in COX7A2L-KO cells in standard and nutritional-, environmental-, and oxidative-stress-challenging conditions. We conclude that COX7A2L establishes a regulatory checkpoint for the biogenesis of CIII₂ and specific SCs, but the COX7A2L-dependent MRC remodeling is essential neither to maintain mitochondrial bioenergetics nor to cope with acute cellular stresses.

INTRODUCTION

The mitochondrial respiratory chain (MRC) consists of four enzymatic multimeric complexes (CI to CIV) and two mobile electron carriers (coenzyme Q and cytochrome *c*), which catalyze electron transfer from reducing equivalents (NADH and FADH₂) to molecular oxygen. The process is coupled to the generation of a proton gradient that drives ATP synthesis by the ATP syn-

these through oxidative phosphorylation (OXPHOS). The proton-pumping complexes (CI, CIII, and CIV) can assemble into higher supramolecular structures known as supercomplexes (SCs) (Cruciat et al., 2000; Schägger and Pfeiffer, 2000). Mammalian CI is primarily found assembled in SCs, either interacting with the CIII dimer (CIII₂) to form SC I+III₂, or with both CIII₂ and CIV to form SC I+III₂+IV₁, to which additional CIV monomers can be added. These structures are known as the respirasomes (Schägger and Pfeiffer, 2000), since they were initially proposed to contain all the components required to transfer electrons from NADH to molecular oxygen (Acín-Pérez et al., 2008). In addition, CIII₂ and CIV form the scarce SC III₂+IV that coexists with the relatively abundant SCs I+III₂+IV₀₋₄, as well as with CIII₂, CIV₂, and monomeric CIV (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018).

The structural and functional organization of the MRC complexes is currently considered to be dynamic, where the proportion of free complexes and SCs is possibly modulated to adapt ATP production to changing cellular metabolic demands and environmental conditions (Acín-Pérez and Enriquez, 2014). However, the functional roles of the SCs remain intriguing. The general arrangement of the MRC in SCs was initially suggested to confer catalytic advantages to the system, as it was proposed to enhance the electron flux through substrate channeling (Bianchi et al., 2004), and to allow optimization of the available metabolic substrates via partitioned coenzyme Q and cytochrome *c* pools (Lapuente-Brun et al., 2013). However, direct spectroscopic studies argued in favor of single coenzyme Q and cytochrome *c* pools (Blaza et al., 2014; Trouillard et al., 2011), and a definitive demonstration that quinone and quinol diffuse freely in and out of SCs has recently come from studies that incorporated an alternative quinol oxidase into mammalian heart mitochondrial membranes and showed to establish a competing pathway for quinol oxidation (Fedor and Hirst, 2018). Therefore, the catalytic relevance of the SCs remains questioned (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018; Milenkovic et al., 2017). In addition, the I+III₂+IV_n respirasomes have been proposed to stabilize CI (Moreno-Lastres et al., 2012; Schägger et al., 2004) and to prevent the production of CI-derived reactive



oxygen species (ROS) (Maranzana et al., 2013). The recently defined high-resolution cryoelectron microscopy (cryo-EM) reconstructions of the mammalian respirasome (Gu et al., 2016; Letts et al., 2016; Sousa et al., 2016; Wu et al., 2016) are expected to be instrumental to unveil the potential functional properties of the SCs. Structural studies of the SC I+III₂+IV₁ from bovine, ovine, and porcine heart mitochondria showed that CIV is positioned at the distal end of the membrane arm of CI and adjacent to CIII₂. In addition, structural analyses in HEK293 cells showed the first architecture of the human respirasome, as well as the arrangement of the MRC complexes in a novel circular structure termed the megacomplex I₂+III₂+IV₂ (Guo et al., 2017), where CIII₂ forms a central core surrounded by two copies each of CI and CIV. The availability of these structures has only reinforced the intrigue about the biogenetic mechanisms and players that trigger the formation of the SCs. Besides the presence of the phospholipid cardiolipin (Mileykovskaya and Dowhan, 2014), SCs formation requires the action of specific assembly factors both in yeast (Chen et al., 2012; Singhal et al., 2017; Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012) and mammals (Chen et al., 2012; Davoudi et al., 2016; Ikeda et al., 2013; Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2016), although their specific functions remain under debate.

A controversial case involves the role of the protein COX7A2-like (COX7A2L, SCAFI, or COX7RP), highly homologous to the CIV subunit COX7A. COX7A2L was initially proposed to be central for the inclusion of CIV in SCs III₂+IV and I+III₂+IV₁₋₄ (Lapuente-Brun et al., 2013). Two COX7A2L variants were detected in commonly used laboratory mouse strains: a full-length 113-amino acids (long) protein present in CD1 mice, and a 111-amino acids (short) protein present in the C57BL/6 and BALB/c strains that missed two conserved residues (V72-P73) important for its stability and function in SCs formation (Lapuente-Brun et al., 2013). However, several groups reported the presence of respirasomes in C57BL/6 mice (Barrientos and Ugalde, 2013; Ikeda et al., 2013; Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014; Williams et al., 2016), and cultured human cells silenced for COX7A2L expression also showed a specific requirement of COX7A2L for SC III₂+IV assembly but not for respirasomes accumulation (Pérez-Pérez et al., 2016). These studies highlighted the preferential interaction of COX7A2L with CIII₂ and to a minor extent with monomeric CIV (Pérez-Pérez et al., 2016), which suggested an additional CIII-related mechanism of action for COX7A2L. There is currently a consensus that the full-length COX7A2L is required to promote SC III₂+IV formation and that it does so by binding independently to both CIII₂ and CIV (Cogliati et al., 2016; Pérez-Pérez et al., 2016; Zhang et al., 2016). It is also agreed that COX7A2L depletion does not affect the accumulation of the respirasomes I+III₂+IV₁₋₄ in some mouse tissues such as heart, as well as in COX7A2L-silenced human cells (Mourier et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2016; Williams et al., 2016). Interestingly, the short COX7A2L isoform in C57BL/6 mice induced tissue-specific differences in the levels of the larger respirasomes I+III₂+IV₂₋₄, which were less abundant in liver than in heart mitochondria (Williams et al., 2016). Even the respirasome I+III₂+IV₁ was shown to be unstable in some tissues according to some reports (Cogliati et al., 2016),

but not to others (Davoudi et al., 2016; Mourier et al., 2014; Sun et al., 2016; Williams et al., 2016). Based on proteomics analyses of the SCs subunit composition, it was hypothesized that the expression of tissue-specific isoforms of CIV subunits (e.g heart-muscle/liver COX7A1/COX7A2) could substitute COX7A2L in the respirasomes, inducing slight structural alterations in the CIV holocomplex that would differentially affect the assembly of the SCs in the presence of a specific COX7A variant (Cogliati et al., 2016), a possibility that remains to be experimentally demonstrated.

To unambiguously determine the function of COX7A2L in the organization of the human respiratory chain, we have used transcription activator-like effector nucleases (TALENs) technology to generate stable human COX7A2L-knockout (COX7A2L-KO) lines in HEK293T and in glioblastoma U87 cells, which were complemented either with the wild-type (WT) human COX7A2L, or with a mutant variant carrying an in-frame 6-bp deletion similar to that previously identified in the C57BL/6 mouse strain. Our results confirm that WT (long) COX7A2L is specifically required for the assembly of SC III₂+IV and the accumulation of megacomplexes, but dispensable for respirasome (or SCs I+III₂+IV₁) biogenesis, and reconcile an array of previous observations. *De novo* assembly studies show that COX7A2L regulates the assembly kinetics of the respirasomes probably through the modulation of CIII₂ levels. Biochemical data also demonstrate that the mutant COX7A2L variant does not support SC III₂+IV assembly because, despite being able to bind to both CIII₂ and SC I+III₂, it cannot interact with CIV or CIV-containing SCs. Functional substrate competition assays showed no differences in mitochondrial respiration between control and COX7A2L-KO cells, even under conditions of nutritional, environmental, or oxidative cellular stress. We conclude that by preventing the formation of SC III₂+IV, COX7A2L establishes a checkpoint for the regulation of CIII₂ levels and its incorporation into specific SCs. Most importantly, COX7A2L promotes MRC remodeling without affecting mitochondrial bioenergetics.

RESULTS

TALEN-Mediated Generation of COX7A2L-KO Cell Lines

To determine the requirement of human COX7A2L for mitochondrial SCs formation, and specifically for the assembly of the respirasomes, we used the TALEN gene-editing approach (Christian et al., 2010; Li et al., 2011) to create stable human COX7A2L-KO lines in HEK293T (human embryonic kidney) cells. A TALEN pair was designed to target a region within the first exon of the COX7A2L gene immediately downstream the start codon (Figure 1A). We co-transfected HEK293T cells with the TALEN pair, and subsequently, single clones were isolated by size cell sorting and analyzed for mutations leading to COX7A2L protein loss. More than 100 clones were screened by immunoblotting from cell extracts using a specific anti-COX7A2L antibody. We selected five promising candidates that completely lack the COX7A2L protein (Figure 1B). The COX7A2L gene was sequenced in two of these clones and found to carry KO mutations. Clone KO1 (C2E11) is homozygous and clone KO2 (C1C3) is compound heterozygous, both carrying COX7A2L alleles with short deletions involving the

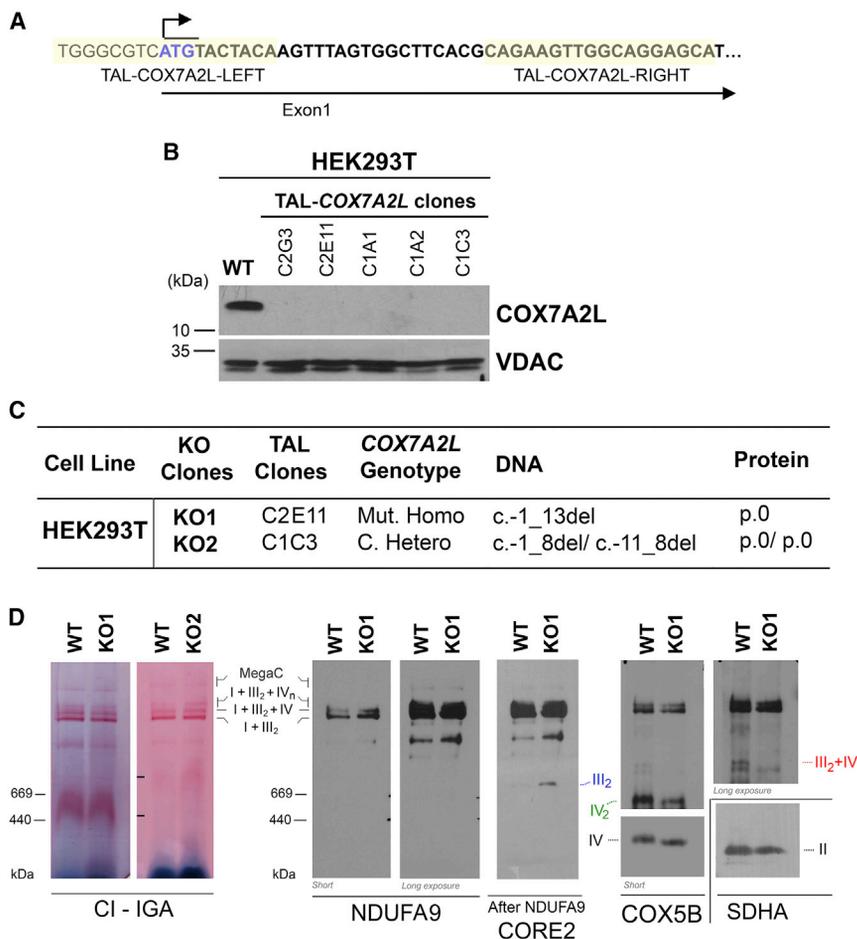


Figure 1. TALEN-Mediated Generation of COX7A2L-KO Clones in HEK293T Cells

(A) Schematic representation of the first exon of the COX7A2L locus and the sequences of recognition sites of the two TALEN pairs.

(B) Immunoblot analysis of the steady-state levels of COX7A2L in HEK293T (WT) and TALEN-transfected HEK293T cell lines. VDAC was used as a loading control.

(C) COX7A2L alleles in TAL-COX7A2L clones. The DNA numbering refers to the coding sequence (c.) and the protein (p.) number to the predicted full polypeptide (den Dunnen and Antonarakis, 2000). C, compound; Mut, mutant; Hetero, heterozygous; Homo, homozygous; del, deletion; -, position before starting ATG.

(D) BN-PAGE analysis of whole cells extracted with digitonin (detergent/protein ratio, 4:1) separated in a 4%–8% linear gradient polyacrylamide gel, followed by CI in-gel activity (IGA) or immunoblotting with the indicated antibodies. The identity of MRC complexes and SCs is indicated in the margins. MegaC, megacomplexes probably containing more than one copy of CI, CIII₂, and CIV.

See also Figure S1.

produced in a different model of human COX7A2L-KO in U87 glioblastoma cells (see below), suggesting that these MRC structures fail to assemble in the absence of functional COX7A2L, but might also be more labile than in WT mitochondria.

To assess whether the stability of the respirasomes depends on COX7A2L, we exposed mitochondria-enriched fractions

start codon and leading to the complete absence of COX7A2L (Figure 1C).

COX7A2L-KO Cells Display Absence of SC III₂+IV with Normal Respirasome Levels and Increased CIII₂ Levels and Activity

To analyze the pattern of supramolecular assemblies of MRC complexes resulting from the total absence of COX7A2L in human cells, we performed a first exploration in digitonin-solubilized cell extracts from WT and COX7A2L-KO cells by blue native (BN)-PAGE followed by CI-in gel activity (IGA) and immunoblotting. Our results unambiguously show that human COX7A2L is essential for the formation of SC III₂+IV, but its loss does not affect the basic respirasome (or SCs I+III₂+IV₁) that accumulates equally in WT and KO cells (Figure 1D). Similar results were obtained when using mitochondria-enriched fractions from WT HEK293T, KO1, and KO2 clones (Figure 2A). However, some scarce SCs larger than the basic respirasome I+III₂+IV₁, occasionally appeared to be at lower levels in some experiments with HEK293T cells. These SCs could contain multiple CIV units (I+III₂+IV₂₋₄) but are also compatible with the recently described respiratory megacomplex I₂+III₂+IV₂ (Guo et al., 2017). For simplification, in the figures we have labeled them as MegaC (megacomplexes). The loss of these larger SCs was clearly re-

from WT and COX7A2L-KO cells to varying concentrations of digitonin and analyzed the extracts by BN-PAGE followed by CI- and CIV-IGAs or immunoblotting (Figure S1). Stringent SCs extraction conditions using increasing (4–40 mg/mg) digitonin-to-protein ratios (Figure S1A) led to a parallel disintegration of the respirasomes (SCs I+III₂+IV_n) and consequent accumulation of SC I+III₂ and free CI in both cell types. Only when we used an extremely harsh 40 mg/mg digitonin:protein ratio were the respirasomes slightly more unstable in COX7A2L-KO than in WT cells. Milder SCs extraction conditions using decreasing (4–1 mg/mg) digitonin-to-protein ratios, revealed no differences in the levels of SC I+III₂+IV₁ between COX7A2L-KO and WT cells (Figure S1B), but a clear decrease in the abundance of larger SCs (indicated with an asterisk) in COX7A2L-KO cells (Figures 2A and 2B), further suggesting that COX7A2L may be required for the normal assembly or stability of these megastructures. On the contrary, the abundance and stability of monomeric and dimeric CIV were not affected by the absence of COX7A2L (Figures 2A and 2B).

We next used a two-dimensional (2D)-BN/SDS-PAGE system to analyze in detail the pattern of SCs in COX7A2L-KO cells and the co-localization of COX7A2L with all MRC structures in WT cells. Although we had previously reported that COX7A2L associates with pre-CIII₂ before the incorporation of the RISP subunit

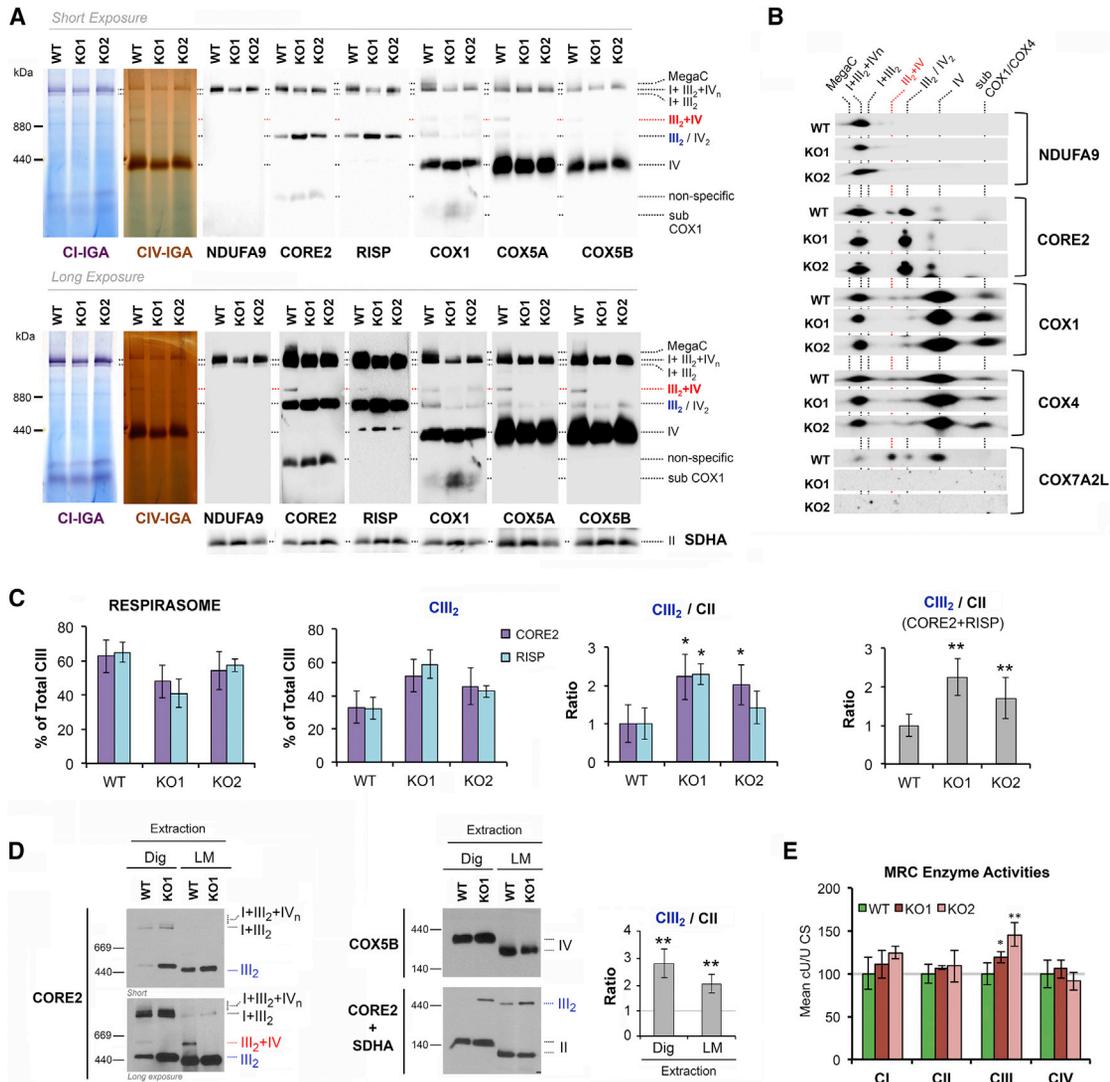


Figure 2. COX7A2L-KO Cells Display Absence of SC III₂+IV with Normal Respirasome Levels and Altered Accumulation of CIII₂

The effect of COX7A2L absence on MRC complex assembly was investigated in two COX7A2L-KO clones, clone 1 (KO1) and clone 2 (KO2), compared with the control HEK293T cells (WT).

(A) Mitochondria extracted with a digitonin/protein ratio of 4:1 (g/g) and analyzed by BN-PAGE, followed by CI- and CIV-IGA assays, or alternatively, by immunoblotting using the indicated antibodies.

(B) Subsequent 2D-BN/SDS-PAGE and immunoblot analyses were performed with antibodies against COX7A2L and the indicated OXPHOS subunits.

(C) To address the relative amount of CIII₂ in COX7A2L-KO cells, the signals from the CORE2 antibody from four BN-PAGE experiments were quantified by densitometry, normalized by CII, and densitometry as mean ± SD.

(D) BN-PAGE analyses in whole-cell extracts prepared in the presence of digitonin (detergent/protein ratio, 4:1) or 1% lauryl maltoside (LM). The CIII₂ signals were quantified and normalized by CII using the histogram function of the Adobe Photoshop program on digitalized images, and the values were expressed relative to the control. Error bars represent the mean ± SD of four independent experiments.

(E) Spectrophotometric measurements of the individual activities of MRC complexes I to IV (CI–CIV) in WT and COX7A2L-KO cells. Enzyme activities are expressed as cU/U citrate synthase (CS). Error bars represent the mean ± SD of four repetitions. *p < 0.05; **p < 0.01. MegaC, megacomplexes probably containing more than one copy of CI, CIII₂, and CIV. I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂, and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV; IV₂, complex IV dimer (CIV₂). II, complex II. Subcomplexes that contain COX1 and COX4 are indicated. Apparent subcomplexes that contain CORE2 are antibody artifacts that disappear in 2D-BN/SDS-PAGE gels.

See also Figure S2.

(Pérez-Pérez et al., 2016), RISP assembly is not affected in COX7A2L-KO cells as it was detected in CIII₂, and in SCs I+III₂ and I+III₂+IV_{1-n} (Figure 2A). However, the accumulation of CIII₂ was significantly increased by ~2-fold in the absence of

COX7A2L (Figures 1D, 2A–2D, S1A, and S1B). The increase in CIII₂ levels was not only a consequence of redistribution from the unassembled SC III₂+IV. A boost in CIII₂ levels was detected when using COX7A2L-KO mitochondrial extracts prepared not

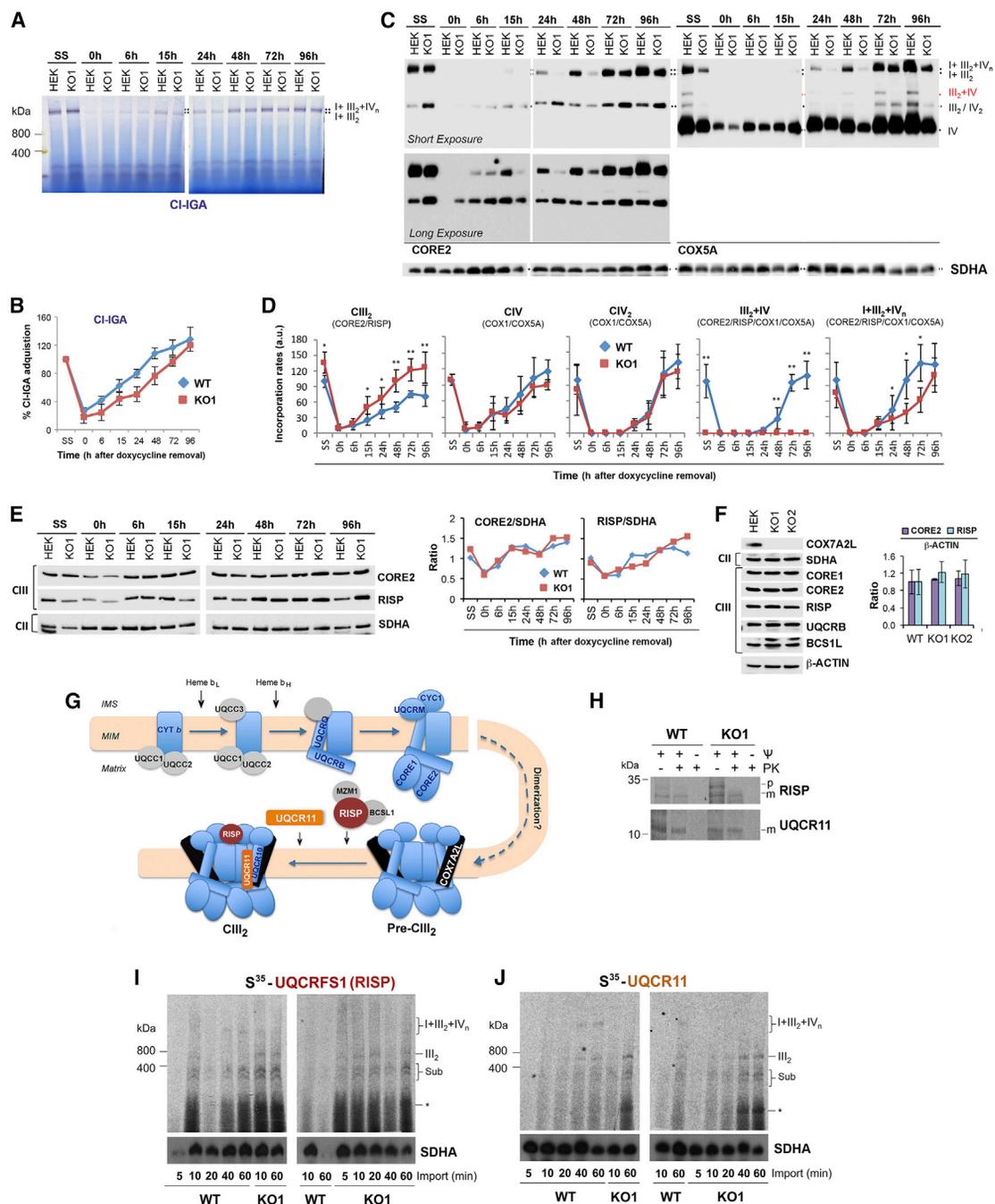


Figure 3. COX7A2L-KO Cells Have Enhanced Rate of De Novo CIII₂ Biogenesis and Delayed Respirasomes Formation

(A–E) HEK293T (WT) and COX7A2L-KO clone 1 (KO1) cells were cultured for 8 days in the presence of 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline and collected at different time points (0, 6, 15, 24, 48, 72, and 96 hr) after doxycycline removal. Mitochondria prepared from these samples were extracted with a digitonin/protein ratio of 4 g/g and analyzed by BN-PAGE in combination with (A) CI-IGA assays or (C) immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Mean CI activity recovery after doxycycline removal quantified from (A).

(C) Mean incorporation rates of CORE2 subunit in CIII₂, and of COX1 (not shown) and COX5A subunits in CIV and CIV₂, or their assembly kinetics in the I+III₂+IV_n respirasomes.

(D) The signals from three independent experiments (as in C) for WT and KO cells were quantified and normalized by CII. Time point values are expressed as percentages of the untreated cells (SS) and indicated as means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂, and CIV. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV; III₂, complex III dimer (CIII₂); IV, complex IV; IV₂, complex IV dimer (CIV₂); II, complex II.

(E) For two doxycycline experiments, samples were analyzed by SDS-PAGE for the steady-state levels of CIII subunits CORE2 and RISP. On the right panel, the signals were quantified and plotted as ratio of SDHA. The values for the two independent experiments did not differ by more than 5%.

(legend continued on next page)

only in the presence of digitonin but also in the presence of lauryl maltoside (Figure 2D), which disrupts SC integrity, indicating that the total amount of assembled CIII₂ is increased. In agreement, spectrophotometric measurements of MRC enzyme activities showed that CIII activity was specifically enhanced by ~40% in the KOs (Figure 2E), consistent with the accumulation of CIII₂ in these cells.

All of the phenotypes described in COX7A2L-KO cells in this section, particularly the absence of SC III₂+IV and the accumulation of CIII₂, were specific since they were restored by the overexpression of recombinant COX7A2L-Myc-DDK in both KOs (Figures S2A–S2C), thus eliminating the possibility of off-target effects that could have arisen during the COX7A2L gene disruption. Tagged-COX7A2L incorporated into the same MRC structures as the endogenous COX7A2L (Figure S2B), and its mild overexpression (2- to 3-fold) did not induce any aberrant phenotype (Figure S2).

COX7A2L-KO Cells Display a Boost in CIII₂ Biogenesis in Parallel with Slower Respirasome Assembly Kinetics

We next analyzed the assembly kinetics of MRC complexes and SCs by doxycycline-induced reversible inhibition of mitochondrial translation in WT and COX7A2L-KO cells. Doxycycline was removed from the cell culture media after 6 days of treatment, and samples were collected at different time points (0, 6, 15, 24, 48, 72, and 96 hr). To follow the reappearance of newly assembled CIII₂, CIV, CIV₂, and SCs, digitonin-solubilized mitochondria were separated by BN-PAGE and subsequently analyzed by either CI-IGA assays (Figures 3A and 3B) or immunoblot using antibodies that recognize CORE2 (CIII), COX1 (CIV; not shown), and COX5A (CIV) (Figures 3C and 3D). Following 6 days of doxycycline treatment (time 0 hr), only residual levels of CI, CIV, and CIII₂ (5%–10% of untreated cells) were detected in either control or KO cells (Figures 3A–3D). The treatment did not affect CII levels, as expected, since CII lacks mtDNA-encoded subunits. Once mitochondrial translation resumed (times 6–96 hr), the SC III₂+IV formed *de novo* only in the WT cells (Figures 3C and 3D). The levels of CIV and CIV₂ increased at similar rates in WT and COX7A2L-KO cells (Figures 3C and 3D), ruling out a role for COX7A2L in the biogenesis of this complex. On the contrary, the rate of CIII₂ biogenesis, as shown for its steady-state levels in Figure 2, was markedly faster in the KOs than in the WT cells (Figures 3C and 3D). These data indicate a deregulation of CIII₂ levels in the absence of COX7A2L, suggesting that this protein establishes a regulatory checkpoint in CIII₂ biogenesis. Immunoblot analysis of CIII subunit levels during the recovery from the doxycycline treatment (Figure 3E) and in the steady state (Figure 3F) showed no significant differ-

ences in the steady-state levels of CIII subunits between WT and KOs, which indicate that a larger pool of unassembled subunits may exist in the WT cells. Therefore, we propose that the CIII₂ increase in the KOs is a consequence of a more efficient CIII₂ assembly/stability rather than increased *de novo* synthesis of CIII subunits. Strikingly, the reappearance of the respirasomes I+III₂+IV_n was clearly delayed in the COX7A2L-KO cells (Figures 3A–3D), but it reached levels comparable to the WT at later time points (78–96 hr; Figures 3A–3D) and in the steady state (Figure 2). These results suggest that, although the lack of COX7A2L does not prevent the formation of the respirasomes, it hampers their assembly efficiency perhaps by increasing the threshold of CIII₂ levels required to start the process (Moreno-Lastres et al., 2012).

To validate the hypotheses raised from the doxycycline experiments, we took into account the current model for CIII₂ assembly (Figure 3G), which includes the binding of COX7A2L to pre-CIII₂ prior to the incorporation of subunits UQCRC1 and UQCRC2 (Fernández-Vizarrá and Zeviani, 2015; Pérez-Pérez et al., 2016). The process of CIII₂ biogenesis, however, is not known in detail. For example, it remains unclear at which stage CIII₂ dimerization occurs. Here, we performed import/assembly assays in isolated WT and COX7A2L-KO mitochondria with specific ³⁵S-methionine-radiolabeled CIII precursors synthesized *in vitro*, in the presence and absence of mitochondrial membrane potential (Figure 3H). We chose to synthesize and import RISP (UQCRC1; Figure 3I) and UQCRC2 (Figure 3J), two late assembly proteins that are known to incorporate after the binding of COX7A2L to pre-CIII₂. In WT mitochondria, UQCRC1 and UQCRC2 incorporated into several subcomplexes up to the CIII₂ and followed by later incorporation into SCs (I+III₂ and I+III₂+IV_n). In COX7A2L-KO mitochondria, UQCRC1 and UQCRC2 incorporated more efficiently into the same intermediates as well as into CIII₂ than in WT mitochondria. On the contrary, the incorporation signals of these two radiolabeled proteins into SCs were less marked in the KO than in WT cells. Together, our import data show enhanced incorporation of newly imported proteins into CIII₂ assembly intermediates and attenuated formation of CIII₂-containing SCs in the COX7A2L-KO, suggesting that endogenous CIII₂ biogenesis is preferentially boosted and assembly intermediates are more abundant in COX7A2L-KO than in WT mitochondria.

Mitochondrial Bioenergetics in COX7A2L-KO Cells Is Indistinguishable from WT in Normal Physiological Conditions or under CI Deficiency

To ascertain the functional consequences of COX7A2L and SC III₂+IV depletion, we performed high-resolution endogenous

(F) Steady-state levels of the indicated CIII subunits in HEK293T WT, KO1, and KO2 cell lines. On the right panel, the signals of CORE2 and RISP were quantified and expressed as ratio of the signal of ACTIN, used as a loading control. Error bars represent the mean ± SD of three independent experiments.

(G) Simplified current model of CIII assembly depicting the order of subunit incorporation and time of dimerization, modified from Fernández-Vizarrá and Zeviani (2015).

(H) *In organello* import of the indicated recombinant proteins synthesized in a reticulocyte system in the presence of ³⁵S-methionine. The import assays were performed for 30 min in the absence or presence of the uncoupler CCCP to disrupt the mitochondrial membrane potential (Ψ). Following import, an aliquot was treated with proteinase K to digest non-imported precursor proteins. M, mature; p, precursor.

(I and J) BN-PAGE analysis of the incorporation of the indicated radiolabeled recombinant proteins into CIII assembly intermediates, dimer, and SCs in HEK293T WT and KO1 cells during increasing times from 5 to 60 min. Import assays were performed in duplicates with similar results. Sub, subassemblies. The asterisk indicates small subassemblies that may correspond to the protein being imported bound to specific chaperones.

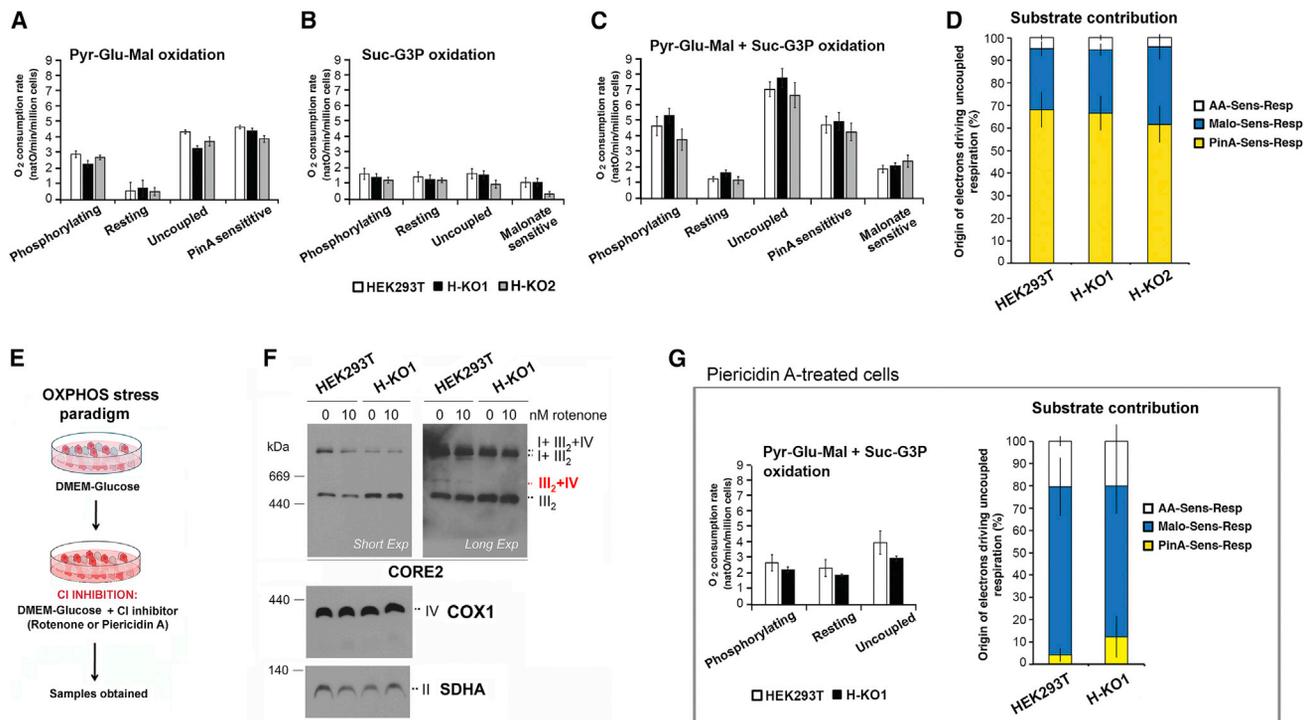


Figure 4. COX7A2L-KO Cells Are Capable of Normal OXPHOS Performance

Respiration of permeabilized COX7A2L KO and control HEK cells cultivated on DMEM high glucose (A–D) or DMEM high glucose supplemented with 1.2 μ M piericidin A, a CI inhibitor (G).

(A) Respiration of digitonin-permeabilized HEK293T cells assessed in the presence of Pyr-Glu-Mal: pyruvate (10 mM), glutamate (10 mM), and malate (5 mM) under different respiratory states (phosphorylating, resting, and uncoupled) and piericidin A-sensitive respiration (PinA sens).

(B) Respiration of digitonin-permeabilized HEK293T cells assessed in the presence of Suc-G3P: succinate (10 mM) and glycerol-3-phosphate (5 mM) under different respiratory states (phosphorylating, resting, and uncoupled) and malonate-sensitive respiration (Malo sens).

(C) Respiration of digitonin-permeabilized HEK cells incubated with Pyr-Glu-Mal and Suc-G3P. The Piericidin A- (PinA sens) and Malonate-sensitive (Malo sens) respiration are determined under uncoupled conditions.

(D) Respective contribution of NADH and succinate dehydrogenases in providing electrons to sustain uncoupled respiration assessed with all substrates under uncoupled state.

(E) OXPHOS stress paradigm based on *in cellulo* CI inhibition with rotenone or piericidin A.

(F) Effect of 24-hr incubation in the presence of 50 nM rotenone in HEK293T WT and KO1 cells on SC stability, analyzed in digitonized cell extracts by BN-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies.

(G) Respiration analysis of HEK cells cultivated during 48 hr in presence of CI inhibitor (piericidin A). The respiration of digitonin-permeabilized cells incubated with Pyr-Glu-Mal and Suc-G3P assessed under different respiratory states (phosphorylating, resting, and uncoupled). The piericidin A (PinA sens)-, malonate (Malo sens)-, and remaining antimycin A (AA)-sensitive respirations are determined under uncoupled conditions. The graph on the right side represents the respective contribution of CI and CII in providing electrons to sustain uncoupled respiration. In all the panels, error bars represent the mean \pm SD of four biological repetitions. See also Figure S3.

oxygraphy to measure coupled cell respiration in intact cells, which is unaffected in the COX7A2L-KO clones (not shown).

Furthermore, substrate-driven competition was determined by treating digitonin-permeabilized cells supplemented with NADH-linked substrates (pyruvate, glutamate, malate) and FADH₂-linked substrates (succinate, glycerol-3-phosphate), with specific inhibitors of CI (piericidin A or rotenone) or CII (malonate). This experimental procedure allowed us to determine the respective contribution of CI and CII in feeding the respiratory chain (RC) with electrons during uncoupled respiration (Figures 4A–4D). In contrast with previous results in liver mitochondria from C57BL/6 mice (Lapuente-Brun et al., 2013) and in line with results obtained by some of us in liver and heart mitochondria from C57BL/6J and C57BL/6N mice (Mourier et al., 2014), substrate-

driven competition was not affected in the COX7A2L-KO clones. Also, no effect on respiration resulted from COX7A2L overexpression (Figures 4A–4D). These results indicate that, in standard cell culture conditions, neither COX7A2L nor SC III₂+IV have a substantial functional effect on electron flow through the MRC.

In human cells, more than 90% of CI is present in the respirasomes and the SC III₂+IV only constitutes \sim 5% of the total amount of MRC structures (Moreno-Lastres et al., 2012). Taking this MRC organization into account, we contemplated that, by limiting the enzymatic activity of CI, we could discern whether the absence of SC III₂+IV and the accumulation of CIII₂ in the COX7A2L-KO clones affect substrate competitive oxidation. To induce a partial inhibition of CI activity, we first treated the cells with 10 nM rotenone, 1.2 μ M piericidin A, or the control

vehicle (0.05% or 8.5 mM ethanol) for 24 hr (Figure 4E). CI inhibition did not significantly alter the distribution of MRC complexes and SCs in WT or KO cells (Figure 4F). Piericidin A treatment resulted in a comparable ~50% decrease in pyruvate-glutamate-malate + succinate-glycerol-3-phosphate (G3P) oxidation and similar substrate contribution in WT and KO digitonin-permeabilized cells (Figure 4G).

Mitochondrial Bioenergetics in COX7A2L-KO Cells Is Indistinguishable from WT under Nutritional or Environmental Stress

The faster CIII₂ biogenesis and slower respirasome assembly rate observed in COX7A2L-KO cells would be consistent with a role for COX7A2L in accelerating SCs assembly to attend physiological needs or to recover from insults that could damage MRC complexes. In fact, it has been proposed that COX7A2L is induced, incorporated into CIV, and then enhances CIV activity under cellular stress conditions such as endoplasmic reticulum (ER) stress or ischemia (Zhang et al., 2016). Therefore, we assessed whether stressed HEK293T COX7A2L-KO cells could reveal a bioenergetics role for COX7A2L. Preliminary tests informed us that HEK293T cells do not exhibit a robust response to general stresses such as heat shock (Figure S3A), and although they respond to oxidative stress (Figures S3D and S3E), COX7A2L is not induced in the conditions tested (Figure S3B). Among the several cell lines examined, glioblastoma U-87 exhibited the most robust stress response (Figures S3A and S3B) and was used to generate a new COX7A2L-KO (U-KO). Two U-KO clones were obtained (Figures S4A and S4B). Since they exhibited a similar phenotype that was fully complemented by COX7A2L reconstitution (Figures 5B, S3C, and S3D), U-KO1 was used for subsequent experiments.

The pattern of MRC complexes and SCs was similar in HEK293T and U87 WT cells. However, SCs and MegaCs seemed more abundant in U87 (Figures 5A and 5B). The absence of COX7A2L in U87 cells prevented the assembly of SC III₂+IV and enhanced CIII₂ levels (Figures 5A and 5B) and delayed the assembly of the respirasomes (Figure S4C) as seen in HEK293T cells. It further limited the accumulation of SCs larger than the basic respirasome SC I+III₂+IV₁, although the detection of some traces of these SCs in U-KO cells could reflect their instability rather than failed assembly (Figures 5A, 5B, S4C).

In U87 WT cells, COX7A2L protein levels were enhanced up to ~4 fold following 48 hr under nutritional stress induced by carbon source switch from glucose to galactose (Figures 5C and 5D), a paradigm known to stimulate mitochondrial energy metabolism (Rossignol et al., 2004). The existing MRC complexes and SCs in WT and U-KO cells were equally induced after 48 hr in galactose and remained high at 72 hr (Figure 5E), when COX7A2L levels in WT cells had already attenuated (Figure 5D). As expected, coupled and uncoupled oxidation of pyruvate-glutamate-malate + succinate-G3P in permeabilized cells was stimulated in WT cells, but also in U-KO cells, and no differences were observed in substrate contribution (Figure 5F). Therefore, COX7A2L does not have any evident impact in glucose-to-galactose nutritional-stress-induced MRC biogenesis and mitochondrial bioenergetics.

Environmental stresses in U87 cells such as acute heat shock (1 hr at 42°C; Figures S3A–S3C) or exogenous oxidative stress (1 hr in the presence of 100 μM H₂O₂; Figures S3D–S3F) also induced COX7A2L 2–4 hr after the insult. Yet, these stresses and subsequent recovery did not modify the MRC organization significantly (Figures S3C and S3F). The exposition to H₂O₂ promoted the equal accumulation of a CORE2-containing sub-SC in U87 WT and U-KO cells (Figure S3F), which could be a SC degradation product. As a minor difference, a proportion of U-KO cells higher than that of WT died during the acute oxidative stress, but no differences were detected in the endogenous respiration of the surviving cells (Figure S3G). We conclude that the MRC remodeling induced by COX7A2L does not influence mitochondrial bioenergetics during acute cellular stress.

A Mutant COX7A2L Variant Carrying a 6-bp Deletion Present in C57BL/6 Mice Retains the Ability to Bind CIII₂ but Does Not Rescue SC III₂+IV Assembly

In humans, only one COX7A2L protein of 114 amino acids has been reported (<https://www.uniprot.org/uniprot/O14548>) that is homolog to the long COX7A2L variant present in CD1 mice (Pérez-Pérez et al., 2016). To explore the functionality in human cells of the short COX7A2L isoform present in C57BL/6 and BALB/c mouse strains (Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014), we generated cell lines constitutively expressing either FLAG-tagged COX7A2L (long) or a mutant version (short) carrying a deletion of amino acids V72 and P73 of human COX7A2L (Figure 6A). Both variants were stably expressed in WT HEK293T and COX7A2L-KO cells, which yielded no major differences in the steady-state levels of RC subunits (Figure 6A). MRC organization analysis by 2D-BN/SDS-PAGE revealed that the short COX7A2L variant was imported into mitochondria, where it colocalized with CIII₂ and SC I+III₂, but not with any CIV-containing structure (Figure 6B), as previously reported (Pérez-Pérez et al., 2016). Whereas expression of the long COX7A2L variant in COX7A2L-KO cells restored normal levels of CIII₂ and SC III₂+IV, the short variant did not (Figures 6B–6D). Our analyses further disclosed that the expression of either the long or the short COX7A2L variants did not affect the steady-state levels of the respirasomes (Figures 6C and 6D). Similar observations were made in U87 and U-KO cells (Figure 5B). Together, these results support our view (Pérez-Pérez et al., 2016) that the 2-amino acid deletion present in the short COX7A2L isoform prevents its association with CIV but does not affect its binding to CIII₂, an interaction that is not sufficient to promote the formation of the SC III₂+IV.

Overexpression of CIV-Subunit Tissue-Specific Isoforms in COX7A2L-KO Cells Neither Rescues SC III₂+IV Assembly nor Enhances Respirasome Levels

Studies in mice suggested that COX7A2L could regulate the formation or stability of the CIV-containing SCs III₂+IV and I+III₂+IV_{2-n} in a tissue-specific manner (Williams et al., 2016). The relative levels of these SCs were lower in liver than in heart mitochondria from C57BL/6 mice, carrying the short COX7A2L variant, which could be explained by the occurrence of tissue-specific CIV subunit isoforms. Six isoforms have been so far described for the nucleus-encoded COX subunits in mammals: three liver/heart-type pairs of subunits (COX6A1/COX6A2,

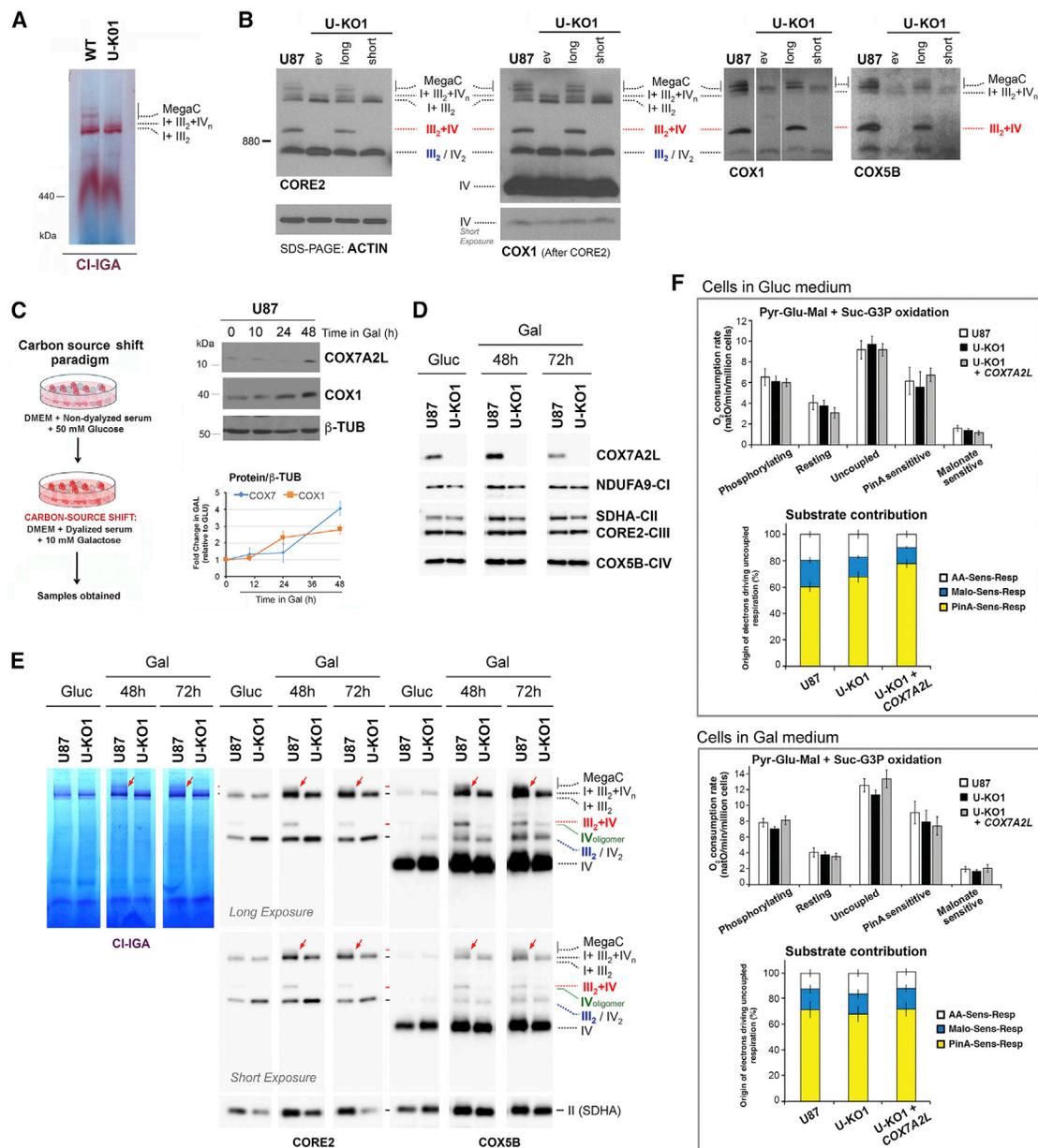


Figure 5. A Nutritional Challenge Induced by Switching the Carbon Source in the Media from Glucose to Galactose Does Equally Enhance Mitochondrial Bioenergetics Parameters in WT and COX7A2L-KO Cells

(A and B) Characterization of glioblastoma U87 WT and COX7A2L-KO (U-KO1) cells. The KO cells were stably transfected with an empty vector (ev) or constructs to express the long or short versions of COX7A2L. (A) and (B) show the BN-PAGE analysis of whole cells extracted with digitonin (detergent/protein ratio, 4:1) separated in a 4%–8% (A) or a 3%–12% (B) linear gradient polyacrylamide gel, followed by CI in-gel activity (IGA) (A) or immunoblotting with the indicated antibodies (B). The identity of MRC complexes and SCs is indicated in the margins. MegaC, megacomplexes probably containing more than one copy of CI, CIII₂, and CIV.

(C) Scheme depicting the carbon source switch paradigm used in this study.

(D) Time course quantification of COX7A2L induction by galactose in U87 WT cells. The graphs represent a quantification of the signals in three independent experiments, with error bars representing the mean ± SD.

(E) Mitochondria extracted with a digitonin/protein ratio of 4:1 (g/g) from cells grown in either glucose-containing (Gluc) or galactose-containing (Gal) medium and analyzed by BN-PAGE, followed by CI-IGA assays or, alternatively, by immunoblotting using the indicated antibodies. The red arrows indicate MegaCs exclusively detected in WT cells.

(F) Respiration of glioblastoma U87 cells assessed under different respiratory states (phosphorylating, resting, and uncoupled) and respective contribution of NADH and succinate dehydrogenases to the uncoupled respiration cultured in DMEM-glucose (upper panel), or DMEM-galactose (lower panel). Error bars represent the mean ± SD of four biological repetitions.

See also Figure S4.

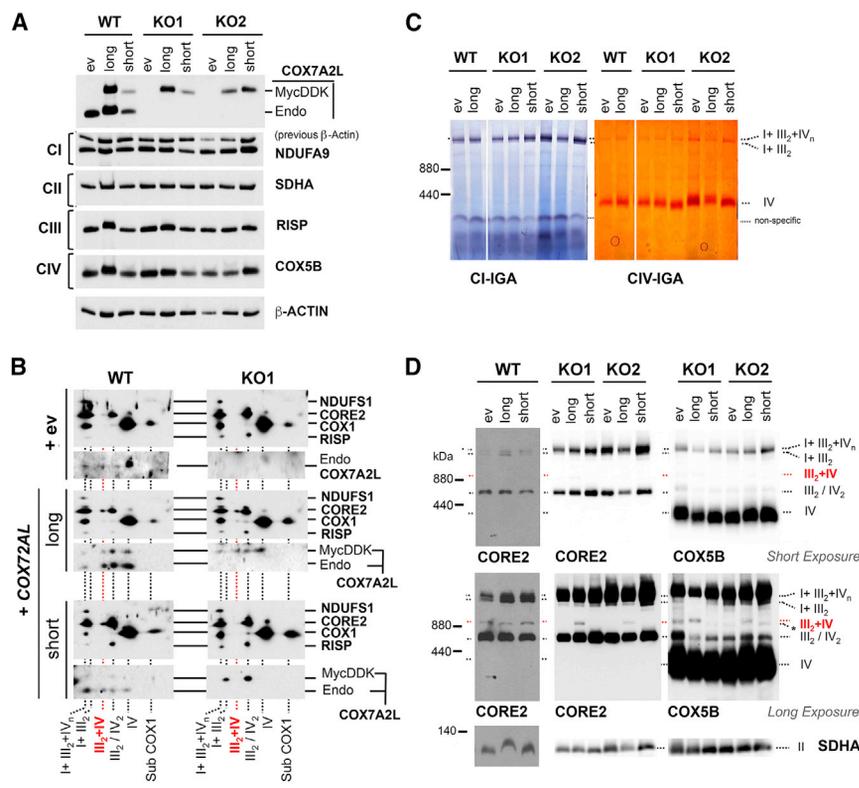


Figure 6. The Short-COX7A2L Variant Binds to CIII₂ but Does Not Rescue SC III₂+IV Assembly in COX7A2L-KO Cells

Control HEK293T cells (WT) and both COX7A2L-KO (KO1 and KO2) clones carrying an empty vector (ev) or constructs to overexpress COX7A2L-Myc-DDK (long) or short-COX7A2L-Myc-DDK (short) were used in the following experiments.

(A) SDS-PAGE followed by immunoblotting to estimate steady-state levels of endogenous COX7A2L (~12.6 kDa) from exogenous COX7A2L-Myc-DDK (~16.2 kDa). Membranes were also incubated with antibodies that recognize the indicated OXPHOS subunits.

(B) 2D-BN/SDS-PAGE and immunoblotting using digitonin-solubilized mitochondrial extracts (detergent/protein ratio, 4:1) and the indicated antibodies.

(C and D) BN-PAGE followed by immunoblotting in digitonized whole-cell extracts (C) or by CI-IGA and CIV-IGA assays and/or immunoblotting in digitonized isolated mitochondria (D). Membranes were incubated with the indicated antibodies. I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂, and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV; IV₂, complex IV dimer (CIV₂); II, complex II. Subcomplexes that contain COX1 are indicated as subCOX1. In (D), an unidentified band running a bit faster than the SC III₂+IV cross-reacting with the COX5B antibody (Ab) (but not with the CORE2 Ab) is indicated with an asterisk. See also Figure S5.

COX7A2/COX7A1, and COX8-1/COX8-2), the lung-specific isoform COX4-2, and two testes-specific isoforms, COX6B and COX8-3 (Pierron et al., 2012). While heart (or muscle) isoforms are expressed in tissues with high aerobic capacity and abundant mitochondria, liver (or non-muscle) isoforms are found in tissues like brain, liver, and kidney that generally contain fewer mitochondria (Pierron et al., 2012).

An attractive hypothesis suggests that COX7A2L could be replaced by the CIV subunit COX7A2 in the respirasomes, thereby supporting the co-existence of alternative SCs in different tissues (Cogliati et al., 2016; Letts et al., 2016; Letts and Sazanov, 2017). To demonstrate whether the expression of tissue-specific isoforms of CIV subunits differentially affects the assembly of the SCs in the absence of COX7A2L, we attempted to induce the formation of “tissue-specific” CIV in WT HEK293T and COX7A2L-KO cells, which constitutively express the CIV liver isoforms. To induce the formation of a “heart-type” CIV, we overexpressed either FLAG-tagged COX6A2 or COX7A1, and to induce a “lung-type” CIV, we overexpressed COX4i2 in both cell types (Figures S5A–S5C). We also analyzed the effect of COX7A2 overexpression in COX7A2L-KO cells (Figures S5A–S5C). None of the isoforms rescued the formation of SC III₂+IV or clearly altered the levels of the respirasomes (Figure S5D).

DISCUSSION

The biochemical and functional characterization of COX7A2L-KO human cell lines presented in this manuscript provide signif-

icant insights into the regulation of the MRC structural organization and respiratory metabolism by human COX7A2L. Our data help to clarify conflicting results on COX7A2L function that were primarily obtained in mouse models (Davoudi et al., 2016; Ikeda et al., 2013; Lapuente-Brun et al., 2013; Mourier et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2016; Williams et al., 2016). In this work, we demonstrate the role of COX7A2L in the coordinated regulation of CIII₂ and SCs biogenesis. We unambiguously show that COX7A2L is essential to promote the assembly of SC III₂+IV in human cells, and also the accumulation of large SCs compatible with either respirasomes containing several copies of CIV (I+III₂+IV_{2-n}) or with the recently described MegaC (I₂+III₂+IV₂) (Guo et al., 2017). In contrast, COX7A2L is dispensable for the formation of the basic respirasomes (SCs I+III₂ and I+III₂+IV₁), although its absence hampers the assembly efficiency of these MRC structures, thus providing an explanation to the previous controversy. Importantly, COX7A2L establishes a regulatory checkpoint that specifically limits the accumulation of CIII₂. Physiologically, this adaptation of MRC organization and abundance promoted by COX7A2L is not essential to cope with nutritional, metabolic, or environmental cellular stresses and does not offer an obvious bioenergetics advantage, in contrast with a previous report (Lapuente-Brun et al., 2013). These concepts are depicted in a model presented in Figure 7 and are discussed below.

COX7A2L was originally presented as a SC assembly factor essential for the incorporation of CIV into SCs III₂+IV and I+III₂+IV_{1-n} in mice (Lapuente-Brun et al., 2013). In C57BL/6

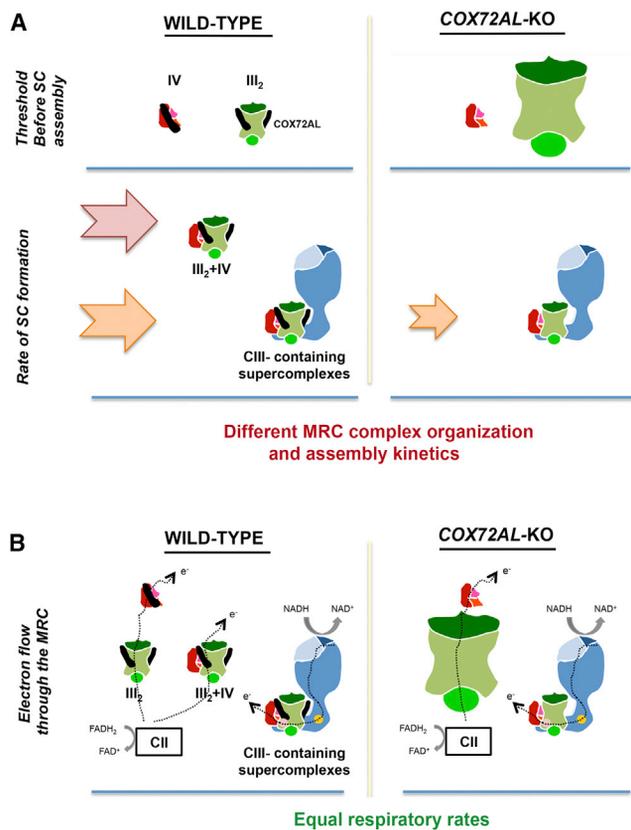


Figure 7. Structural and Functional Rearrangements of the RC in the Absence of COX7A2L

(A) Fully assembled CIII₂ and CIV accumulate until they reach a threshold that ignites SC III₂+IV and respirasome assembly at rates arbitrarily indicated by arrows. In the absence of COX7A2L, CIII₂ levels are ~2-3-fold, SC III₂+IV is not formed, and the assembly kinetics of CIII-containing SCs is slower.

(B) In physiological, nutritional, and environmental stress conditions, individual and simultaneous oxidation of NADH- and FAD-linked substrates is similar in WT and COX7A2L-KO cells. Mitochondrial CI, CIII₂, and CIV are represented in blue, green, and red, respectively. COX7A2L is represented as a black stick.

and BALB/c mouse strains, the lack of residues V72-P73 in a short COX7A2L variant was found to impact COX7A2L stability and its role in the assembly of CIV-containing SCs, including SC III₂+CIV and the respirasomes (Lapiente-Brun et al., 2013). In contrast, the results presented here show that, whereas the SC III₂+IV is not formed in human COX7A2L-KO cells, the respirasomes I+III₂+IV_{1-n} accumulate to normal levels, consistent with previous data (Davoudi et al., 2016; Mourier et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2016; Williams et al., 2016), despite that they are assembled at a slower rate. However, SCs larger than I+III₂+IV₁ are unstable, particularly in U87 cells, in which MegaCs may fail to assemble. *In vivo*, the effect of COX7A2L in the SCs assembly rates may vary from tissue to tissue, which could be a contributing factor to explain why large respirasomes containing more than one CIV unit (I+III₂+IV_{2-n}) seem to be less abundant in liver than in heart from C57BL/6 mice (Williams et al., 2016).

Regarding the short COX7A2L variant, expression of a human version in COX7A2L-KO cells does not support SC III₂+IV assembly, as seen in C57BL/6 mice (Lapiente-Brun et al., 2013),

and it does not affect the steady-state levels of SCs I+III₂+IV_{1-n}. Importantly, whereas the short variant retains the ability to bind both CIII₂ and SC I+III₂, it does not interact with CIV or CIV-containing respirasomes. In contrast, WT (long) COX7A2L preferentially co-segregates with monomeric CIV, with SCs III₂+IV and the respirasomes, and, to a minor extent, with CIII₂ in human HEK293T cells, as it occurs in mouse heart mitochondria and in human 143B osteosarcoma cells (Pérez-Pérez et al., 2016). These data are consistent with the views that COX7A2L associates with CIII₂ and CIV through independent domains to form the SC III₂+IV (Cogliati et al., 2016; Pérez-Pérez et al., 2016; Zhang et al., 2016), and that COX7A2L binding to CIV requires the correct orientation of a histidine residue at position 73 (Cogliati et al., 2016). Altogether, these results suggest that COX7A2L promotes specific interactions between CIII₂ and CIV that are essential for their association into SC III₂+IV, which are probably different to their interactions in the respirasomes, where CI is recruited into the macrostructure (Gu et al., 2016; Letts et al., 2016; Sousa et al., 2016; Wu et al., 2016). This supports the hypothesis that different pathways may operate to assemble the different SCs (Letts and Sazanov, 2017). SC III₂+IV and MegaCs could be assembled by the coming together of the individual complexes, which requires COX7A2L. In contrast, SC I+III₂+IV₁ would be assembled in a COX7A2L-independent manner, compatible with the incorporation of newly synthesized subunits/subassemblies from CIII₂ and CIV that accumulate once these fully assembled complexes have reached their steady-state levels, into larger structures containing CI intermediates, as we previously proposed (Moreno-Lastres et al., 2012).

In our model, the deregulation in the CIII₂ steady-state levels provoked by the absence of COX7A2L would delay the formation of the basic I+III₂+IV₁ respirasome, as well as the further incorporation of additional fully assembled CI or CIV units to generate larger respirasomes or MegaCs. The significant accumulation of CIII₂ levels was restored to normal by complementation with the long-COX7A2L variant, but not with the short variant, despite its retention of the ability to bind the complex. In this vein, we previously reported that, in hybrid cell lines lacking CIII₂, the stability of COX7A2L is largely compromised (Pérez-Pérez et al., 2016). Furthermore, *de novo* assembly studies in control 143B cells indicated that COX7A2L assembles into a pre-CIII₂ before the incorporation of the catalytic RISP subunit, whereas COX7A2L only binds CIV once this complex is fully assembled (Pérez-Pérez et al., 2016). These negative genetic interactions initially suggested an indirect regulatory role for COX7A2L in regulating CIII₂ assembly or stability, most probably through the biogenesis of SC III₂+IV. In this work, we have further demonstrated that the loss of COX7A2L enhances the *de novo* synthesis of CIII₂ in detriment of the respirasomes, and therefore COX7A2L establishes a threshold to the accumulation of CIII₂ in the steady state required to ignite respirasome assembly (Moreno-Lastres et al., 2012).

Finally, the impact of the MRC structural remodeling promoted by COX7A2L on mitochondrial physiology has also been a source of controversy. It was proposed that COX7A2L-dependent SC organization remodeling provides a mechanism for the physiological regulation of energy metabolism in mammals by providing alternate paths for electrons derived from the catabolism of specific substrates (Lapiente-Brun et al., 2013). In this

model, electron flux from CI to CIII₂ (carried by NADH) would proceed essentially within the CI-containing SCs, whereas electron flow from CII (carried by FAD) would preferentially occur through free CIII₂ and SC III₂+IV (Lapuente-Brun et al., 2013). ATP production and respiration rates were found higher in mouse liver mitochondria and permeabilized fibroblasts with the unstable short-COX7A2L variant, both in the presence of pyruvate + malate (NADH-linked substrates) or succinate (FAD-linked substrate), whereas maximal respiration and ATP production in cells expressing long-COX7A2L required substrates for both electron transfer paths (Lapuente-Brun et al., 2013). However, other groups reported lower mitochondrial respiration and ATP synthesis in muscle (Ikeda et al., 2013) and liver (Shiba et al., 2017) from COX7A2L-KO mice or no effect of short-COX7A2L on mouse heart mitochondrial respiration (Mourier et al., 2014). Our human COX7A2L-KO cellular models displayed no differences with WT cells in coupled endogenous cell respiration, or in single and combined substrate (pyruvate-glutamate-malate or succinate-G3P) oxidation, indicating a minor functional role of COX7A2L in normal cultured cell physiological conditions. Similar results were obtained when the cultures were exposed to several nutritional, oxidative, and environmental cellular stresses, even though they actually induce COX7A2L protein by 4- to 10-fold. Altogether, our results contest the highly controversial role of COX7A2L in MRC SCs organization that has been hypothesized to maximize mitochondrial bioenergetics efficiency (Bianchi et al., 2004; Lapuente-Brun et al., 2013).

A potential caveat of our studies is the use of cell culture models, which are maintained in conditions that could differ *in vivo*, particularly regarding tissue oxygen and nutrient availabilities. However, similar results were obtained in two different cell models and an array of culture conditions. Our data serve to clarify some of the current discrepancies regarding the impact of COX7A2L on the organization and function of the MRC complexes. We conclude that the role of COX7A2L in SC III₂+IV assembly, which is well established in the literature, and in the assembly/stability of higher SCs or MegaCs, has no impact in mitochondrial bioenergetics in any of the conditions tested. One could claim that the excess of free CIII₂ that accumulates when SC III₂+IV is absent could compensate for the instability of MegaCs and the slower SC assembly kinetics observed in COX7A2L-KO cells, but if this occurs, it is not via preferential substrate utilization, as also supported by other groups (Blaza et al., 2014; Fedor and Hirst, 2018; Trouillard et al., 2011). Alternatively, COX7A2L could be part of a response to accelerate CIII-containing SCs assembly when needed to preserve stability of individual complexes (Acín-Pérez et al., 2004) or to minimize ROS production (Maranzana et al., 2013), possibilities that warrant future research efforts.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

● EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

- Human cell lines, transfection and cell culture
- Nutritional and environmental stress conditions

● METHOD DETAILS

- Key reagents
- Plasmid transfection
- Whole Cell extracts and Mitochondrial isolation
- Blue Native Electrophoresis and In-Gel Activity Assays
- SDS-PAGE and immunoblotting
- Characterization of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system
- De novo mitochondrial respiratory chain complex and supercomplex assembly
- Overexpression of Complex IV tissue-specific (liver and heart) subunit isoforms in COX7A2L-KO cells
- In organello import of radiolabelled recombinant proteins

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.058>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Carlos T. Moraes and Erika Fernandez-Vizarrá for critical reading of the manuscript. This research was supported by NIH R01 Grants GM105781 (to A.B. and C.U.) and GM112179 (to A.B.), NIH R35 Grant GM118141 (to A.B.), MDA Grant MDA-381828 (to A.B.), AHA Development Grant 14SDG20040003 (to F.F.), and Instituto de Salud Carlos III-MINECO/European FEDER Funds Grants PI14-00209 and PI17-00048 (to C.U.). A.M. receives support from the AFM-Telethon (Trampoline Grant 19613) and ANR JCJC (ANR-16-CE14-0013).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.F., C.U., and A.B. designed the study. T.L.-J. and F.F. created and characterized the HEK293T COX7A2L-KO line. E.N. created the U87 COX7A2L-KO line and characterized the two KO lines. R.P.-P. performed doxycycline experiments and contributed to the characterization of KO cell lines. A.T.-G. developed oxidative stress and protein import assays. A.C. performed heat shock assays. T.M. optimized methods for high-resolution oxygraphy, and T.M. and A.M. performed OXPHOS measurements. T.L.-J., C.U., and A.B. wrote the paper, and all authors read and edited the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: October 11, 2017

Revised: October 8, 2018

Accepted: October 15, 2018

Published: November 13, 2018

REFERENCES

- Acín-Pérez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory super-complexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 444–450.
- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* 13, 805–815.

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539.
- Barrientos, A., and Ugalde, C. (2013). I function, therefore I am: overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes. *Cell Metab.* 18, 147–149.
- Barrientos, A., Fontanesi, F., and Diaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 19*, Unit 19.13.
- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279, 36562–36569.
- Blaza, J.N., Serreli, R., Jones, A.J., Mohammed, K., and Hirst, J. (2014). Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 15735–15740.
- Bourens, M., Boulet, A., Leary, S.C., and Barrientos, A. (2014). Human COX2 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2901–2913.
- Chen, Y.C., Taylor, E.B., Dephoure, N., Heo, J.M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N.C., Gygi, S.P., and Rutter, J. (2012). Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab.* 15, 348–360.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Cogliati, S., Calvo, E., Loureiro, M., Guaras, A.M., Nieto-Arellano, R., García-Poyatos, C., Ezkurdia, I., Mercader, N., Vázquez, J., and Enriquez, J.A. (2016). Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature* 539, 579–582.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000). The cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098.
- Davoudi, M., Kotarsky, H., Hansson, E., Kallijärvi, J., and Fellman, V. (2016). COX7A2L/SCAF1 and pre-Complex III modify respiratory chain supercomplex formation in different mouse strains with a Bcs11 mutation. *PLoS One* 11, e0168774.
- den Dunnen, J.T., and Antonarakis, S.E. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.* 15, 7–12.
- Fedor, J.G., and Hirst, J. (2018). Mitochondrial Supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling. *Cell Metab.* 28, 525–531.e4.
- Fernández-Vizarrá, E., and Zeviani, M. (2015). Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front. Genet.* 6, 134.
- Fernández-Vizarrá, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., and Enriquez, J.A. (2010). Isolation of mitochondria for biogenetical studies: an update. *Mitochondrion* 10, 253–262.
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., and Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 537, 639–643.
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. (2017). Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I₂III₂IV₂. *Cell* 170, 1247–1257.e12.
- Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K., and Inoue, S. (2013). A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 4, 2147.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., et al. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
- Letts, J.A., and Sazanov, L.A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 800–808.
- Letts, J.A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L.A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 537, 644–648.
- Li, T., Huang, S., Zhao, X., Wright, D.A., Carpenter, S., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B. (2011). Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 39, 6315–6325.
- Lobo-Jarne, T., and Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: structures, function and biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 179–190.
- 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.
- Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., and Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9, 331–339.
- Milenkovic, D., Blaza, J.N., Larsson, N.G., and Hirst, J. (2017). The enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metab.* 25, 765–776.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2014). Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem. Phys. Lipids* 179, 42–48.
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M.A., Arenas, J., Barrientos, A., and Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab.* 15, 324–335.
- Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N.G., and Milenkovic, D. (2014). The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms. *Cell Metab.* 20, 1069–1075.
- Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., Fernández-Vizarrá, E., Cadenas, S., Delmiro, A., García-Consuegra, I., et al. (2016). COX7A2L is a mitochondrial complex III binding protein that stabilizes the III₂+IV supercomplex without affecting respirasome formation. *Cell Rep.* 16, 2387–2398.
- Pierron, D., Wildman, D.E., Hüttemann, M., Markondapatnaikuni, G.C., Aras, S., and Grossman, L.I. (2012). Cytochrome *c* oxidase: evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 590–597.
- Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 985–993.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., and Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349–36353.
- Shiba, S., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Nakayama, A., Tanaka, T., and Inoue, S. (2017). Deficiency of COX7RP, a mitochondrial supercomplex assembly promoting factor, lowers blood glucose level in mice. *Sci. Rep.* 7, 7606.
- Silva Ramos, E., Larsson, N.G., and Mourier, A. (2016). Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1277–1283.
- Singhal, R.K., Kruse, C., Heidler, J., Strecker, V., Zwicker, K., Dusterwald, L., Westermann, B., Herrmann, J.M., Wittig, I., and Rapaport, D. (2017). Coi1 is a novel assembly factor of the yeast complex III-complex IV supercomplex. *Mol. Biol. Cell*, Published online August 9, 2018. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0093>.
- Sousa, J.S., Mills, D.J., Vonck, J., and Kühlbrandt, W. (2016). Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *eLife* 5, e21290.
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R.A. (2012). Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome *bc*₁-cytochrome *c* oxidase supercomplex. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1363–1373.
- Sun, D., Li, B., Qiu, R., Fang, H., and Lyu, J. (2016). Cell type-specific modulation of respiratory chain supercomplex organization. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E926.

Trouillard, M., Meunier, B., and Rappaport, F. (2011). Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, E1027–E1034.

Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vögtle, F.N., Meisinger, C., Meyer, H.E., Zieseniss, A., Katschinski, D.M., Jans, D.C., Jakobs, S., et al. (2012). Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab.* *15*, 336–347.

Williams, E.G., Wu, Y., Jha, P., Dubuis, S., Blattmann, P., Argmann, C.A., Houten, S.M., Amariuta, T., Wolski, W., Zamboni, N., et al. (2016). Systems proteomics of liver mitochondria function. *Science* *352*, aad0189.

Wu, M., Gu, J., Guo, R., Huang, Y., and Yang, M. (2016). Structure of mammalian respiratory supercomplex I₁III₂IV₁. *Cell* *167*, 1598–1609.e10.

Zhang, K., Wang, G., Zhang, X., Hüttemann, P.P., Qiu, Y., Liu, J., Mitchell, A., Lee, I., Zhang, C., Lee, J.S., et al. (2016). COX7AR is a stress-inducible mitochondrial cox subunit that promotes breast cancer malignancy. *Sci. Rep.* *6*, 31742.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
ATP5A	Abcam	Cat# ab14748 RRID: AB_301447
β-ACTIN	Abcam	Cat# ab8227 RRID: AB_2305186
BCS1-L	Abcam	Cat# ab102808 RRID: AB_10859410
CORE1	Abcam	Cat# ab110252 RRID: AB_10863633
CORE2	Abcam	Cat# ab14745 RRID: AB_2213640
COX1	Abcam	Cat# ab14705 RRID: AB_2084810
COX2	Abcam	Cat# ab110258 RRID: AB_10887758
COX4I1	Abcam	Cat# ab14744 RRID: AB_301443
COX4I2	Abcam	Cat# ab70112 RRID: AB_2085283
COX5A	Sigma	Cat# HPA027525
COX5B	Santa Cruz	Cat# sc-374417 RRID: AB_10988066
COX6A1	Sigma	Cat# HPA062394 RRID: AB_2684749
COX6A2	Abcam	Cat# ab103139 RRID: AB_10710958
COX7A1	Abcam	Cat# ab134989
COX7A2L	ProteinTech	Cat#11416-1-AP RRID: AB_2245402
FLAG-tag	Sigma	Cat# F3165 RRID: AB_259529
HSP70 (HSPA6)	Origene	Cat# TA501950 RRID: AB_11124627
NDUFA9	Abcam	Cat# ab14713 RRID: AB_301431
NDUFS1	Abcam	Cat# ab52690 RRID: AB_2151096
RISP	Abcam	Cat# ab14746 RRID: AB_301445
SDHA	Abcam	Cat# ab14715 RRID: AB_301433
SOD2	Sigma	Cat# HPA001814 RRID: AB_1080134
TIM50	Abcam	Cat# ab109527 RRID: AB_10858241
TOM20	Santa Cruz	Cat# sc-11415 RRID: AB_2207533
β-TUBULIN	Sigma	Cat# C4585 RRID: AB_258868
UQCRB	Abcam	Cat# ab190360
VDAC1	Abcam	Cat# ab14734 RRID: AB_443084
2° Ab-mouse	Rockland Immunochemicals	Cat# 610-103-121 RRID: AB_218457
2° Ab-rabbit	Rockland Immunochemicals	Cat# 611-1302 RRID: AB_219720
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen	Cat# 31966-047
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma	Cat# 12303C
Lipofectamine 2000	Invitrogen	Cat# 1168019
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	ThermoFisher #	Cat# 31985062
n-dodecyl-β-δ-maltoside (DDM)	Sigma	Cat# 5172
Digitonin, High Purity	Calbiochem	Cat# 300410
Native PAGE 20X Running Buffer	Novex-Life Technologies	Cat# BN2001
Native PAGE 20X Cathode Buffer Additive	Novex-Life Technologies	Cat# BN2002
Critical Commercial Assays		
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega	Cat# L1170
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFisher	Cat# 34095
Experimental Models: Cell Lines		
HEK293T	ATCC	Cat# CRL-3216
Glioblastoma U87	ATCC	Cat# HTB-14

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Oligonucleotides		
COX7A2L-short-Forward: GTTTTCCAGAAAGCTGATGGT	Sigma	This paper
COX7A2L-short-Reverse: GCCTCGTTTCAGGTAGAC	Sigma	This paper
COX7A2L-KO-Forward: AAGTTAGGCGATCTTCGGGC	Sigma	This paper
COX7A2L-KO-Reverse: GCTCGGACATGAGAAGTGGC	Sigma	This paper
SAS1_Hs01:	Sigma	Cat# oligo 3019431149-000060
SAS1_Hs02:	Sigma	Cat# oligo 3019431149-000070
Recombinant DNA		
TAL Effector (F)- COX7A2L: TGGGCGTCATGTACTACAA	Invitrogen	N/A
TAL Effector (R)- COX7A2L: GCAGAAGTTGGCAGGAGCA	Invitrogen	N/A
UQCR11 in pReceiver-B31	GeneCopoeia	Cat# EX-I0287-B31
UQCRB in pReceiver-B31	GeneCopoeia	Cat# EX-F0223-B31
UQCRRFS1 or RISP in pReceiver-B31	GeneCopoeia	Cat# EX-A3744-B31
COX7A2L- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC202697
COX7A1- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC201154
COX4I1- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC209374
COX4I2- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC209204
COX6A1- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC210485
COX6A2- Myc-DDK in pCMV6-Entry	Origene	Cat# RC206539
pCMV6-A-Entry-Hygro	Origene	Cat# PS100024
COX7A2L-Myc-DDK in pCMV6-A-Entry-Hygro	This paper	N/A
Software and Algorithms		
SPSS	IBM, v 21.0	N/A
ImageJ	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/
GraphPad Prism	GraphPad Software v.5.0a	N/A
ImageLab	BioRad, v 6.0.1	N/A
Other		
Pre-cast NuPAGE 4%–12% Bis-Tris gels	Invitrogen	Cat# NP0321BOX
Pre-cast NativePAGE 3%–12% Bis-Tris gels	Invitrogen	Cat# BN2011BX10

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr. Antoni Barrientos, Ph.D. (abarrientos@med.miami.edu).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Human cell lines, transfection and cell culture

HEK293T (CRL-3216) and glioblastoma U-87 (HTB-14) cells were obtained from ATCC and cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 µg/ml uridine and antibiotics at 37°C under 5% CO₂. Analysis for mycoplasma contamination was routinely performed.

Nutritional and environmental stress conditions

For some experiments cells were exposed to nutritional, OXPHOS bioenergetics an environmental stressors. Nutritional stress was induced by transferring cells from glucose-containing to galactose-containing media and samples were analyzed over increasing times (12 to 48 hours). OXPHOS bioenergetics stress was induced with MRC complex I inhibitors: cells were exposed to 10 nM rotenone, 1.2 µM piericidin A or the control vehicle (0,05% or 8,5 mM ethanol) for 24 hours. Heat stress was induced by exposing cultures to 42°C for 1 hour and oxidative stress by supplementing the media with 100 µM H₂O₂ for 1 hour. Following heat or oxidative stress, the media was changed and the cultures incubated in non-stress conditions before samples were collected after increasing times of recovery (0 to 8 hours).

METHOD DETAILS

Key reagents

Tables presenting the list of antibodies, recombinant DNAs, oligonucleotides and siRNA oligoribonucleotides used in this study are included in the supplementary material.

Plasmid transfection

To create stable human *COX7A2L* knockout (KO) lines in HEK293T and U87 cells, we used a pair of TALEN constructs obtained from Thermo-Invitrogen. The left and right TALEN of the pair were designed to target the TGGGCGTCATGTACTACAA and the GCAGAAGTTGGCAGGAGCA DNA sequences, respectively, at the *COX7A2L* locus (see key reagents tables). HEK293T or U87 cells grown on a 6-well plate at 30% confluency were transfected with 4 μ g of the right and left TALEN plasmids as a pair using 5 μ L of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) pre-incubated in 300 μ L of Opti-MEM (ThermoFisher). After 4 hours of incubation, the media were changed to complete DMEM medium. After 3-6 times of repetitive transfections every three days, cells were collected, diluted in complete DMEM medium and seeded as single cells in multiple 96 well plates. In some repetitions, single cells were isolated using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). The surviving colonies screened by immunoblotting against *COX7A2L* and by genotyping, as reported (Bourens et al., 2014). For genotyping, *COX7A2L* was sequenced using oligonucleotides *COX7A2L*-KO-Forward and *COX7A2L*-KO-Reverse (see Key resources table)

The *COX7A2L*-KO cell lines were reconstituted with Myc-DDK-tagged variants (long or short) of *COX7A2L*. *COX7A2L*-Myc-DDK was cloned under the control of a CMV promoter in the pCMV6-A-Entry-Hygro plasmid (Origene, PS100024) using *Sfa*I and *Mss*I sites. The short version of mouse *COX7A2L* comprises an in-frame 6 base pair deletion that led to the absence of 2 amino acids (V72 and P73) (Lapiente-Brun et al., 2013). To generate the short variant of human *COX7A2L*, we used the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit from NEB. ~20 ng of template DNA extracted from HEK293T cells were used, along with the primers *COX7A2L*-short-F: 5'-GTTTTTCCAGAAAGCTGATGGT-3' (forward) and *COX7A2L*-short-R: 5'-GCCTCGTTTCAGGTAGAC-3' (reverse), designed to flank the region to be deleted. After exponential amplification and the treatment with kinase and ligase, 5 μ L of the reaction were transformed NEB 5-alpha competent *E. coli* cells using the pCMV6-A-Entry-Hygro plasmid (Origene).

For transfection of *COX7A2L*-Myc-DDK-Hygro constructs, we used 10 μ L of Lipofectamine™ (Thermo Fisher) mixed with 4 μ g of vector DNA in OPTIMEM-1 media (GIBCO) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, the media was supplemented with 200 μ g/ml of hygromycin and drug selection was maintained for at least 21 days.

Whole Cell extracts and Mitochondrial isolation

Whole cell extracts were obtained by solubilization in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) with 1 mM PMSF and 1x mammalian protease inhibitor cocktail (Sigma). Extracts were cleared by 5 minutes centrifugation at 10,000 g at 4°C.

Mitochondria-enriched fractions were isolated from at least ten 80% confluent 175 cm² flasks as described previously (Bourens et al., 2014; Fernández-Vizarra et al., 2010; Moreno-Lastres et al., 2012). To extract mitochondrial proteins in native conditions, mitochondria were pelleted and solubilized in 200 μ L buffer containing 1.5 M aminocaproic acid and 50 mM Bis-Tris (pH 7.0). After optimizing solubilization conditions, we decided to use digitonin at a concentration of 4 g/g protein. In some experiments, lauryl maltoside (LM) was used at 1%. Solubilized samples were incubated on ice for 15 min and centrifuged for 30 min at 10,000 xg at 4°C, and the supernatant was combined with 20 μ L of sample buffer (750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, 0.5 mM EDTA, 5% Serva Blue G-250) prior to loading.

Blue Native Electrophoresis and In-Gel Activity Assays

Native PAGE Novex® 3%–12% Bis-Tris Protein Gels (Life Technologies) gels were loaded with 60-80 μ g of mitochondrial protein or 400 μ g of total cell extracts prepared in the presence of either lauryl maltoside (LM) or digitonin at the protein-detergent ratios indicated in the figure legends. After electrophoresis, proteins were transferred to PDVF or nitrocellulose membranes and used for immunoblotting. Duplicate gels were further used for *in-gel* activity (IGA) assays and for second-dimension (2D) 10% SDS-PAGE gels.

SDS-PAGE and immunoblotting

Protein concentration was measured with the BCA reagent (Thermo Scientific). 20–60 μ g of mitochondrial protein extract was separated by SDS-PAGE in the Laemmli buffer system (Laemmli, 1970). Then, proteins were transferred to nitrocellulose membranes at 40 V overnight and probed with specific primary antibodies listed in the Key reagents Table. Peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgGs were used as secondary antibodies (Molecular Probes). Immunoreactive bands were detected with an ECL prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham) in a ChemiDoc MP Imager (Biorad) or by exposition to X-ray films. Optical densities of the immunoreactive bands were measured using the ImageLab (Biorad) software or the ImageJ software in digitalized images.

Characterization of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities were performed according to established methods (Medja et al., 2009), and expressed relative to the citrate synthase activity.

Endogenous cell respiration was measured polarographically at 37°C using a Clark-type electrode from Hansatech Instruments (Norfolk, United Kingdom). Substrate-driven respiration was assayed in digitonin-permeabilized cultured cells as reported (Barrientos et al., 2009). Briefly, trypsinized cells were washed with permeabilized-cell respiration buffer (PRB) containing 0.3 M mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mg/ml BSA and 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.4). The cells were resuspended at $\sim 4 \times 10^6$ cells/ml in 1.5 mL of the same buffer air-equilibrated at 37 °C supplemented 10 units of hexokinase and 2 mM ADP. One ml of cell suspension was immediately placed into the polarographic chamber to measure endogenous respiration.

High-resolution oxygen consumption rate of digitonin-permeabilized cells was performed as described previously (Silva Ramos et al., 2016) at 37°C, using 1 million cells diluted in 2 mL of respiratory buffer (120 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM Tris-Base, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.2) using an Oxygraph-2K (Oroboros). Briefly, cells were permeabilized with 0.02 mg/ml digitonin. The oxygen consumption rate under phosphorylating condition was assessed using either NADH-linked substrates (10 mM glutamate, 10 mM pyruvate and 5 mM malate), or FADH-linked substrates (10 mM succinate plus 5 mM glycerol-3-phosphate) in the presence of 2.5 mM ADP. The non-phosphorylating state was obtained after ATP synthesis inhibition using 0.75 μ g/ml oligomycin. Mitochondrial respiration was uncoupled by successive addition of up to 0.4 μ M CCCP to reach maximal oxygen consumption. To assess the contribution of NADH-linked and FADH-linked substrates to total oxygen consumption, respiration was assessed in the presence of both kinds of substrates. Subsequently, complex I and complex II activities were sequentially inhibited using respectively 1.2 μ M piericidin A and 3 mM malonate. Afterward, 5 μ M of antimycin A was added to validate the mitochondrial origin of the oxygen consumption measured.

De novo mitochondrial respiratory chain complex and supercomplex assembly

To follow the assembly kinetics of MRC complexes and supercomplexes, we depleted cells of the structures containing mtDNA-encoded subunits by treating the cultures with doxycycline, a reversible inhibitor of mitochondrial translation as reported (Moreno-Lastres et al., 2012). We cultured WT (HEK293 or U87) control and COX7A2L-KO cells for 6 days in the presence of 15 μ g/ml doxycycline. To follow the accumulation of newly synthesized MRC complexes and their further association into supercomplexes, samples were collected at different time points (0, 6, 15, 24, 48, 72, and 96 hours) after doxycycline removal. Digitonin-solubilized mitochondrial particles were separated by BN-PAGE and analyzed by immunoblotting.

Overexpression of Complex IV tissue-specific (liver and heart) subunit isoforms in COX7A2L-KO cells

Genes coding for selected liver and heart Complex IV subunit isoforms (*COX4I1*, *COX4I2*, *COX6A1*, *COX6A2*, *COX7A1* and *COX7A2*) were cloned in frame with a Myc-DDK-tag into pCMV6 plasmid carrying a hygromycin resistance cassette. Each construct was transfected into the COX7A2L-KO cell line, by using 10 μ L of LipofectamineTM (Thermo Fisher) mixed with 4 μ g of vector DNA in OPTIMEM-I media (GIBCO), according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, the media was supplemented with 200 μ g/ml hygromycin and drug selection was maintained for at least 21 days.

In organello import of radiolabelled recombinant proteins

Plasmids with CIII subunit ORFs for *in organello* import were obtained from GeneCopoeiaTM. pReceiver-B31 vectors have *UQCR11* (EX-I0287-B31) and *UQCRFS1* or *RISP* (EX-A3744-B31) ORFs under the control of the T7 promoter. Radiolabeled UQCR11 and UQCRFS1 proteins were synthesized in the presence of [³⁵S]-methionine, using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). Import experiments were performed by incubating radiolabeled precursor subunits with 200 μ g of freshly isolated mitochondria prepared as reported (Fernández-Vizarra et al., 2010) in presence 33 μ L of import buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 600mM mannitol, 16 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 225 mM KCl, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 5 mM methionine and 3% (w/v) fatty acid-free bovine serum albumin) in a total volume of 200 μ L in STE buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4), at 37°C for increasing times (5 to 60 min). To assess import dependence of mitochondrial membrane potential, control samples were incubated with 10 μ M of CCCP. For SDS-PAGE analysis, samples were split into two aliquots and treated with or without 100 μ g/ml proteinase K (Sigma) for 20 min on ice, before stopping the reaction with 1 mM PMSF for 10 min. Mitochondria were pelleted at 8,000 xg for 8 min at 4°C and resuspended in 100 μ L of STE buffer for their further analysis. For BN-PAGE analysis, mitochondria samples were subjected to protease treatment and pelleted before undergoing the analysis as described above.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Unless indicated, all experiments were performed at least in triplicate and results were presented as mean \pm standard deviation (SD) of absolute values or percentages of control. Statistical *p* values were obtained by application of the Mann-Whitney *U* test using the SPSS v21.0 program. *p* < 0.05 was considered significant test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). Information on biological and technical replicates and statistical significance is included in the figure legends.

Cell Reports, Volume 25

Supplemental Information

Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics

Teresa Lobo-Jarne, Eva Nývltová, Rafael Pérez-Pérez, Alba Timón-Gómez, Thibaut Molinié, Austin Choi, Arnaud Mourier, Flavia Fontanesi, Cristina Ugalde, and Antoni Barrientos

Supplemental Figures

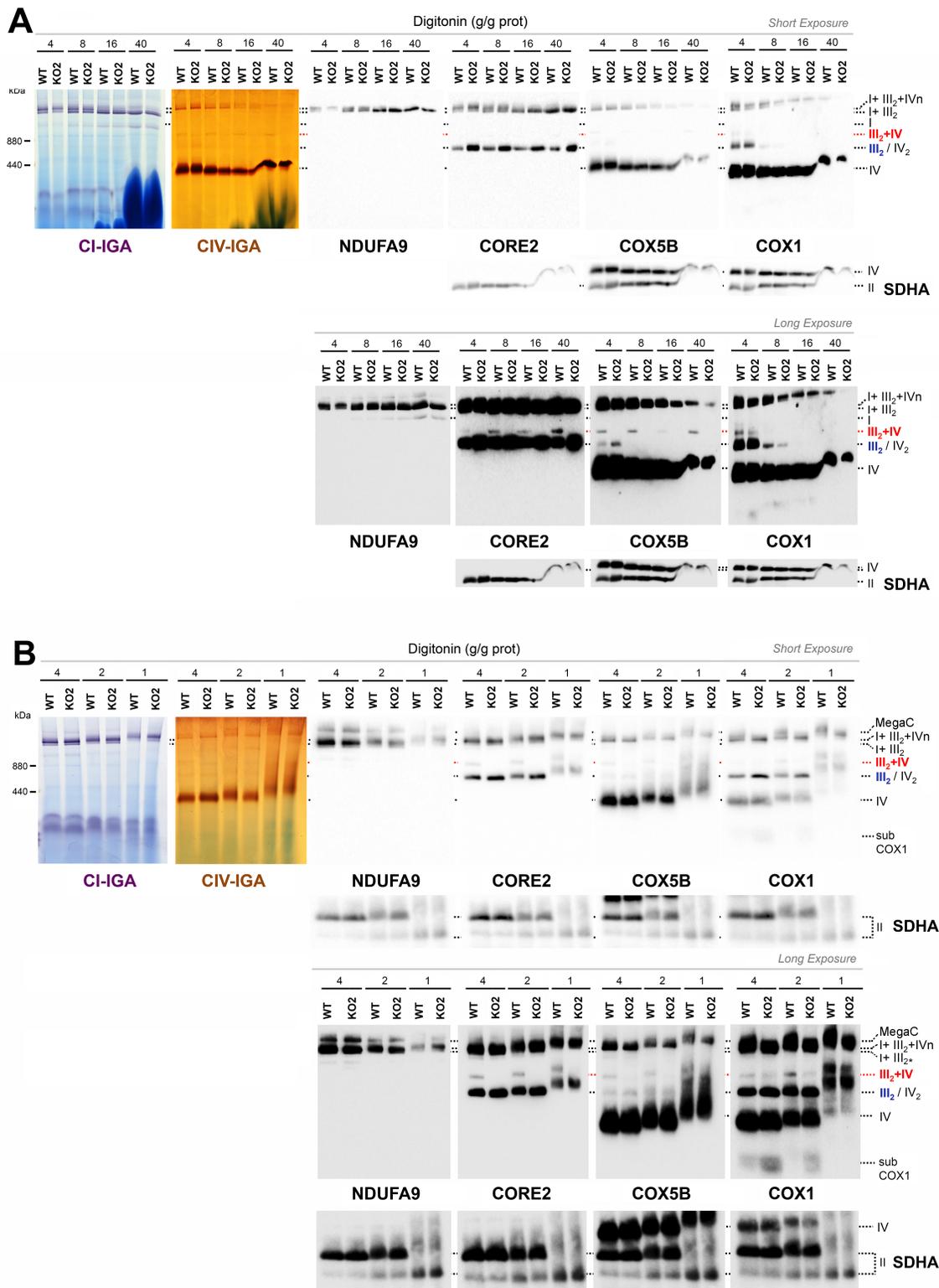


Figure S1. The absence of COX7A2L does not affect the stability of the respirasomes. Related to Fig 1.

Isolated mitochondria from control HEK293T cells (WT) and two *COX7A2L*-KO clones (KO1 and KO2) were treated with increasing (A) or decreasing (B) digitonin-to-protein ratios (ranging from 1 to 40 g/g) and were subsequently analyzed by BN-PAGE, followed by either CI-IGA and CIV-IGA assays or immunoblot analysis with antibodies against the complex I subunit NDUFA9, the complex III subunit CORE2 and the complex IV subunits COX1 and COX5B. MegaC, megacomplexes probably containing more than one copy of CI, CIII₂ and CIV; I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂ and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV (CIV); IV₂, complex IV dimer (CIV₂). II, complex II.

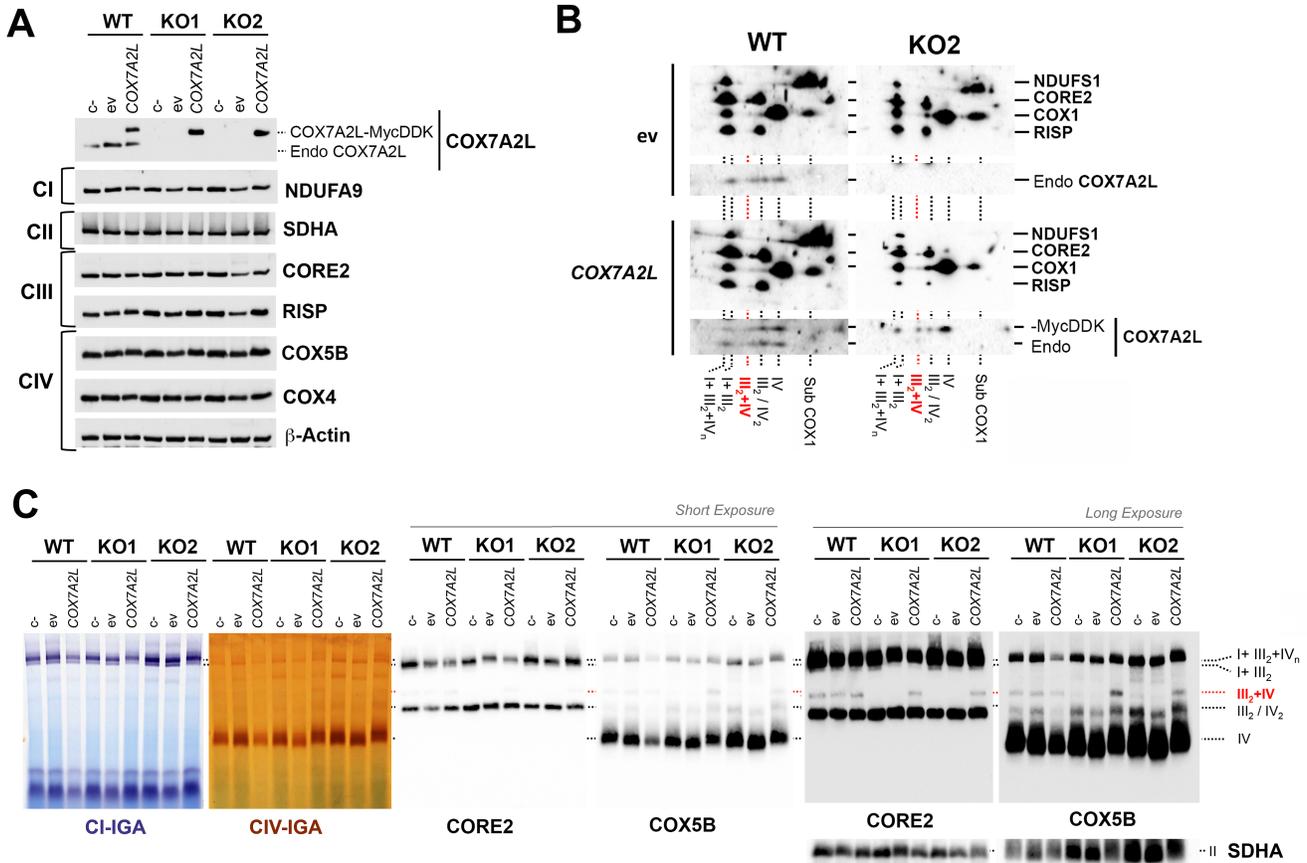


Figure S2. Tagged-COX7A2L interacts with mitochondrial respiratory chain complexes and supercomplexes and restores SC III₂+IV. Related to Fig 2.

(A) Immunoblot analysis of the untreated (c-), empty vector (ev) or overexpressed COX7A2L-Myc-DDK (COX7A2L) constructs in control HEK293T cells (WT) and two *COX7A2L*-KO clones (KO1 and KO2). Membranes were incubated with antibodies raised against the indicated OXPHOS subunits and the antibody against COX7A2L to differentiate endogenous COX7A2L (~12.6 kDa) from exogenous COX7A2L-Myc-DDK (~16.2 kDa). (B) Digitonin-solubilized mitochondrial extracts (4g digitonin/1 g protein) from control HEK293T cells (WT) and *COX7A2L*-KO clone 2 (KO2) stably transfected with either the *COX7A2L*-Myc-DDK construct or with the empty vector were analyzed by 2D-BN/SDS-PAGE and immunoblotting. (C) BN-PAGE was followed by CI-IGA, CIV-IGA and immunoblotting with the indicated antibodies. I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂ and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV (CIV); IV₂, complex IV dimer (CIV₂). II, complex II. Subcomplexes that contain COX1 are indicated as subCOX1.

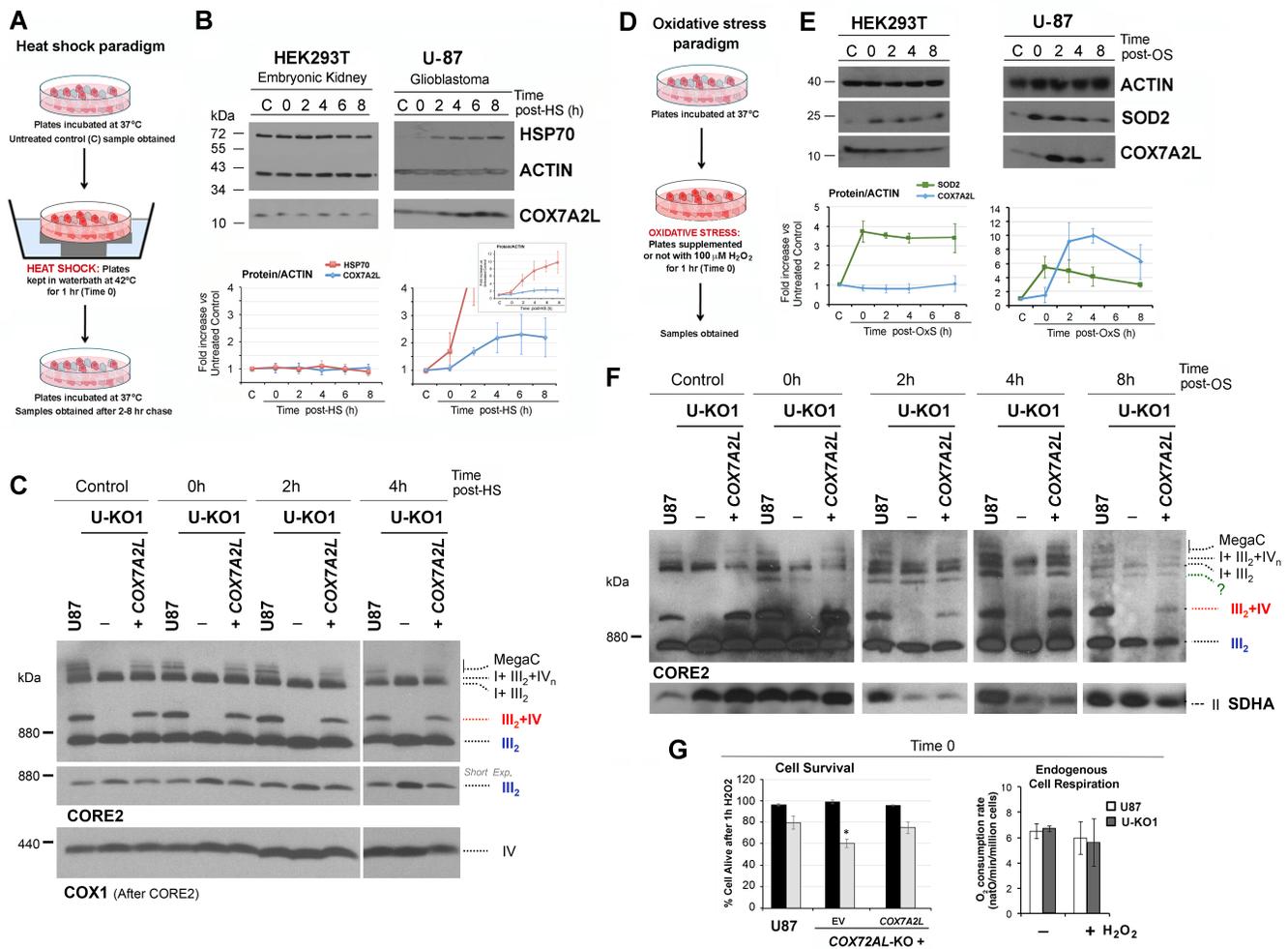
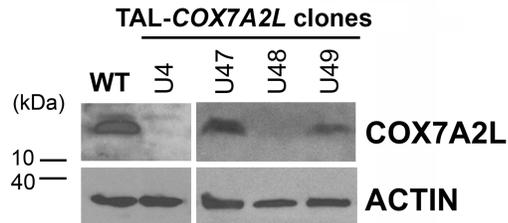
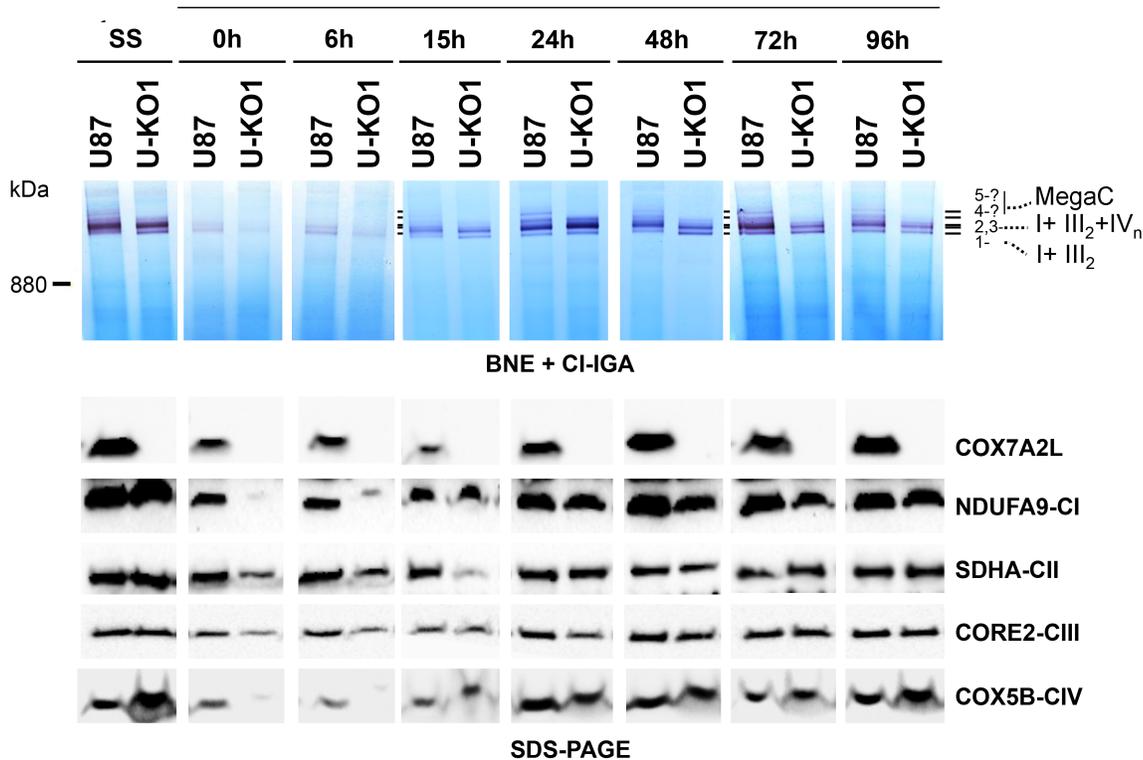


Figure S3. Heat-shock or acute oxidative stress do not affect the original MRC SC organization of WT and KO cells and do not reveal mitochondrial bioenergetics effects. Related to Fig 4.

(A and D) Scheme representing the heat-shock paradigm (A) or the acute oxidative stress paradigm (D) used in the study. (B and E) Immunoblot analysis of COX7A2L steady-state levels in HEK293T and U87 cells, in samples collected 0-8h following heat shock (HS) (B) or oxidative stress (OS) (E). C is an untreated control. HSP70 was used as a heat-shock control, SOD2 as an oxidative stress control and ACTIN as a loading control. The COX7A2L and HSP70 signals (in B) or the COX7A2L and SOD2 signals (in E) were quantified, normalized by ACTIN using the histogram function of the Adobe Photoshop program on digitalized images, and the values were expressed relative to the control. (C and F) BN-PAGE followed by immunoblotting in whole cell extracts from WT U87 and the *COX7A2L*-KO line U-KO1, reconstituted or not with a WT version (long) of *COX7A2L*, prepared in the presence of digitonin, using antibodies against CORE2 (CIII subunit), COX1 (CIV subunit) and SDHA (CII subunit). MegaC, megacomplexes probably containing more than one copy of CI, CIII₂ and CIV; I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂ and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV; II, complex II. (G) Cell survival measured by trypan blue exclusion and endogenous cell respiration measured polarographically in the indicated strains at time 0 following oxidative stress. EV, empty vector. Error bars represent the mean \pm SD of four repetitions. **P* < 0.05.

A**U87 Glioblastoma**

KO Clones	TAL Clones	COX7A2L Genotype	DNA	Protein
U-KO1	U4	Mut. Homo	c.-3_2del	p.0
U-KO2	U48	C. Hetero	c.-2_3del/ c.2_3del	p.0/ p.0

B**C****Recovery after doxycycline treatment****Figure S4. TALEN-mediated generation of COX7A2L-KO clones in U87 glioblastoma cells. Related to Fig 5.**

(A) COX7A2L alleles in TAL-COX7A2L clones. The DNA numbering refers to the coding sequence (c.) and the protein (p.) number to the predicted full polypeptide. C: compound; Mut: mutant; Hetero: heterozygous; Homo: homozygous; del: deletion; -: position before starting ATG. (B) Immunoblot analysis of the steady state levels of COX7A2L in U87 (WT) and TALEN-transfected U87 cell lines. ACTIN was used as a loading control. (C) U87 (WT) and COX7A2L-KO clone # 1 (U-KO1) cells were cultured for 8 days in the presence of 15 µg/ml doxycycline and collected at different time points (0, 6, 15, 24, 48, and 72h) after doxycycline removal. Mitochondria prepared from these samples were extracted with a digitonin:protein ratio of 4 g/g and analyzed by BN-PAGE in combination with CI-IGA assays (upper panel) or by SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. SS, untreated cells. The identity of MRC complexes and SCs is indicated in the margins.

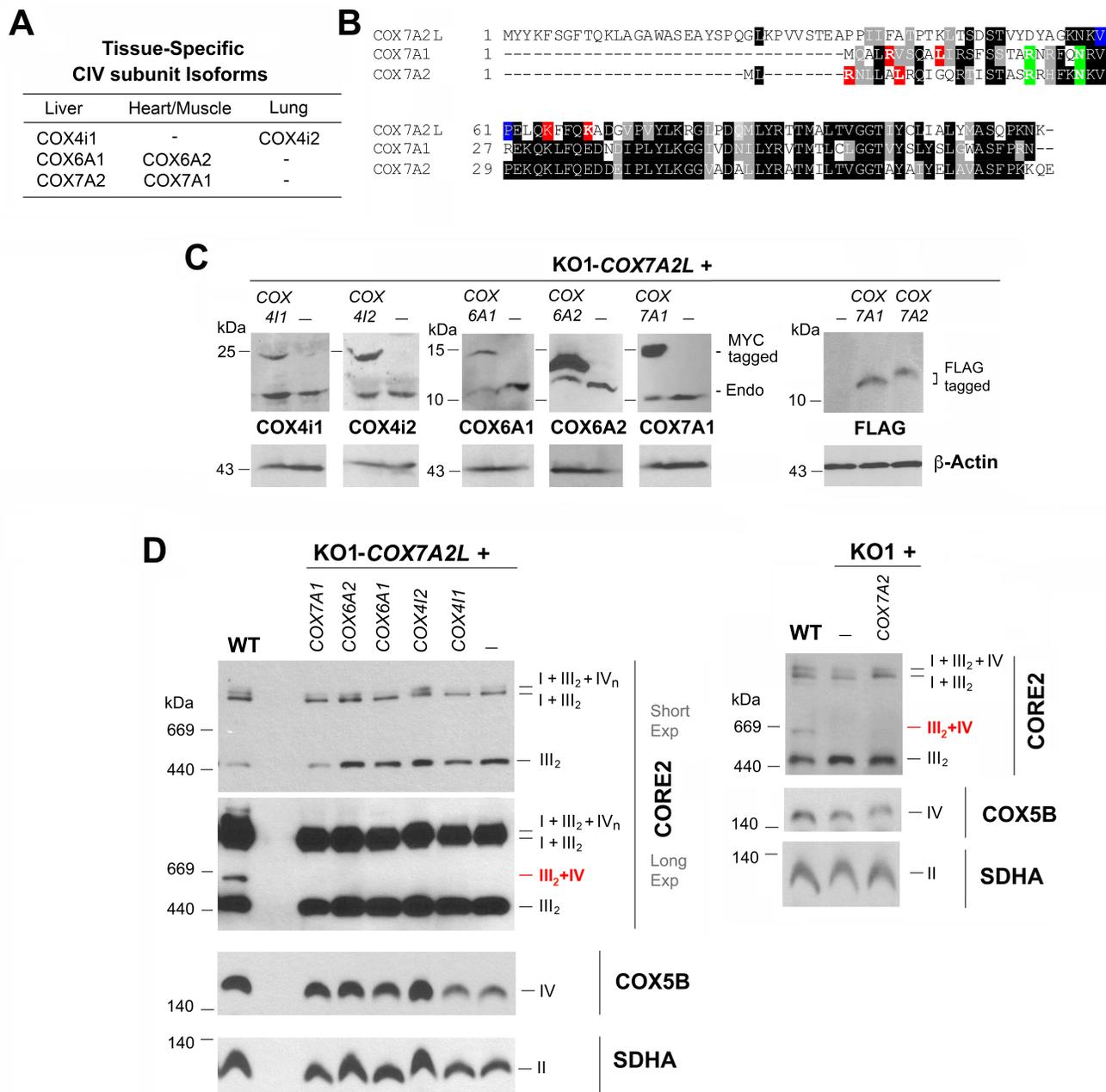
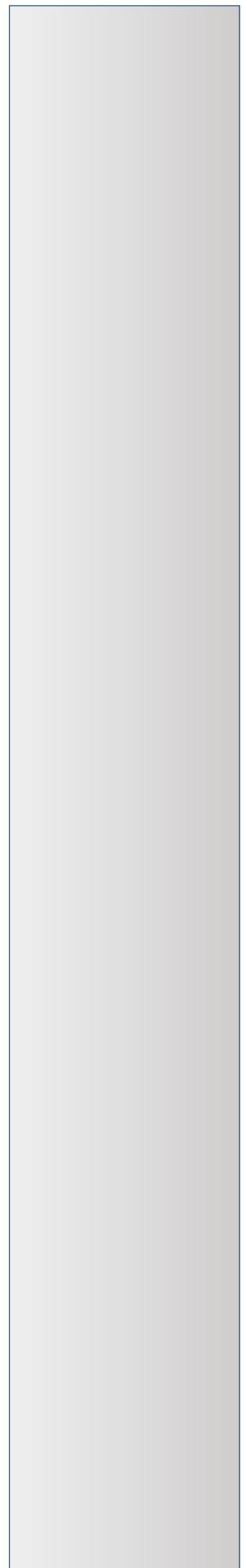


Figure S5. Overexpression of CIV-subunit tissue-specific isoforms do not rescue SC III₂+IV assembly in COX7A2L-KO cells. Related to Fig 6.

(A) Tissue-specific CIV subunit isoforms considered in this study. (B) Sequence alignment of human COX7A1, COX7A2 and COX7A2L. Residues in COX7A that interact with CI ND5 or with CIII UQCRC1 subunits were proposed based on high-resolution structures of the tight form of the I+III₂+IV₁ respirasome from ovine (*Ovis aries*) heart mitochondria (PDB 5J4Z). CIII-interacting residues are marked in red; CI-interacting residues are labeled in green, and residues deleted in the short COX7A2L form are in blue. The residues in COX7A2L are hypothetical, proposed from a model by Letts and colleagues (2016) in which COX7A2L was fitted into the place of COX7A in the respirasome structure. (C) Steady-state levels of Myc-tagged or FLAG-tagged versions of the indicated CIV isoforms, overexpressed in COX7A2L-KO cells. Endogenous (endo) and tagged versions of the proteins are indicated. (D) BN-PAGE followed by immunoblotting in whole cell extracts from the indicated cell lines prepared in the presence of digitonin, using antibodies against CORE2 (CIII subunit), COX5B (CIV subunit) and SDHA (CII subunit). I+III₂+IV_n, SCs containing CI, CIII₂ and CIV. I+III₂, SC containing CI and CIII₂. III₂+IV, SC containing CIII₂ and CIV. III₂, complex III dimer (CIII₂). IV, complex IV; II, complex II.

**MDH2 est l'aiguilleur
métabolique permettant
l'approvisionnement de la
chaîne respiratoire et du cycle
de Krebs**



4 Article 2.

4.1 Etat de l'art.

Dans cette deuxième partie de ma thèse, j'ai tenté d'étudier le rôle de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire et du métabolisme mitochondrial dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Comme j'ai pu le décrire dans la partie précédente, l'organisation supramoléculaire du SC III₂-IV ne semble pas influencer le fonctionnement des complexes I et II. Ces résultats corroborent également les premières études, faites chez *S. cerevisiae*, dans laquelle l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire ne dépend pas de l'organisation supramoléculaire des complexes III et IV (Bunoust et al., 2005; Pålman et al., 2002, 2001; Rigoulet et al., 2010).

Dans la *partie Article 1.*, l'utilisation de cellules en cultures a permis la création de modèles génétiques pour étudier l'impact d'une réorganisation de la partie terminale de la chaîne respiratoire sur son fonctionnement. Cependant, l'utilisation de la culture cellulaire possède plusieurs problématiques. Les conditions standards de cultures peuvent induire une dérive du métabolisme et mener à une sélection clonale. En effet, les conditions de cultures riches en glucose et en pyruvate sont promptes à sélectionner les cellules glycolytiques, ayant une forte fermentation lactique, minorant le rôle de la mitochondrie pour la réoxydation du NADH. Une autre problématique provient de la membrane plasmique qui empêche une maîtrise fine de l'approvisionnement en substrats des mitochondries. La perméabilisation de la membrane par la digitonine est très efficace, cependant il n'est pas possible de maîtriser la taille des pores formés par la digitonine dans la membrane. Il n'est pas possible non plus de contrôler l'environnement cellulaire dans lequel sont les mitochondries. En effet, la présence d'autres compartiments cellulaires ou d'enzymes peuvent avoir un impact sur le métabolisme mitochondrial et ne sont pas perdus durant la perméabilisation (*voir matériel et méthode, partie Comptage cellulaire*).

Afin de s'affranchir de ces problèmes, j'ai décidé d'utiliser des mitochondries isolées de différents tissus murins. L'utilisation de mitochondries permet d'étudier spécifiquement le métabolisme mitochondrial. Cette stratégie est le seul modèle permettant de discriminer spécifiquement le métabolisme mitochondrial du métabolisme cellulaire. Comme décrit dans l'introduction, il existe des isoformes d'enzymes présentes dans le cytoplasme et dans la mitochondrie, ne permettant donc pas de discriminer ce qui est

produit ou consommé dans la matrice ou dans le cytoplasme, comme le malate par exemple (*Article 2 figure 4A*). Ce système permet de maîtriser les métabolites qui sont fournis à la mitochondrie, facilitant l'analyse des voies métaboliques mises en jeu dans les processus étudiés. De plus, l'obtention d'une fraction enrichie en mitochondries permet d'observer des phénomènes marginaux comme certains supercomplexes de hauts poids moléculaires (*Article 1 figure 2A*), elle donne également accès à des métabolites présents en faibles concentrations, ou à des métabolites produits par la mitochondrie qui peuvent s'accumuler dans l'espace extra-mitochondrial en l'absence d'un cytoplasme. Afin d'étudier le rôle de l'organisation supramoléculaire et du métabolisme mitochondrial, j'ai effectué mon analyse sur deux tissus, le cœur et le foie, aux rôles et propriétés biochimiques très différentes (Benard et al., 2006; Brandt et al., 2017; Forner et al., 2006; McLaughlin et al., 2020).

Le cœur est un muscle strié qui bat continuellement afin de propulser le sang dans les vaisseaux sanguins, pour qu'il soit réparti dans l'ensemble du corps humain. Ces phases successives de systole (contraction) et diastole (dilatation) nécessitent la production d'énormément d'énergie sous forme d'ATP (environ 6kg par jour pour l'homme), pour permettre la contraction du cœur. Chez l'homme, il bat, en moyenne, entre 60 et 80 fois par minute au repos et peut monter jusqu'à 200 battements par minute lors de l'effort, son activité a donc une grande amplitude sur une courte période de temps. Cette production d'ATP dépend et nécessite une fine régulation entre la glycolyse (source de pyruvate et d'ATP), la bêta-oxydation, ou le cycle de Krebs (Doenst et al., 2013). Toutes ces voies métaboliques approvisionnent en électrons les OXPHOS, qui sont responsables de la quasi-totalité de l'ATP produite dans le cœur (Doenst et al., 2013; Ingwall, 2002). Le cœur doit donc posséder une grande flexibilité et une grande réactivité aux changements environnementaux pour pouvoir répondre aux besoins énergétiques, notamment pour la production d'ATP et régénération du NAD^+ , suivant les substrats métaboliques à disposition.

Le foie, par opposition, est un organe qui a un rôle pléiotropique dans le métabolisme des sucres, des protéines et des lipides. Il joue le rôle de tampon pour maintenir l'homéostasie métabolique du corps et permet le stockage de composés glucidiques ou lipidiques (Glycogénogenèse, lipogenèse) ou la transformation d'autres composés afin de détoxifier, de recycler certains métabolites (cycle de l'urée, glycolyse). Le foie, par ces multiples fonctions, possède donc une grande diversité de voies métaboliques qui lui sont spécifiques (Forner et al., 2006; McLaughlin et al., 2020),

comme par exemple, le cycle de l'urée, responsable du recyclage des acides aminés, la biosynthèse des triglycérides, responsable du stockage des lipides, ou la navette glycérol-3-phosphate, responsable du maintien du redox cytosolique et faisant le lien entre le métabolisme des lipides et la glycolyse. Les fonctions du foie permettent au corps humain de s'adapter entre les périodes postprandiales et les périodes de jeûne notamment. L'activité du foie s'étend sur plusieurs minutes, voire plusieurs heures. Le métabolisme hépatique ne subit pas d'aussi fréquents changements d'activités que ceux subit par le métabolisme cardiaque, son métabolisme est donc proche de son état stationnaire.

Ces différences de propriétés et de rôles physiologiques se transcrivent au niveau des caractéristiques des mitochondries de cœur et de foie qui sont ainsi très différentes par leurs structures, leur capacité à produire de l'énergie et l'enrichissement de certaines voies métaboliques, notamment des complexes de la chaîne respiratoire (Benard et al., 2006; Brandt et al., 2017).

4.2 Résumé des résultats de l'article.

Mon deuxième article de thèse avait pour objectif de déterminer comment était contrôlé le flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire entre les complexes I et II, en utilisant les différences bioénergétiques et de composition protéique des mitochondries de cœur et de foie. Lors de ce travail, j'ai pu (1) caractériser les mitochondries cardiaques et hépatiques suivant leurs propriétés bioénergétiques en fonction des substrats mitochondriaux, l'enrichissement des complexes de la chaîne respiratoire et l'organisation supramoléculaire de celles-ci. De plus, en utilisant des approches pour dissocier les flux dépendants de l'activité du complexe I ou du complexe II, j'ai tenté de mettre en évidence (2) si l'entrée des électrons par les complexes I et II dans des systèmes de mitochondries perméabilisées ou intactes pouvait être dictée par l'organisation supramoléculaire ou par le métabolisme mitochondrial. Enfin, j'ai par la suite (3) cherché à déterminer par quel mécanisme.

4.2.1 L'oxydation du NADH et du succinate diffère fortement entre les mitochondries cardiaques et hépatiques.

Des mitochondries de cœur et de foie ont été isolées à partir de souris C57BL/6N par fractionnement cellulaire puis centrifugations différentielles dans des conditions iso-osmotique pour les mitochondries. La première partie de l'étude a été l'isolement de

mitochondries intactes. Pour cela, lors des premières mesures de respiration, la qualité des mitochondries est testée, en présence des substrats du complexe I et du complexe II, grâce à l'ajout de cytochrome *c* puis de NADH, permettant de vérifier, respectivement, l'intégrité de la membrane externe et de la membrane interne mitochondriale. Afin de caractériser les capacités bioénergétiques de ces mitochondries, nous avons mesuré la respiration phosphorylante (Phosphorylating), non-phosphorylante (Non Phosphorylating) et découplée (Uncoupled) suivant différentes conditions de substrats respiratoires (*voir matériel et méthode partie 2.2.2.1*).

La première étape de mon travail a été de déterminer les conditions de substrats respiratoires permettant d'avoir les meilleurs flux respiratoires dépendants du complexe I ou du complexe II. Pour approvisionner le complexe II en électrons, l'ajout de succinate suffit car il est transporté à l'intérieur des mitochondries. Cependant, le NADH, qui est le substrat du complexe I, est utilisé comme contrôle de la qualité de la membrane interne mitochondriale. Le transport de NADH dans la mitochondrie n'est pas suffisant pour générer un flux respiratoire détectable (Cantó et al., 2015; Purvis and Lowenstein, 1961; Yang and Sauve, 2016), il faut donc passer par des systèmes de navettes métaboliques. Ces navettes sont des métabolites qui sont transportés dans la mitochondrie, pour être pris en charge par des déshydrogénases matricielles afin de générer du NADH dans la matrice mitochondriale. Les substrats des déshydrogénases les plus communément et universellement utilisés pour approvisionner le complexe I en NADH sont le pyruvate, le glutamate et le malate (Mourier et al., 2014a). Ces substrats permettent d'approvisionner des enzymes du cycle de Krebs ou satellites au cycle de Krebs. Les enzymes satellites sont ici définies comme celles impliquées dans la génération d'intermédiaires réactionnels du cycle de Krebs comme l'acétyl-CoA ou l'alpha-cétoglutarate, ou impliquées dans la navette malate/aspartate (*Article 2 figure 4A et Figure 4I*). Ces enzymes sont donc en étroite connexion avec le fonctionnement du cycle de Krebs. La présence et la quantité de ces déshydrogénases sont dépendantes du tissu étudié (Benard et al., 2006; Forner et al., 2006; McLaughlin et al., 2020). Par exemple, le foie peut générer du NADH par l'intermédiaire de la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase qui est une enzyme de la voie des cétones, alors qu'aucun flux respiratoire n'est détectable sur mitochondries de cœur avec ce substrat (*données non fournies*).

4.2.1.1 Caractérisation des capacités respiratoires des mitochondries intactes de cœur et de foie.

Lors de cette étude, je me suis uniquement concentré sur le pyruvate, le glutamate et le malate comme sources de NADH pour le complexe I. Les études sur mitochondries intactes montrent que la combinaison optimale de substrats respiratoires permettant d'approvisionner le complexe I est l'ajout simultané du pyruvate, du glutamate et du malate (PGM). Mes données montrent que l'ajout d'un seul des substrats du complexe I génère un flux respiratoire dérisoire par rapport aux capacités maximales du complexe I observées en PGM (*Article 2 figure 1SA*). L'utilisation de couples de substrats respiratoires du complexe I montre que l'ajout de malate au glutamate ou au pyruvate permet d'augmenter la respiration de 40 à 60 fois par rapport au couple pyruvate-glutamate (*Article 2 figure 1SB*). Il semble donc y avoir une synergie entre les substrats respiratoires du complexe I, dans laquelle le malate joue un rôle central. J'ai pu également observer la nécessité de l'ajout de roténone pour avoir les capacités maximales du complexe II (*Article 2 figure 1SC-D*), comme il est décrit dans la littérature (Mourier et al., 2014a). De manière étonnante, l'impact de la roténone sur le flux respiratoire du complexe II du foie est seulement visible en respiration découplée (*Article 2 figure 1SD*). La respiration due au complexe II sur le cœur se trouve fortement diminuée, de 40% en respiration découplée mais surtout de 75% sur la respiration phosphorylante (*Article 2 figure 1SC*). J'ai pu également observer que les mitochondries de cœur avaient des capacités respiratoires trois fois supérieures pour le complexe II et cinq fois supérieures pour le complexe I par rapport aux mitochondries de foie (*Article 2 figure 1A-B*). Outre ces capacités respiratoires très différentes entre le cœur et le foie, les chaînes respiratoires de foie ont une capacité d'oxyder le succinate trois fois supérieure à celle du NADH (*Article 2 figure 1B*), alors que cette différence est seulement de 20% dans le cœur (*Article 2 figure 1A*). L'ensemble de ces observations montre que ces mitochondries ont des capacités respiratoires à réoxyder le NADH et le succinate très différentes et que leurs réponses aux divers substrats ou inhibiteurs leurs sont propres.

Afin de déterminer si les chaînes respiratoires de cœur et de foie étaient capables de maintenir un flux respiratoire maximale des complexes I et II, j'ai ajouté simultanément les substrats de ces complexes (*Article 2 figure 1A-B*). Une légère augmentation du flux respiratoire sur le cœur et aucune augmentation sur foie sont observées. Ceci indique que les capacités respiratoires maximales du système des mitochondries intactes sont atteintes,

et donc que les chaînes respiratoires ne peuvent pas réoxyder au maximum de leurs capacités le NADH et le succinate quand les deux sont présents.

4.2.1.2 Caractérisation des capacités respiratoires des mitochondries perméabilisées de cœur et de foie.

Comme décrit plus haut, le NADH est généré par des déshydrogénases dont l'activité peut varier suivant les tissus. J'ai donc décidé d'utiliser un système de mitochondries perméabilisées afin d'approvisionner directement les complexes I et II en NADH et succinate. Ce modèle de mitochondries perméabilisées permet de s'affranchir du contrôle cinétique qui peut être mis en place sur l'approvisionnement en substrats, que ce soit par le transport des métabolites à travers la membrane ou par la génération du NADH dans la matrice. Ces conditions permettent d'avoir les capacités maximales de la chaîne respiratoire et non plus du système mitochondrial dans son ensemble comme décrit dans *la partie 4.2.1.1.*

Dans ces conditions, sans limitation de substrats, les mitochondries de cœur ont une capacité à réoxyder le NADH trois fois supérieure à la capacité en respiration découplée celles observées sur mitochondries intactes (*Article 2 figure 1A et C*). Par opposition, les capacités respiratoires du foie pour le complexe I et pour le complexe II sont sensiblement les mêmes entre les capacités en respiration découplée en mitochondries intactes et les mitochondries perméabilisées (*Article 2 figure 1B et D*), ce qui est aussi le cas pour la réoxydation du succinate sur cœur (*Article 2 figure 1C*). L'utilisation de ces deux tissus permet donc d'étudier deux systèmes diamétralement différents. Les chaînes respiratoires de cœur ont deux fois plus de capacité à réoxyder le NADH que le succinate, et inversement pour les mitochondries de foie. Ces différences dans ces capacités de réoxydation m'ont poussé à caractériser la composition en complexes de ces chaînes respiratoires cardiaques et hépatiques. Les expériences de quantifications des cytochromes et de quantifications relatives des protéines de la chaîne respiratoire montrent que les complexes sont deux à quatre fois plus abondants dans les mitochondries de cœur que de foie (*Article 2 figure 1E-G*). Le ratio de quantité relative de complexe I sur celle de complexe II montre que la stœchiométrie de ces complexes diffère grandement entre le cœur et le foie (*Article 2 figure 1H*). Ces différences corréleraient par ailleurs avec les capacités respiratoires à réoxyder le NADH et le succinate de ces deux tissus (*Article 2 figure 1C-D*).

J'ai tenté de déterminer si les chaînes respiratoires de mitochondries perméabilisées, permettant de s'affranchir des contraintes cinétiques apportées par le métabolisme

mitochondrial, de cœur et de foie, étaient capables de maintenir un flux respiratoire maximale des complexes I et II lorsque les deux sont approvisionnés en substrats. L'ajout simultané des substrats n'induit pas d'augmentation du flux respiratoire comme observé sur mitochondries intactes. Les chaînes respiratoires de cœur et de foie ne peuvent réoxyder à leur capacité maximale le NADH et le succinate lorsque les deux substrats sont présents (*Article 2 figure 1C-D*). Afin d'appréhender les proportions de flux respiratoire provenant du complexe I et du complexe II, il a fallu utiliser une stratégie permettant de discriminer quelle part du flux respiratoire était dépendante de l'activité du complexe I ou du complexe II en conditions de substrats multiples. Pour ce faire, j'ai utilisé la stratégie d'inhibition utilisée dans les *Articles 1*.

4.2.2 Les mitochondries de coeur et de foie réoxydent préférentiellement le succinate.

La première étape de ce travail a été de valider la spécificité des inhibiteurs sur nos modèles de mitochondries isolées de cœur et de foie (*Article 2 figure S2A-D*). Comme décrit précédemment, la roténone, inhibiteur du complexe I, induit une augmentation de la respiration liée au complexe II (*Article 2 figure S2A et C*). Cette augmentation est spécifique aux mitochondries intactes car aucun effet de la roténone n'est observé sur la respiration du complexe II en mitochondries perméabilisées (*données non fournies*). L'effet de la roténone semble donc être lié au métabolisme mitochondrial. L'atpenine A5, qui est l'inhibiteur du complexe II, est, quant à lui, spécifique du complexe II et n'a aucun effet sur la respiration du complexe I en pyruvate, glutamate, malate (*Article 2 figure S2B et D*). Les inhibiteurs sont donc spécifiques des complexes I ou II.

Une fois la validation de nos inhibiteurs faite sur nos modèles de mitochondries isolées, j'ai étudié la répartition du flux respiratoire provenant du complexe I ou du complexe II sur mitochondries perméabilisées. En présence de NADH et succinate, la respiration dépendante du complexe II est identique à la respiration mesurée en présence de succinate seul, pour le cœur et le foie (*Article 2 figure 2A et B*). Il est à noter que, dans ces conditions, la respiration dépendante du complexe I est diminuée de moitié par rapport aux respirations en présence de NADH seul, et ce, pour le cœur et pour le foie (*Article 2 figure 2A et B*). Il semblerait donc que le complexe II soit prioritaire pour donner ces électrons à la chaîne respiratoire. Afin de s'affranchir des potentielles dérives que pourrait avoir une stratégie reposant sur des inhibiteurs, nous avons développé une approche

indépendante permettant de déterminer l'activité du complexe I en présence de substrats multiples.

Le modèle de mitochondries perméabilisées induit une perte du métabolisme matriciel, cependant, il a l'avantage de permettre la mesure du flux de production de NAD^+ car ce dernier n'est plus rétro-converti par les déshydrogénases de la matrice. Ainsi, la mesure par dosage enzymatique du flux de production de NAD^+ a confirmé que le flux d'oxydation du NADH par le complexe I était diminué de 50% en présence de succinate (*Article 2 figure 2C et D*). De plus, les flux de production de NAD^+ sont les mêmes que ceux de la consommation d'oxygène dépendante du complexe I, ce qui prouve la robustesse de ces approches. Mes résultats montrent donc qu'il existe bien un phénomène de compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire de mammifère, qui semble privilégier les électrons provenant du complexe II au détriment de celle du complexe I. Ces résultats sont en totale contradiction avec le dogme actuel, soutenant que l'organisation supramoléculaire du complexe I lui conférerait la priorité pour donner ses électrons à la chaîne respiratoire, au dépens du complexe II qui n'est pas associé en supercomplexe (Lapiente-Brun et al., 2013; Schagger, 2000).

4.2.3 Le complexe I est associé en supercomplexes *a contrario* du complexe II.

J'ai par la suite étudié les différences qui pourraient exister entre les chaînes respiratoires de mitochondries isolées de cœur et de foie, en terme d'organisation supramoléculaire et en terme de stœchiométrie des complexes au sein des différents supercomplexes. Pour répondre à ces questions, j'ai solubilisé les protéines mitochondriales, à l'aide d'un détergent doux, la digitonine, afin de les séparer par électrophorèse non dénaturante appelée BN-PAGE (*voir matériel et méthode partie BN-PAGE*). J'ai utilisé deux approches pour séparer les différents supercomplexes. Pour la première les protéines migrent, dans un gradient d'acrylamide de 4-16% (*Article 2 figure 2E, S2E et I*), jusqu'à ce que le front de migration se retrouve en bas du gel. Cette approche permet d'avoir l'intégralité des complexes solubilisés, qu'ils soient associés en supercomplexes ou non, mais elle a le désavantage d'avoir une assez faible résolution pour la séparation des supercomplexes. La deuxième approche utilise un gradient d'acrylamide 3-12% (*Article 2 figure 2F, S2H*), dans lequel les protéines migrent jusqu'à être bloquées dans la maille d'acrylamide du gel. Par cette approche, la séparation des supercomplexes est grandement améliorée, et un plus grand nombre de supercomplexes est

résolu. L'inconvénient est la perte de certaines protéines ou complexes protéiques de petites tailles, comme le complexe II, qui sortent du gel.

L'utilisation de deux approches de détection, que sont l'immuno-détection et l'activité *in gel*, m'ont permis de confirmer que le complexe I et le complexe IV étaient moins présents dans les mitochondries de foie que dans les mitochondries cardiaques (*Article 2 figure 2E-F*). Cette diminution corrèle avec l'abondance et la diversité des supercomplexes qui sont observées. En effet, la présence de nombreux supercomplexes de hauts poids moléculaires est observable dans le cœur, *a contrario* ils sont beaucoup moins présents, voire absents dans le foie (*Article 2 figure 2F*). D'autre part, les respirasomes (I-III₂-IV) et supercomplexes plus petits sont bien présents, seules leurs abondances diffèrent entre les deux tissus (*Article 2 figure 2F*). Un autre point commun entre le cœur et le foie est que le complexe II n'est pas associé en supercomplexes (*Article 2 figure 2H*). Pour pouvoir quantifier la stœchiométrie des complexes de la chaîne respiratoire dans les supercomplexes j'ai réalisé un gel en deux dimension nommé BN/SDS-PAGE (*voir matériel et méthode partie 2.2.4.2.2*). Avec cette approche, j'ai pu déterminer la quantité relative et la proportion de complexe I, complexe II, complexe III et complexe IV associés en respirasome (*Article 2 figure 2I*). Les résultats sont en adéquation avec ceux décrits dans la littérature (Milenkovic et al., 2017). Le complexe I est associé à plus de 90% en respirasome pour le cœur et le foie. Les différences d'association en supercomplexes entre les mitochondries de cœur et de foie sont notables pour le complexe III associé à 70% dans le cœur contre 50% dans le foie et surtout pour le complexe IV associé à 50% dans le cœur contre 10% dans le foie. Les complexes III et IV sont donc moins associés dans le foie que dans le cœur, mais les déshydrogénases responsables de l'entrée des électrons, elles, ne varient pas, le complexe I étant associé contrairement au complexe II. La priorisation du flux d'oxydation du succinate ne dépend donc pas de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire ou de la stœchiométrie entre les complexes I et II.

Afin d'évaluer le caractère dynamique de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire, j'ai solubilisé des mitochondries cardiaques incubées dans différentes conditions de substrats dans lesquelles soit seul le complexe I (PGM) ou soit seul le complexe II (Succ+rot) était approvisionné, et trois conditions où le complexe I et complexe II étaient approvisionnés en même temps mais dans lesquelles la proportion de flux liée au complexe I varie entre 45%, 60% et 100% de ces capacités respiratoires (Succ+Glut, Succ+PG, Succ+PGM) (*Article 2 figure 4F-G*). Les résultats montrent très clairement que quelles que soient les conditions de substrats, il n'y a pas de réorganisation

dynamique des supercomplexes (*Article 2 figure S2H-I*). Par conséquent les proportions de flux respiratoire ne semblent pas dépendre d'une quelconque organisation supramoléculaire.

Mon travail démontre que les chaînes respiratoires de cœur et de foie sont régies par un même mécanisme de compétition dans lequel le complexe II est prioritaire pour donner ses électrons à la chaîne respiratoire par rapport au complexe I, et ce, indépendamment de l'organisation en supercomplexes et des capacités d'oxydation de NADH ou succinate.

4.2.4 Les mitochondries de cœur et de foies métaboliquement intactes réoxydent préférentiellement le NADH.

Les capacités respiratoires des mitochondries perméabilisées et intactes sont très différentes pour le cœur, notamment les capacités de réoxydation du NADH qui triplent lorsque le NADH alimente directement la chaîne respiratoire des mitochondries perméabilisées. Comme décrit précédemment (*Article 2 partie 4.2.2 et Figure 1A-B*), l'ajout simultané des substrats du complexe I et complexe II n'entraîne pas d'augmentation de respiration, les complexes de la chaîne respiratoire étant capable de supporter l'oxydation maximale du NADH et du succinate. Par conséquent, il semblerait également qu'un phénomène de compétition à l'entrée des électrons soit mis en place dans les mitochondries intactes ayant leur métabolisme matriciel.

Afin de discriminer la répartition du flux respiratoire dépendant du complexe I ou du complexe II, lorsque les deux sont approvisionnés en électrons, j'ai utilisé la même stratégie d'inhibition. L'inhibition des différents complexes a été faite lors de la respiration découplée. La respiration découplée étant la respiration maximale des mitochondries intactes, dans ces conditions, le flux d'électrons sera indépendant de la force proton motrice qui ne sera donc pas un frein cinétique pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. De plus, j'ai pu observer que, dans ces conditions, la séquence d'ajout des inhibiteurs du complexe I ou du complexe II n'allait pas influencer la répartition du flux respiratoire dépendant des complexes, lorsque les deux complexes sont approvisionnés simultanément (*Article 2 figure S3C-D*). Les données montrent que la respiration dépendante du complexe I n'est pas affectée en présence de substrats multiples pour le cœur et le foie, alors qu'au contraire la respiration dépendante du complexe II est diminuée de 40% pour le cœur et de 30% pour le foie, et est sensiblement la même que celle observée en succinate seul sans roténone (*Article 2 figure 3A-B et S3C-D*). Une nouvelle fois, les mitochondries

de cœur et foie réagissent de la même manière malgré leurs capacités à réoxyder des substrats très différents. Toutefois, par opposition avec ce qui est observé en mitochondries perméabilisées, la réoxydation du NADH est prioritaire sur celle du succinate. La préférence naturelle pour l'oxydation du succinate observée dans le modèle de mitochondrie perméabilisée semble être contrecarrée dans le contexte de mitochondrie métaboliquement active.

4.2.5 L'oxaloacetate orchestre le changement de priorité entre les complexes I et II, avec la Malate déshydrogénase 2 comme point de contrôle.

Afin de comprendre le mécanisme permettant de renverser cette capacité naturelle à prioriser la réoxydation du succinate, j'ai essayé de comprendre l'impact de l'ajout des différents substrats sur le métabolisme mitochondrial, et notamment le lien entre la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et la navette malate/aspartate.

Comme décrit précédemment, les capacités du complexe II sont les mêmes entre les mitochondries perméabilisées et mitochondries intactes, lorsqu'un inhibiteur du complexe I est ajouté au succinate pendant la respiration. Comme présenté plus tôt (*Article 2 figure SIC-D*), l'absence de cet inhibiteur entraîne une diminution de respiration du complexe II de 40% pour le cœur et 30% pour le foie. L'ajout de l'inhibiteur du complexe I sur mitochondries intactes a été décrit comme permettant de prévenir l'accumulation de l'oxaloacetate. Ce métabolite est le produit de la MDH2 (*Article 2 figure 4A*) et est connu comme étant un inhibiteur compétitif du complexe II (Fink et al., 2018; Gnaiger, 2009; Schollmeyer and Klingenberg, 1961). L'oxaloacetate est un inhibiteur spécifique et très efficace, 90% de l'activité du complexe II est inhibée dès 1 μ M lorsque la respiration du complexe II est réalisée sur mitochondries perméabilisées (*Article 2 figure S3A*). Le modèle décrivant le mécanisme d'action de la roténone définit que l'inhibition du complexe I empêche la réoxydation du NADH produit par les déshydrogénases matricielles. Par conséquent, MDH2 étant privée de son substrat, elle ne peut plus générer d'oxaloacetate ce qui limite fortement l'inhibition du complexe II. Dans le but d'étudier le rôle de l'oxaloacetate sur la respiration et son rôle dans le métabolisme mitochondrial, j'ai développé un dosage enzymatique (*voir matériel et méthode partie 2.2.5.1.2*) me permettant de mesurer la concentration d'oxaloacetate dans les différentes conditions de respiration. Mes résultats confirment que, sur cœur et sur foie, la stimulation de respiration

liée à l'utilisation d'inhibiteurs du complexe I permet de diminuer la quantité d'oxaloacetate (*Article 2 figure 3C-D*). Par extension, le flux respiratoire lié au complexe II semble être corrélé avec la quantité d'oxaloacetate. En effet, la respiration en succinate et la respiration liée au complexe II en substrats multiples (succinate, pyruvate, glutamate, malate) sont égales en terme de flux respiratoires mais également au niveau de la quantité d'oxaloacetate (*Article 2 figure 3C-D*). Il semblerait donc que l'oxaloacetate soit l'entité permettant de limiter l'activité du complexe II lorsque le métabolisme mitochondrial est intact.

Dans le modèle permettant d'expliquer l'activation de la respiration par un inhibiteur du complexe I, lorsque les mitochondries sont approvisionnées en succinate, MDH2 semble jouer un rôle central. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences de fluorimétrie qui montrent que cette diminution de quantité d'oxaloacetate est corrélée avec l'augmentation du niveau de NAD(P)H lors de l'ajout de roténone (*Article 2 figure 3E et S3B*). De plus, des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) montrent que la roténone permet d'augmenter le flux de production de malate et de fumarate (*Article 2 figure 3F*), mettant ainsi en évidence un blocage de MDH2 induit par l'ajout de roténone. L'ensemble de ces expériences permettent de mettre en lumière le rôle de l'oxaloacetate et de MDH2 comme régulateurs clé de l'activité du complexe II et de l'interconnexion forte entre le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

4.2.6 MDH2 est l'aiguilleur métabolique permettant la redirection des flux d'approvisionnement de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs.

4.2.6.1 MDH2 est le lien entre la navette malate-aspartate et l'activité complexe II.

Outre son rôle dans le cycle de Krebs, MDH2 est un élément essentiel de la navette malate/aspartate (*Article 2 figure 4A*). Cette navette permet le transfert indirect du NADH du cytoplasme vers la mitochondrie (Borst, 2020, 1962; LaNoue et al., 1973). Lors de stress liés à l'augmentation du NADH cytosolique, le niveau de malate cytosolique augmente, entraînant l'augmentation de l'activité de la MAS (Safer et al., 1971). Ce processus permet d'augmenter la réoxydation du NADH cytosolique par la mitochondrie.

Afin d'étudier la relevance de la régulation métabolique de l'oxaloacetate sur la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et la navette malate/aspartate, j'ai mimé

l'augmentation du niveau de NADH cytosolique en incubant les mitochondries avec des concentrations croissantes de malate en présence de succinate durant la respiration sur mitochondries intactes de cœur (*Article 2 figure 4B-D*) et de foie (*Article 2 figure S4A-C*). Ces expériences montrent que l'augmentation de la concentration de malate induit jusqu'à 60% de diminution de respiration liée au complexe II par rapport à la respiration optimale du complexe II (succ+rot) (*Article 2 figure 4B et S4A*). De plus, dans ces conditions, la quantité d'oxaloacetate est augmentée jusqu'à 6 fois pour le cœur et jusqu'à 2,5 fois pour le foie (*Article 2 figure 4C et S4B*). La proportionnalité entre ces deux phénomènes montre la corrélation qu'il existe entre le degré d'inhibition de la respiration dépendante du complexe II et la quantité d'oxaloacetate (*Article 2 figure 4D et S4C*). Le malate n'ayant pas d'impact sur la respiration liée au complexe II sur mitochondries perméabilisées (*Article 2 figure S4D*), confirme que c'est l'oxaloacetate, en s'accumulant dans le compartiment matriciel, qui induit l'inhibition du complexe II (*Article 2 figure S4D*). Ces résultats expliquent également que l'effet de la roténone n'est observable que sur des mitochondries intactes, car il est nécessaire que la membrane interne soit intacte pour permettre l'accumulation de l'oxaloacetate dans la matrice. Il est important de noter que les quantités d'oxaloacetate qui s'accumulent dans le foie sont jusqu'à six fois inférieures à ce qui est accumulé dans les mitochondries de cœur. L'ensemble de ces résultats montrent donc qu'une augmentation de malate extracellulaire induit la mise en place d'une régulation métabolique, liée à MDH2 et à l'oxaloacetate, permettant de limiter l'oxydation du succinate.

4.2.6.2 Lien entre la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et la navette malate-aspartate : une redirection du flux respiratoire du complexe II vers le complexe I.

MDH2 est une enzyme centrale dans le métabolisme mitochondrial, elle est à la croisée du cycle de Krebs, de la MAS et de la chaîne respiratoire, par son rôle de régulateur du complexe II, grâce à l'oxaloacetate, mais également comme fournisseur essentiel de NADH pour le complexe I. Ceci est confirmé par mes expériences sur l'optimisation des conditions de substrats respiratoires, le malate est primordial pour avoir un flux lié au complexe I (*Article 2 figure S1A-B*). Cette enzyme est donc essentielle pour contrôler l'activité du complexe II mais également celle du complexe I. Afin d'aller plus loin dans la compréhension du rôle central que possède MDH2 et l'oxaloacetate, j'ai voulu diminuer le

niveau de ce dernier autrement qu'en inhibant le complexe I. Cette approche m'a permis d'étudier l'impact d'une consommation de l'oxaloacetate sur la respiration dépendante du complexe II mais également sur la respiration dépendante du complexe I. En effet, l'oxaloacetate est au carrefour entre le cycle de Krebs, en tant que substrat de la citrate synthase (CS), et de la navette malate/aspartate, en tant que substrat de la GOT2 (*Article 2 figure 4A*). J'ai donc décidé d'approvisionner ces deux voies métaboliques pour consommer l'oxaloacetate et ainsi limiter l'inhibition du complexe II. Le cycle de Krebs est approvisionné en ajoutant le pyruvate, qui fournit au système du NADH par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase (PDH) mais également de l'acétyl-CoA qui est un substrat avec l'oxaloacetate de la CS. La MAS est, quant à elle, approvisionnée en ajoutant du glutamate qui peut également fournir au système du NADH par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase (GDH) mais surtout pour l'approvisionnement en substrats de la GOT2, enzyme clé de la navette malate/aspartate consommant de l'oxaloacetate et du glutamate (*Article 2 figure 4A*).

Mes résultats montrent que les ajouts de pyruvate et de glutamate sont efficaces et diminuent jusqu'à 50% la quantité d'oxaloacetate, ce qui est similaire à ce qui est observé lors de l'ajout de roténone en succinate (*Article 2 figure 4E*). En parallèle, la respiration dépendante du complexe II est augmentée entre 40% et 50% par rapport à la condition en succinate seul (*Article 2 figure 4F*). Sur les mitochondries de foie, la consommation d'oxaloacetate est moins efficace et cela se traduit sur la respiration liée au complexe II qui ne varie pas ou faiblement par rapport à la condition succinate (*Article 2 figure S4E-F*). J'ai également pu noter, que l'ajout simultané de pyruvate et de glutamate au succinate ne permet pas d'avoir d'effet cumulatif sur la respiration liée au complexe II, décrivant soit que la respiration maximale du complexe II est atteinte, soit qu'il n'est pas possible de descendre en dessous d'un certain niveau d'oxaloacetate.

De plus, les résultats montrent également la présence d'un flux respiratoire dépendant du complexe I, par opposition avec ce qui a été observé lorsque le pyruvate ou le glutamate sont utilisés comme substrats respiratoires seuls ou en combinaison en absence de malate (*Article 2 figure S1A-B*). Précédemment, il a été montré que dans les conditions respiratoires de succinate et roténone, le malate est produit par le complexe II à partir du succinate (*Article 2 figure 3-F*). Mes résultats indiquent que le complexe II peut être une source de malate intra-mitochondriale dépendante de l'anaplerose. C'est donc cette source de malate, et surtout d'oxaloacetate, qui permet de faire fonctionner le système des déshydrogénases et la navette malate/aspartate pour approvisionner le complexe I en

NADH. Cette dépendance du système des déshydrogénases au malate, qu'il soit produit par le complexe II ou importé, met encore plus en évidence le rôle fondamental de MDH2 dans ce lien métabolique entre chaîne respiratoire, cycle de Krebs et la MAS.

Enfin, j'ai étudié si lors d'un stress redox cytosolique, mimé par l'augmentation de la concentration de malate dans le tampon d'incubation, MDH2 et la navette malate/aspartate pouvaient favoriser la réoxydation du NADH au détriment du succinate en redirigeant le flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Pour cela, j'ai incubé les mitochondries avec des concentrations croissantes de malate en présence de succinate, et également en présence des substrats permettant d'activer les voies de consommation de l'oxaloacetate et de production de NADH et permettant d'avoir les conditions de substrats optimales pour l'approvisionnement du complexe I (*Article 2 figure 4G*). Malgré les voies de consommation de l'oxaloacetate, l'augmentation de la concentration de malate montre une diminution de la respiration dépendante du complexe II, avec dans un même temps une augmentation de respiration dépendante du complexe I (*Article 2 figure 4G*). Cette figure montre clairement la redirection des flux respiratoires de la consommation maximale du succinate vers la consommation maximale du NADH orchestrée par la variation de concentration extramitochondriale de malate.

4.3 Discussion.

Physiologiquement, les mitochondries sont en présence de substrats respiratoires multiples approvisionnant les différentes ubiquinone oxydoréductases du système. Des travaux sur *S. cerevisiae* ont permis de montrer que la chaîne respiratoire pouvait favoriser le flux d'oxydation d'un substrat respiratoire par rapport à un autre en consommant séquentiellement les substrats (Påhlman et al., 2002). Mon travail a été de déterminer si les chaînes respiratoires de mammifères possédaient elles aussi la capacité de favoriser un flux de consommation d'un substrat par rapport à un autre. C'est à travers l'étude de mitochondries de cœur et de foie possédant des capacités de réoxydation du NADH et du succinate très différentes et de stratégies permettant de discriminer les flux provenant de l'activité du complexe I ou du complexe II que j'ai tenté de déterminer si un tel phénomène était mis en place chez le mammifère et par quel mécanisme.

4.3.1 Etude de la répartition du flux respiratoire entre le complexe I et du complexe II dans un système de mitochondries perméabilisées.

L'utilisation de mitochondries perméabilisées m'a permis de m'affranchir des contraintes thermodynamiques et des contraintes d'approvisionnement en substrats liées à la membrane interne mitochondriale. Par cette approche, l'étude de la respiration et des flux de production de NAD^+ met en évidence que succinate et NADH sont consommés simultanément. Cependant, les expériences montrent que le flux de consommation du NADH est diminué par rapport à celui du succinate. Ces résultats sont les premiers décrivant que la chaîne respiratoire de mammifère est soumise à un phénomène de compétition à l'entrée des électrons, mais également les premiers décrivant que l'activité du complexe II était prioritaire sur le complexe I. Mes travaux confirment les résultats obtenus par d'autres laboratoires observant que 90% du complexe I est associé en supercomplexes, alors que le complexe II ne l'est pas (Milenkovic et al., 2017; Mourier et al., 2014a), signifiant que l'association en supercomplexe du complexe I ne lui confère pas d'avantage pour donner ses électrons, et ceux quelles que soient les capacités à réoxyder le succinate ou le NADH. De plus, j'ai pu observer que les différences d'organisation supramoléculaire de chaînes respiratoires entre le cœur et le foie proviennent de l'association du complexe III et surtout du complexe IV, qui sont moins associés en respirasome dans le foie. Comme les résultats décrits dans *l'Article 1*, l'organisation des deux derniers complexes de la chaîne respiratoire ne semble pas jouer de rôle dans l'entrée des électrons. Ces résultats vont, encore une fois, à l'encontre des schémas actuels de fonctionnement de la chaîne respiratoire décrivant que l'organisation supramoléculaire du complexe I associé en supercomplexe permet de favoriser la réoxydation du NADH par canalisation de l'ubiquinone et du cytochrome *c* (Lapiente-Brun et al., 2013; Schagger, 2000).

Un mécanisme semble régir le phénomène de compétition à l'entrée des électrons permettant de privilégier l'oxydation du succinate dans les mitochondries de cœur et de foie, mais il ne dépend ni de l'organisation supramoléculaire du complexe I, ni de la quantité de complexes IV associés en respirasome, confirmant les travaux d'autres laboratoires décrivant qu'il n'y a pas de canalisation des transporteurs mobiles d'électrons au sein des supercomplexes (Bianchi et al., 2004; Blaza et al., 2014; Fedor and Hirst, 2018). De plus, les différences de capacités à réoxyder le NADH et le succinate entre le cœur et le

foie démontrent que ce n'est pas non plus ce qui dicte la priorisation d'une déshydrogénase par rapport à une autre.

Pour l'heure, aucun mécanisme permettant d'expliquer pourquoi le complexe II est prioritaire sur le complexe I n'est démontré. Néanmoins, il a été décrit chez *S. cerevisiae* que l'état d'oxydoréduction de l'ubiquinone pourrait être une explication des compétitions entre les ubiquinone oxydoréductases externes et internes (Rigoulet et al., 2010). En effet, bien qu'aucune ubiquinone oxydoréductase ne semble associée en supercomplexe chez cette levure, et par conséquent qu'il n'y ait pas de phénomène de canalisation de l'ubiquinone, il a été déterminé que le pool d'ubiquinone pouvait se comporter comme deux populations ayant des états redox distincts (Rigoulet et al., 2010). La population d'ubiquinones ayant l'état redox le plus réduit est associée avec les déshydrogénases tournées vers l'espace intermembranaire, et la population la moins réduite avec le transfert d'électrons des déshydrogénases tournées vers l'espace matriciel (*Figure 28*) (Rigoulet et al., 2010). Chez le mammifère, il a été décrit que les ubiquinones se comportent comme un seul et même pool dans les chaînes respiratoires (Blaza et al., 2014; Fedor and Hirst, 2018), et non pas comme deux pools distincts (un canalisé dans les supercomplexes et l'autre diffusant librement dans la membrane). Ici, deux paramètres se confrontent, l'un sur l'état d'oxydoréduction des ubiquinones et l'autre sur la diffusion et le libre-échange de l'ubiquinone entre les ubiquinone oxydoréductases (Blaza et al., 2014; Fedor and Hirst, 2018). Il est possible que les ubiquinones se comportent physiquement comme une seule entité et qu'elles ne soient pas canalisées dans les supercomplexes, mais qu'elles possèdent une certaine régiospécificité au sein de la membrane, engendrant des différences d'état redox et donc se comportant comme deux populations d'ubiquinones.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les ubiquinone oxydoréductases sont décrites comme étant des protéines extrinsèques de la membrane interne mitochondriale et sont donc localisées sur deux feuilletts distincts de la membrane interne (*Figure 28*). Par opposition chez le mammifère, les complexes I et II se trouvent enchâssés dans la membrane interne mitochondriale, et ne semblent donc pas posséder de localisation particulière sur l'un ou l'autre des feuilletts (*Figure 6*). Cependant, comme j'ai pu le décrire dans les parties *1.1.2.1.1* et *1.1.2.1.2*, les sites de réduction de l'ubiquinone se trouvent dans la matrice pour le complexe I (*Figure 8*) et un des deux sites de réduction de l'ubiquinone du complexe II se trouve sur le feuillet interne de la membrane interne (*Figure 9*). Cependant, le complexe II semble posséder un deuxième site de réduction de l'ubiquinone, localisé sur le feuillet externe de la membrane interne (*Figure 9*) (Sun et al., 2005). Pour l'heure, le rôle et la

relevance de cette hypothétique deuxième site de réduction pose question, mais il pourrait être une explication du mécanisme de compétition sur mitochondries cassées. S'il existe des différences d'états redox entre les ubiquinones du feuillet interne et du feuillet externe, il pourrait y avoir une compétition entre le transfert d'électrons provenant du complexe I et ceux du site Q_D du complexe II. Le site Q_P approvisionnant une autre population d'ubiquinone ayant un état redox différent qui permettrait de maintenir un flux de consommation du succinate maximal.

4.3.2 Etude de la répartition du flux respiratoire entre le complexe I et complexe II dans un système de mitochondries intactes.

Par la suite, j'ai étudié la répartition du flux d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire dans un système de mitochondries intactes, comportant un métabolisme mitochondrial fonctionnel. Cette stratégie permet de recontextualiser le phénomène de compétition à l'entrée des électrons dans le cadre de l'étude du métabolisme mitochondrial, afin de comprendre le rôle et l'implication de cette compétition sur le métabolisme.

Mes expériences ont permis de déterminer que la préférence naturelle que possédait la chaîne respiratoire de mammifère à réoxyder le succinate allait être contrebalancée par le métabolisme mitochondrial, *via* l'inhibition du complexe II par l'oxaloacetate. J'ai pu montrer que la MAS semblait jouer un rôle actif dans la redirection des flux métaboliques et dans la priorisation du flux de consommation du NADH au détriment de celui du succinate. J'ai pu observer que l'augmentation de l'activité de la MAS, liée à une augmentation de la concentration de malate, induisait une diminution de la respiration liée au complexe II et une augmentation de la respiration provenant du complexe I. Par ce mécanisme, médié par l'oxaloacetate, les mitochondries de mammifère favorisent l'oxydation du malate extra-mitochondriale fournit par la MAS, au détriment du malate produit par le complexe II et le métabolisme anapleurotique, favorisant par conséquent la réoxydation du NADH sur l'oxydation du succinate. Ceci démontrant que l'oxaloacetate n'est pas seulement un inhibiteur du complexe II mais également un métabolite central permettant le contrôle de l'approvisionnement en NADH du complexe I. Ce qui fait de lui un des régulateurs majeurs de l'activité de la chaîne respiratoire.

Chez la levure, il a été montré que la réoxydation du NADH cytosolique était prioritaire sur le NADH mitochondrial (Bunoust et al., 2005). Chez les mammifères, le maintien de la balance redox du NADH/NAD⁺ est un challenge pour la cellule, et un défaut dans ce dernier entraîne de nombreuses pathologies (Ait-El-Mkadem et al., 2017; Hayes et

al., 1987; van Karnebeek et al., 2019). Il semblerait par conséquent que les mitochondries favorisent la réoxydation du NADH cytosolique au détriment des autres ubiquinones oxydoréductases que ce soit par une compétition entre donneur d'électrons au sein de la chaîne respiratoire comme chez la levure, ou par la régulation de l'approvisionnement de la chaîne respiratoire *via* métabolisme mitochondrial comme chez le mammifère.

Un mécanisme d'assemblage/désassemblage des supercomplexes, permettant la redirection des flux respiratoires, semble moins adapté au métabolisme cellulaire et notamment au métabolisme cardiaque. En effet, l'oxaloacetate a un effet immédiat et réversible à faibles concentrations sur le complexe II. Ce qui fait de lui un outil très puissant pour rapidement et efficacement rediriger les flux d'une déshydrogénase à l'autre. Ce mécanisme de régulation semble d'autant plus important et en adéquation dans un tissu comme le cœur où les changements d'activités sont fréquents et rapides (Andrienko et al., 2017; Brandes et al., 1998; Chouchani et al., 2014).

L'étude des substrats respiratoires pour obtenir les capacités maximales des complexes I et II sur mitochondries intactes (*Article 2 figure S1*), ainsi que la discrimination des flux respiratoires en présence des substrats des complexes I et II, a permis de mettre en lumière l'interconnexion entre les différentes voies métaboliques que sont la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs et la MAS. La production de NADH nécessite du malate et de l'oxaloacetate pour fonctionner au maximum de ces capacités, en approvisionnant la MAS ou la citrate synthase qui permet de régénérer l'acetyl-CoA produit par la PDH (*Article 2 figure 4A*). D'autres voies métaboliques sont également interdépendantes les unes avec les autres. En effet, la β -oxydation dépend de l'activité de l'ETF-QO mais également de la réoxydation du NADH, il est donc probable que la β -oxydation soit régulée par l'activité de la chaîne respiratoire mais également par le potentiel redox du cytoplasme, lui-même dépendant de l'activité de la chaîne respiratoire à cause de la MAS (Eaton et al., 1993; Watmough and Frerman, 2010). De plus, d'autres ubiquinone oxydoréductases sont sous la dépendance de l'activité de la chaîne respiratoire (*Figure 10*). La compréhension du mécanisme de compétition et de régulation de la chaîne respiratoire est donc primordiale pour appréhender les adaptations et les connections entre toutes ces voies.

L'utilisation de mitochondries isolées permet de discriminer le métabolisme mitochondrial du métabolisme cellulaire afin de pouvoir étudier les flux d'entrée et de sortie spécifiques de la mitochondrie. Mes expériences laissent entrevoir une segmentation du cycle de Krebs. Lors de la validation des inhibiteurs, j'ai pu constater que l'atpénine A5

(inhibiteur du complexe II) n'avait pas d'impact sur le flux respiratoire lié au complexe I. Cependant, en étudiant le réseau métabolique qu'implique la respiration du complexe I, la production de succinate et donc un flux respiratoire du complexe II semble inévitable. Le cycle de Krebs est représenté comme un cycle fermé, par conséquent l'ajout de pyruvate et de malate devrait permettre au cycle d'être complet. De plus, l'ajout de glutamate devrait permettre la production d' α -cétoglutarate par la GDH et par la GOT2 lorsque du malate est présent (*Figure 41*). Il semblerait donc qu'il y ait un ou plusieurs blocages ne permettant pas de compléter le cycle de Krebs. Ceci semble être en accord avec notre modèle décrivant la priorisation de la consommation du malate extra-mitochondrial au détriment du succinate et du malate mitochondrial. En effet, si le cycle de Krebs avait la capacité de se faire en intégralité, la production de succinate comme sous-produit des déshydrogénases matricielles, permettant l'approvisionnement en NADH du complexe I, induirait une production de malate par l'anaplerose (*Figure 41*). Cette dernière rentrerait par conséquent en compétition avec la réoxydation du malate cytosolique, et donc avec la réoxydation du NADH cytosolique. La segmentation du cycle de Krebs, permettrait donc de ne pas avoir de compétition entre le malate matriciel et le malate cytosolique. L'une des voies possibles pour éviter de compléter le cycle de Krebs est l' α -cétoglutarate. Ce métabolite peut être produit à partir de la GDH mais également à partir de l'isocitrate déshydrogénase (IDH), une enzyme en aval de la citrate déshydrogénase et de la GDH (*Figure 41*). Cette α -cétoglutarate ainsi produit, par l'ajout de pyruvate ou glutamate, peut être utilisé par la MAS pour être transporté hors de la matrice et continuer le cycle de réoxydation du malate extra-mitochondrial par la MAS (*Figure 41*).

Ces expériences, bien que préliminaires, laissent entrevoir la possibilité de l'étude du réseau métabolique mitochondrial, et l'étude spécifique des mitochondries de différents tissus. L'utilisation de mitochondries intactes pourraient permettre de déterminer les flux de métabolites qui peuvent être importés ou exportés des mitochondries, ceci permettant une cartographie plus précise du réseau métabolique, des régulations et des interconnexions entre les voies métaboliques.

Dans ce travail, j'ai décidé d'étudier le métabolisme dans des conditions de respirations découplées, dans lesquelles l'activité de la chaîne respiratoire est indépendante de la force proton motrice, les complexes pouvant donc fonctionner à leur maximum. Ces conditions permettent d'imposer le moins de contrainte au système pour voir si un phénomène de compétition est mis en place même dans des conditions optimales de respiration. Ce choix provient également de raisons expérimentales. Dans ces conditions

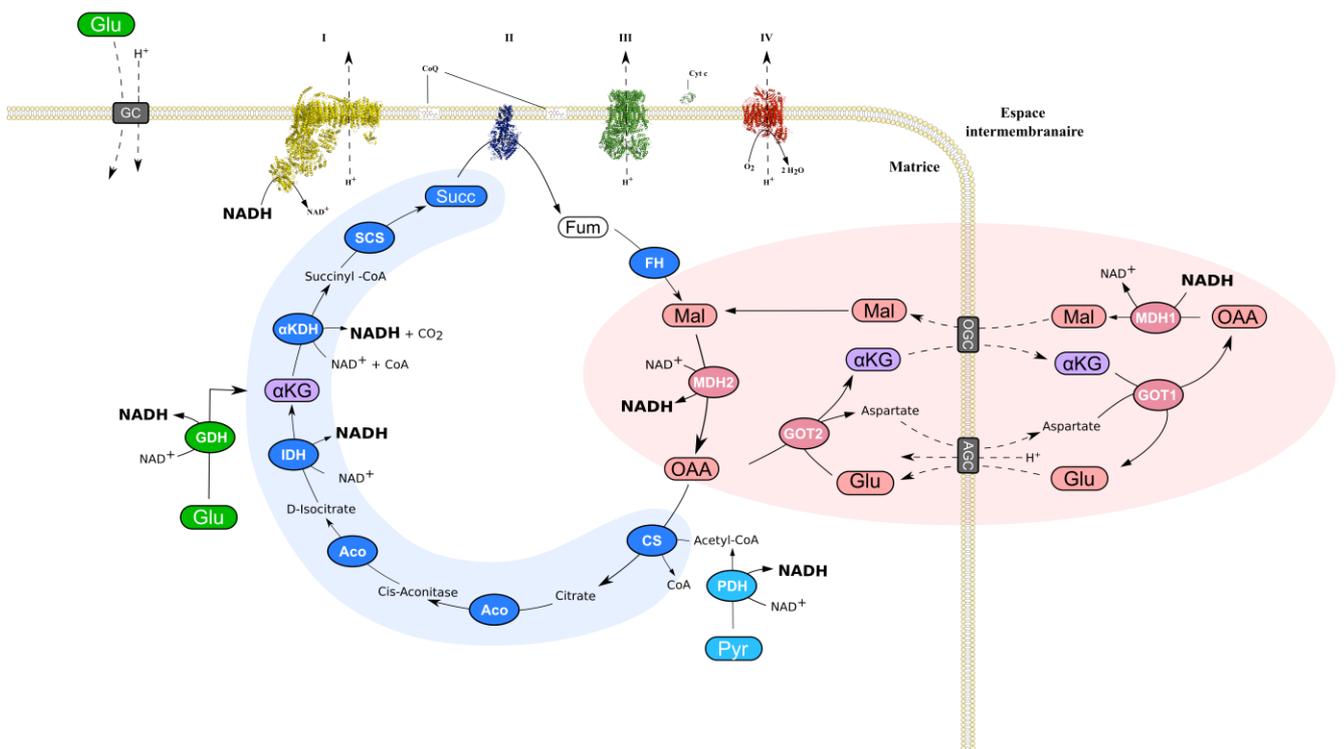


Figure 41. Illustration représentant l'interconnexion entre la chaîne respiratoire le cycle de Krebs et la navette malate aspartate.

Schéma de la chaîne respiratoire, du cycle de Krebs (nuage bleu), de la navette Malate-Aspartate (nuage rouge) mettant en évidence l'interconnexion entre ces voies et les carrefours métaboliques que représentent l'oxaloacetate et l' α -cétoglutarate. Abréviations : Métabolites : succinate (Succ), fumarate (Fum), malate (Mal), oxaloacetate (OAA), glutamate (Glu), α -cétoglutarate (α KG), pyruvate (Pyr). Transporteurs : aspartate-glutamate carrier (AGC), 2-oxoglutarate carrier (OGC), glutamate carrier (GC). Enzymes : fumarate hydratase (FH), malate déshydrogénase (MDH1, MDH2), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1, GOT2), citrate synthase (CS), pyruvate déshydrogénase (PDH), aconitase (Aco), isocitrate déshydrogénase (IDH), α -cétoglutarate déshydrogénase (α KGDH), glutamate déshydrogénase (GDH), succinyl-CoA synthétase (SCS).

plus simples, l'ajout des inhibiteurs n'induit pas de différence dans la répartition du flux dépendant du complexe I et du complexe II dans les conditions de succinate, pyruvate, glutamate, malate et rend par conséquent valide l'étude des compétitions par notre stratégie d'inhibition. Cet état énergétique m'a permis de développer des outils et des modèles nécessaires pour la compréhension du métabolisme mitochondrial hépatique et cardiaque, et les régulations mises en œuvre pour comprendre la compétition à l'entrée des électrons au sein de la chaîne respiratoire.

En conclusion, mon travail a permis d'observer pour la première fois qu'il existait un phénomène de compétition à l'entrée des électrons chez le mammifère. De manière

étonnante, j'ai pu constater que la réoxydation du succinate était naturellement favorisée par rapport à celle du NADH et ce indépendamment de la stœchiométrie des complexes et de l'organisation supramoléculaire du complexe I. Une fois de plus le rôle fonctionnel des supercomplexes dans la canalisation des électrons n'est pas avéré. J'ai pu déterminer que le métabolisme met en place un mécanisme de régulation, autour de la MAS, qui permet d'activement rediriger cette préférence vers la réoxydation du NADH cytosolique. Néanmoins, l'implication du potentiel de membrane ainsi que l'ATP produit par l'ATPsynthase, qui sont des acteurs majeurs du métabolisme mitochondrial, ne rentrent pas en compte dans mon modèle de redirection du flux métabolique, et restent donc une zone d'ombre dans notre étude.



MDH2 produced OAA is a metabolic switch rewiring the fuelling of respiratory chain and TCA cycle

Thibaut Molinié^a, Elodie Cougouilles^a, Claudine David^a, Edern Cahoreau^{b,c},
Jean-Charles Portais^{b,c,d}, Arnaud Mourier^{a,*}

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

^b TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

^c MetaToul-MetaboHUB, National infrastructure of metabolomics and fluxomics, Toulouse, France

^d RESTORE, INSERM U1031, CNRS 5070, UPS, EFS, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitochondria
Bioenergetics
MDH2
Oxaloacetate
Malate aspartate shuttle
NADH redox homeostasis
Respiratory chain supercomplexes
Respirasomes

ABSTRACT

The mitochondrial respiratory chain (RC) enables many metabolic processes by regenerating both mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and ATP. The oxidation by the RC of the NADH metabolically produced in the cytosol involves redox shuttles as the malate-aspartate shuttle (MAS) and is of paramount importance for cell fate. However, the specific metabolic regulations allowing mitochondrial respiration to prioritize NADH oxidation in response to high NADH/NAD⁺ redox stress have not been elucidated. The recent discovery that complex I (NADH dehydrogenase), and not complex II (Succinate dehydrogenase), can assemble with other respiratory chain complexes to form functional entities called respirasomes, led to the assumption that this supramolecular organization would favour NADH oxidation. Unexpectedly, characterization of heart and liver mitochondria demonstrates that the RC systematically favours electrons provided by the 'respirasome free' complex II. Our results demonstrate that the preferential succinate driven respiration is tightly controlled by OAA levels, and that OAA feedback inhibition of complex II rewires RC fuelling increasing NADH oxidation capacity. This new regulatory mechanism synergistically increases RC's NADH oxidative capacity and rewires MDH2 driven anaplerosis of the TCA, preventing malate production from succinate to favour oxidation of cytosolic malate. This regulatory mechanism synergistically adjusts RC and TCA fuelling in response to extramitochondrial malate produced by the MAS.

1. Introduction

Mitochondria are organelles present in almost all eukaryotic cells and are essential for the maintenance of cellular metabolism. The oxidative phosphorylation system (OXPHOS) located in the inner mitochondrial membrane (IMM), couples respiration to ATP synthesis [1]. Beyond ATP synthesis, mitochondrial maintenance of NADH/NAD⁺ redox cofactor balance is of paramount importance for numerous mitochondrial and cytosolic metabolic pathways [2–4]. Redox shuttles, such as the Malate Aspartate Shuttle (MAS), or the α -glycerophosphate shuttle allow mitochondrial respiratory chain (RC) to indirectly oxidize the cytosolic NADH produced by glycolysis and other metabolic pathways [5–7]. The MAS has been demonstrated to be the predominant NADH redox shuttle in highly oxidative tissues as brain, heart and liver

[8,9]. This key redox shuttle involves mitochondrial carriers as well as cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenases (MDH1, MDH2) and glutamate aspartate transaminases (GOT1, GOT2) [3]. Inter-compartment metabolite cycling through the MAS allows MDH1 and MDH2 to work in opposite directions (oxidizing cytosolic NADH and reducing mitochondrial NAD⁺) enabling complex I to indirectly oxidize cytosolic NADH. Beyond NADH redox maintenance through Complex I, the RC is also key to sustain the tri-carboxylic acid cycle (TCA cycle) via complex II. This enzyme has recently emerged as focal point of investigation in neurodegeneration [10,11], cardiovascular disorders [12–14], immunology [15], cancer biology [16–18] and signalling [19–21].

The fact that both complex I and II rely on coenzyme Q (CoQ) as common substrate, prompted scientists to investigate molecular

* Corresponding author at: Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaires, CNRS-UMR5095, 1, rue Camille Saint-Saëns, CS 61390, 33077 Bordeaux cedex, France.

E-mail address: arnaud.mourier@ibgc.cnrs.fr (A. Mourier).

<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2022.148532>

Received 14 October 2021; Received in revised form 6 January 2022; Accepted 12 January 2022

Available online 19 January 2022

0005-2728/© 2022 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

processes allowing the RC to orchestrate the activity of these two CoQ-oxidoreductases. A recent burst of interest in understanding regulation and activity of CoQ oxidoreductases was triggered by evidence that in contrast to Complex II, the vast majority of Complex I physically interact with other RC complexes III and IV [22]. One of the most important argument for a higher order organization of the RC was provided by the use of blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), which showed that respiratory chain complexes from a wide range of organisms can be extracted in supramolecular assemblies when mitochondria are solubilized using mild detergents [22]. In mammalian mitochondria, supercomplexes (SCs) consisting of complexes I, III, and IV are functional entities consuming oxygen in presence of NADH and are therefore named respirasome [22–24]. Recent studies using a multitude of independent approaches [25–29], have convincingly proven the existence of respirasomes in various organisms. Respirasomes have been reported to play a critical role in bioenergetics and proposed to sequester dedicated pools of CoQ and Cyt *c* in order to function as independent bioenergetic units. It has also been proposed that respirasome could reduce the diffusion distance of CoQ and Cyt *c*, thereby increasing the electron transfer efficiency between complexes organized in respirasomes [30–32]. However, analyses of supercomplex structures, as well as of kinetic and spectroscopic data, do not support substrate channeling by sequestration of CoQ and Cyt *c* [33–35]. Therefore, the bioenergetic roles of respirasomes on mitochondrial NADH oxidation efficiency and on prioritizing electron delivered by complex I against the respirasome-free complex II remain in question.

A growing body of evidence suggests that intramitochondrial oxaloacetate (OAA), identified decades ago as a potent complex II inhibitor [36–39], could play a key role in orchestrating the fuelling of the RC from complex I or II. However, whether or not OAA inhibition of complex II is a metabolically and physiologically relevant process remains controversial. The lack of progress on this essential question most probably lies in the numerous technical constraints, precluding the proper characterization of the OAA metabolic and compartmentation complexity, as well as its chemical instability preventing its quantification by mass spectrometry. Interestingly, recent reports from the Sivitz laboratory characterized mitochondria isolated from different mouse tissues and demonstrated that OAA inhibition of complex II was strongly controlled by mitochondrial membrane potential [40,41].

In this study, we carefully characterize the bioenergetic properties of murine heart and liver mitochondria, as their metabolism strongly depend on MAS [9,42], but also differ in their respective capacity to oxidize NADH versus succinate [43]. Using metabolically active mitochondria, we developed independent biochemical approaches to decipher the respective role of RC supramolecular organization as well as OAA driven complex II inhibition in orchestrating the electron fuelling of the RC from complex I and II. Our results demonstrate that despite the kinetic advantage potentially conferred to NADH oxidation by the assembly of complex I into respirasomes, liver and heart RC prioritize electron provided by complex II. Interestingly, our analyses enlighten the crucial role played by MDH2 in orchestrating electron fuelling of the RC. On one hand, MDH2 mediated OAA production is indispensable to allow mitochondria to metabolize pyruvate and glutamate and to feed complex I with NADH, whereas on the other hand, OAA produced by MDH2 inhibits complex II. Remarkably, the MDH2 rewiring of the RC electrons flow from succinate toward NADH oxidation is triggered by extramitochondrial L-malate at physiological concentration. Consequently, oxidation of imported L-malate by MDH2 does not only rewire the fuelling of the RC from Complex II toward complex I, but concomitantly rewires anaplerosis of TCA cycle, downregulating malate produced by the fumarase to favour oxidation of imported malate. Consequently, MAS does not just passively balance NADH/NAD⁺ redox between cytosol and mitochondria. Instead, extramitochondrial L-Malate produced by the MAS in response to NADH redox stress can, once imported inside mitochondria, rewires RC electron flow and TCA cycle anaplerosis to increase mitochondrial NADH oxidation and MAS

activity.

2. Results

2.1. Heart and liver mitochondria strongly differ in their NADH and succinate oxidative capacities

To elucidate how mitochondrial RC orchestrates NADH and succinate oxidation we characterized heart and liver mitochondria presenting high TCA and MAS metabolic activities. Bioenergetic characterization of isolated mitochondria was first performed by measuring the oxygen consumption under phosphorylating, non-phosphorylating and uncoupled conditions using high-resolution O₂K oxygraphs. To determine the capacity of heart and liver mitochondria to oxidize NADH or succinate, metabolically active mitochondria were incubated in the presence of various nutrient combinations whose metabolism results in delivery of electrons at the level of complex I or complex II. In both heart and liver, we found that simultaneous addition of pyruvate, glutamate and malate was the best combination of nutrient to feed complex I with electrons (Fig. S1A–B). Then, we confirmed that adding complex I inhibitor (rotenone) in presence of succinate was essential to assess maximal complex II driven respiration (Fig. S1C–D). In line with previous observations [43], respirations assessed under phosphorylating or uncoupled conditions were five to three times higher in heart than in liver mitochondria (Fig. 1A–B). Furthermore, our analyses showed that, compared to the succinate driven respiration, heart mitochondria present higher complex I driven respiration (Fig. 1A) than liver mitochondria (Fig. 1B). This observation prompted us to decipher if the difference in complex I and II driven respirations, was caused by mitochondrial metabolic constraint affecting NADH or succinate provision of the RC or to intrinsic RC functional discrepancies. To bypass potential thermodynamic and kinetic controls linked to metabolite transport or internal metabolism, we permeabilized mitochondria to specifically measure RC activity fed directly with NADH or succinate. To evaluate how mitochondrial permeabilization impacts RC activity, we have compared different permeabilization methods (freeze/thaw cycles, Alamethycin or digitonin) and we observed no gross difference between complex I and II driven respirations measured. Interestingly, when RC is directly fuelled with reduced substrates, heart RC can oxidize NADH two time faster than succinate (Fig. 1C) whereas an opposite situation is observed in liver RC (Fig. 1D). The high disparity in NADH and succinate oxidation rates observed between heart and liver RC prompted us to further characterize tissue specific RC composition changes. To this end, we quantified RC complex levels assessing cytochromes (Fig. 1E) and multiple OXPHOS protein levels (Fig. 1F–H). These two independent approaches consistently showed that all cytochromes as well as RC complex subunits were two to four times more abundant in heart than in liver mitochondria (Fig. 1E–G). Moreover, the relative abundance of complex I normalized to complex II was almost tripled in heart compared to liver (Fig. 1H). Altogether, the data presented in Fig. 1 show that RC complexes content and stoichiometry strongly differ between heart and liver (Fig. 1E–H) and that these differences correlate with tissue specific functional differentiation (Fig. 1A–D). Interestingly, when both complex I and complex II substrates are added to mitochondria, the increase in RC activity is too low to sustain both NADH and succinate oxidation flow at maximal speed (Fig. 1A–D). This observation prompted us to develop assays allowing to determine the respective contribution of complex I and complex II in feeding RC with electrons, when both NADH and succinate are present.

2.2. Heart and liver respiratory chain preferentially oxidize succinate over NADH

The respective contribution of NADH and succinate oxidation in fuelling RC with electrons when mitochondria are in presence of both substrates, was first evaluated using permeabilized mitochondria. This

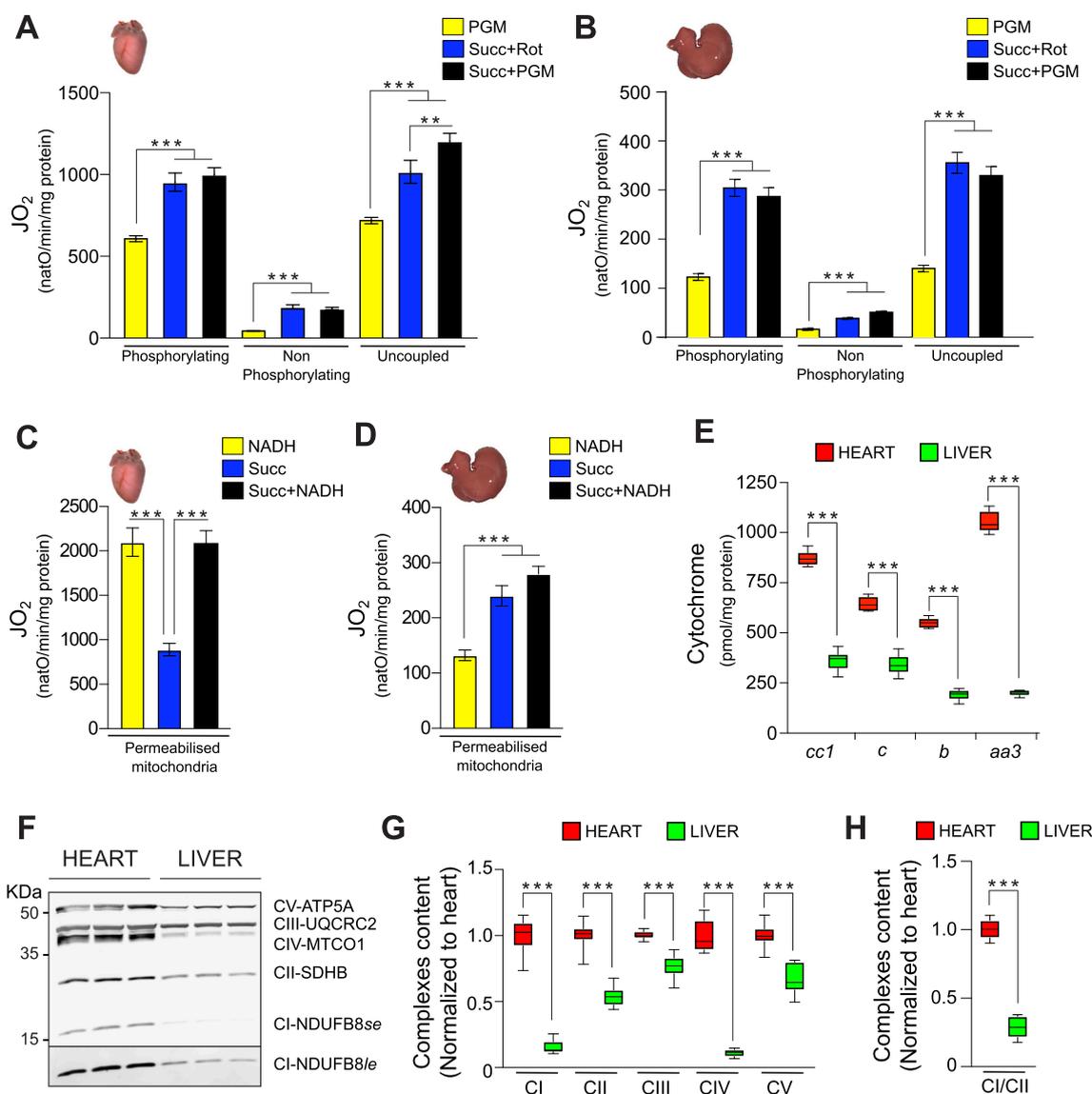


Fig. 1. Heart and liver respiratory chain composition and bioenergetics.

(A, B) Oxygen consumption of intact heart (A) and liver (B) mitochondria assessed in presence of mitochondrial complex I substrates (PGM: pyruvate 10 mM, glutamate 5 mM, malate 5 mM), or complex II substrate (Succ+Rot: Succinate 10 mM and rotenone 30 nM), and PGM and succinate (Succ+PGM). Respiration are assessed under phosphorylating conditions (ADP + Pi), non-phosphorylating conditions (oligomycin), and uncoupled (CCCP titration). Heart ($n = 15$), liver ($n = 5$), error bars represent the mean \pm SEM.

(C, D) Oxygen consumption of permeabilized heart (C) and liver (D) mitochondria assessed in presence of NADH (1.2 mM), Succinate (10 mM) and cytochrome *c* (62.5 μ g/ml). Heart ($n = 10$), liver ($n = 12$), Error bars represent the mean \pm SEM

(E) Mitochondrial cytochrome quantified from redox absorbance spectra. Cytochromes content of RC complexes: complex III (*b*, *c1*), complex IV (*aa3*) and cytochrome *c* (*c*) were determined in mitochondrial extracts of heart and liver. Heart ($n = 6$) liver ($n = 6$), error bars represent the mean \pm SEM.

(F) Steady-state levels of OXPHOS subunits, in heart and liver mitochondria, determined by western blot analyses. Short and long exposure are performed to detect complex I (complex I *se* and complex I *le*) in the liver. Representative Western-blot of five different experiments.

(G) Relative amount of OXPHOS complexes (complex I – complex V) in heart and liver mitochondria determined by densitometric quantification of western blot experiments presented in (F), and normalized to heart OXPHOS complexes. ($n = 5$) Error bars represent the mean \pm SEM

(H) Relative amount of complex I normalized to complex II in heart and liver mitochondria determined by densitometric analyses, ($n = 5$) Error bars represent the mean \pm SEM.

system is particularly well suited to determine the sources of electrons feeding the respiratory chain as it allows (i) to provide non-limited amount of NADH and succinate and follow their oxidation rate, (ii) to remove thermodynamic constraints linked to the protonmotive force on complex I and on the RC activity, (iii) to bypass kinetic controls due to metabolites import and internal metabolism and prevent also metabolic reduction of NAD⁺ generated by complex I. First, the respective contribution of NADH and succinate in fuelling the RC was assessed using validated and highly specific complex I or II inhibitors i.e.

rotenone (Rot) and Atpenin A5 (AtpnA5) (Fig. S2A-D). As presented in Fig. 1 C and D, mitochondrial respiration of permeabilized mitochondria assessed in presence of both NADH and succinate is not sufficient to sustain both NADH and succinate oxidation flux at their maximal capacity (respiration assessed with NADH or succinate added alone). Surprisingly our analyses demonstrate that limiting RC capacity is not evenly affecting NADH and succinate oxidation fluxes when heart and liver RC are simultaneously fed with both NADH and succinate (Fig. 2A-D). Instead, our results show that when permeabilized heart and liver

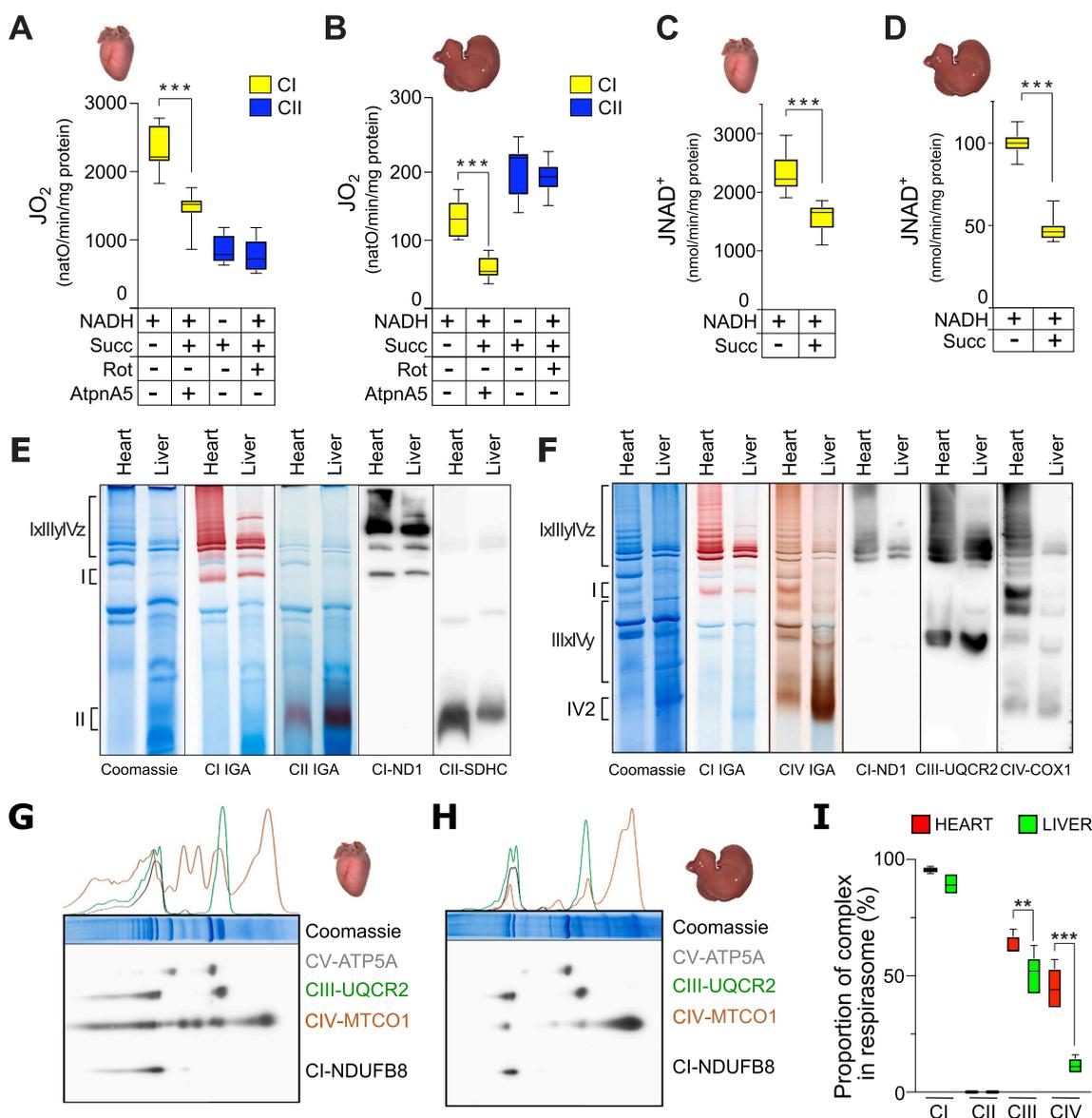


Fig. 2. Heart and liver respiratory chain supramolecular organization and preferential electron fuelling.

(A, B) Oxygen consumption of permeabilised mitochondria isolated from heart (A) and liver (B) assessed in presence of cytochrome *c* (62.5 $\mu\text{g/ml}$), complex I substrate NADH (1.2 mM), complex II substrate succinate (Succ, 10 mM) or both substrates simultaneously added. Addition of complex I (rotenone, 30 nM) or complex II (atpenina5, 20 nM) specific inhibitor is used to discriminate complex I driven respiration (yellow) and complex II driven respiration (blue) when mitochondria are incubated with NADH and succinate. Heart ($n = 9$), Liver ($n = 12$), error bars represent the mean \pm SEM

(C, D) complex I driven NAD⁺ synthesis flux assessed in permeabilised mitochondria isolated from heart (C) and liver (D), incubated in presence of cytochrome *c* (62.5 $\mu\text{g/ml}$), complex I substrate NADH (1.2 mM) and/or complex II substrate succinate (Succ, 10 mM). Heart ($n = 6$), liver ($n = 9$), error bars represent the mean \pm SEM.

(E, F) Supramolecular organization of heart and liver RC. Heart and liver mitochondria are solubilized with a digitonin/protein ratio of 3:1 (g/g) and RC are resolved with 4–16% (E) or 3–12% (F) BN-PAGE, followed by complex I-, complex II- and complex IV-IGA assays, or by western blot using antibody toward ND1, SDHC, UQCRC2 or COX1 subunits. Representative of three different experiments. Heart ($n = 3$), liver ($n = 3$).

(G, H) RC complexes composition of heart (G) and liver (H). Supramolecular organization of RC is assessed by 2D-BN/SDS-PAGE and immunoblot analyses are performed with OXPHOS cocktail antibodies toward NDUFB8, MTCO1, UQCRC2 and ATP5A subunits. Densitometric profile of complex I (black), complex III (green) and complex IV (orange) detected by immunoblot are represented on top of Coomassie staining. Representative of three different experiments. Heart ($n = 3$), liver ($n = 3$).

(I) Relative amount of complex I, complex II, complex III and complex IV associated in respirasome (complex I-III-IV) or in supercomplexes containing complex I (complex I_x-III_y or complex I_x-IV_y) in heart (red bars) and liver (green bars). Proportion of complexes found associated in respirasome is determined by densitometric quantification of 2D-BN/SDS-PAGE. Heart ($n = 3$), Liver ($n = 3$), Error bars represent the mean \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mitochondria are incubated with both NADH and succinate, complex II driven respiration was not significantly affected compared to the maximal succinate driven respiration assessed when succinate is the unique electron source fuelling the RC (Fig. 2A-B). In contrast, the

NADH driven respiration was strongly decreased in presence of succinate compared to the maximal NADH driven respiration determined when NADH is the unique electron source fuelling the RC (Fig. 2A-B). This significant decrease of the complex I driven respiration in presence

of succinate, was confirmed by enzymatic measurement of the NAD⁺ production rate (Fig. 2C-D). Interestingly, despite the great disparity in their respective complex I and II contents and oxidative capacities (Fig. 1C-D), the priority given to complex II electrons in presence of both NADH and succinate, was consistently observed in both heart and liver mitochondria (Fig. 2A-D).

The finding that liver and heart RC preferentially oxidize succinate over NADH was in stark contrast to recent hypothesis supporting the fact that the structural association of complex I with complex III and IV should confer kinetics advantage to NADH oxidation over electrons provided by the respirasome free complex II [32,44]. This surprising result prompted us to investigate the supramolecular organization of heart and liver RC. To this end, mitochondria were solubilized using digitonin (at a ratio of 3 g digitonin per g protein) and the supramolecular organization of the RC was then resolved using standard BN-PAGE technique and analyzed by western blotting or in-gel activity assay (IGA) (Figs. 2E-F and S2E-G). First, BN-PAGE profiles presented in

the Fig. 2E and F clearly confirmed the striking enrichment of heart RC in complex I and IV compared to liver RC, supporting our previous observations (Fig. 1E-G). Interestingly, these changes in RC complexes stoichiometry between the two tissues remarkably correlate with the abundance and diversity of respirasomes (I_xIIIyIV_z) (Fig. 2E-F). To determine the proportion of complex I and II assembled in super-complexes, BN-PAGE first dimension was further resolved in a second denaturing dimension. 2D-SDS-PAGE is commonly used to properly quantify the protein levels as they prevent potential epitope accessibility issues encountered with native proteins. Remarkably, 2D electrophoresis analyses were in agreement with previous studies [45,46] showing that more than 90% of heart and liver complex I are found associated in respirasomes whereas no detectable complex II could be found associated in super-complexes (Figs. 2E-I and S2E-G). Furthermore, the supramolecular organization of complex I and II with other RC is not plastic as no significant respirasome reshuffling could be observed when BN-PAGE experiments were performed solubilizing mitochondria

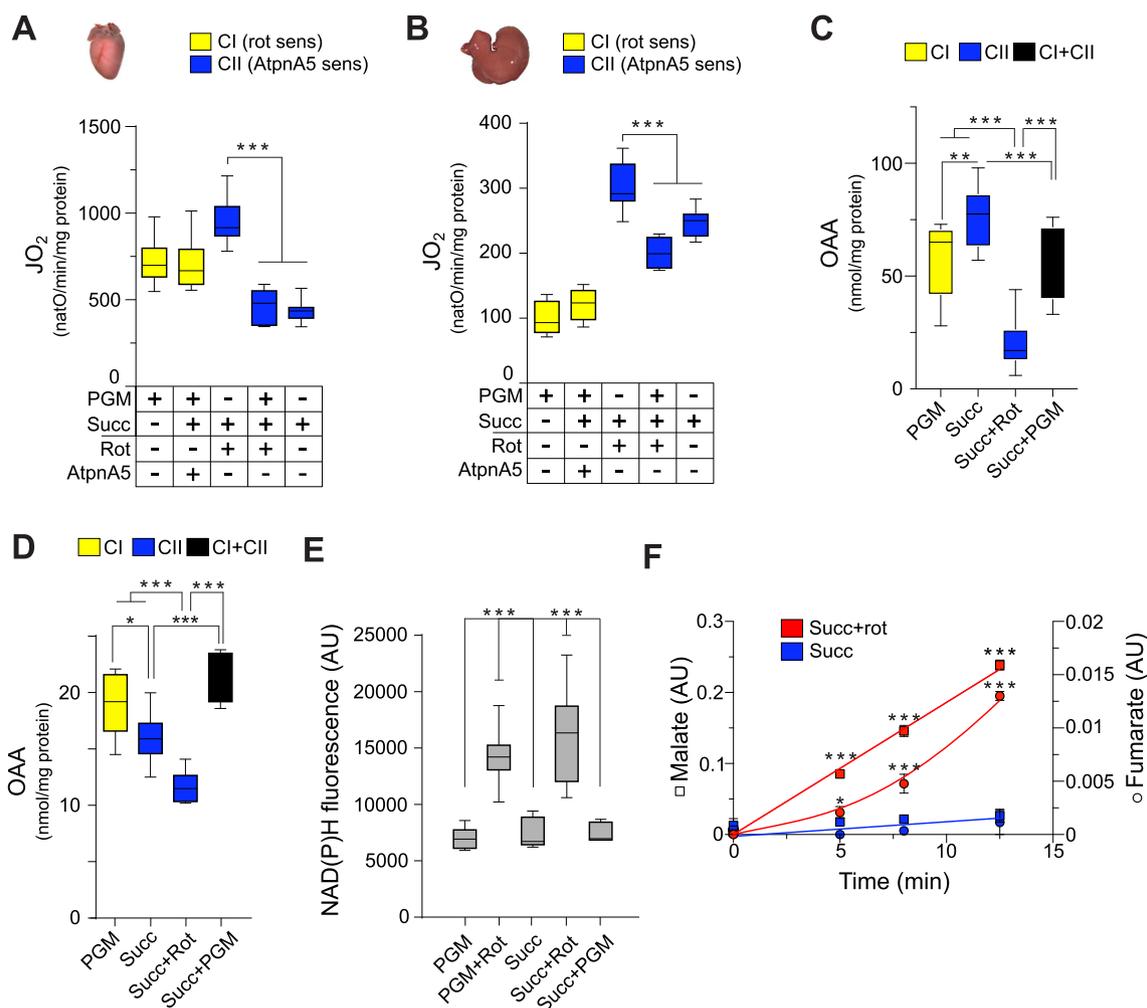


Fig. 3. Internal OAA level orchestrates the respective contribution of complex I and II to feed the respiratory chain with electrons

(A, B) Oxygen consumption of uncoupled heart (A) and liver (B) intact mitochondria assessed in presence of complex I substrates (PGM) and/or complex II substrate (Succ). Addition of complex I (rotenone, 30 nM) or complex II (atpeninA5, 20 nM) specific inhibitor is used to discriminate complex I dependent respiration (yellow bars) and complex II dependent respiration (blue bars) when mitochondria are incubated with PGM and Succ. Heart ($n = 17$), liver ($n = 6$), error bars represent the mean \pm SEM.

(C, D) Oxaloacetate levels assessed when uncoupled heart (C) and liver (D) intact mitochondria are fed with complex I substrates (PGM) and/or complex II substrate (Succ). Heart ($n = 4$), Liver ($n = 3$), Error bars represent the mean \pm SEM.

(E) Mitochondrial NAD(P)H fluorescence of uncoupled heart mitochondria incubated with complex I substrates (PGM) \pm rotenone (30 nM), or complex II substrate (Succ) \pm rotenone (30 nM), or both (Succ+PGM). ($n = 5$), error bars represent the mean \pm SEM.

(F) ¹H—¹D NMR quantification of fumarate (circle) and malate (square) content are assessed in uncoupled heart mitochondria oxidizing succinate in absence (blue) or in presence of rotenone (30 nM) (red). ($n = 3$), error bars represent the mean \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

actively metabolizing different respiratory substrates (Fig. S2H-I). Altogether, our results indicate that despite the absence of stable physical interaction between complex II and other RC complexes, succinate oxidation is prioritized over electrons delivered by complex I. However, to challenge the physiological relevance of the preferential succinate oxidation observed with permeabilized mitochondria, we sought to investigate NADH and succinate fuelling of the RC in metabolically active mitochondria.

2.3. Internal oxaloacetate level orchestrates the respective contribution of complex I and II to respiration

To evaluate potential metabolic outcomes of the preferential succinate oxidation on TCA and MAS cycle activities, we applied our new experimental strategy deciphering the origin of electrons fuelling the RC on intact and metabolically active mitochondria. In intact mitochondria, succinate is transported through dicarboxylate carrier before being directly oxidized by complex II. In contrast, NADH cannot be directly imported and will have to be metabolically generated from matrix dehydrogenases like malate, glutamate or pyruvate dehydrogenases. Use of specific inhibitor demonstrated that mitochondrial respiration assessed in presence of pyruvate, glutamate, and malate (PGM) totally relied on complex I activity as this respiration was abolished by rotenone (Fig. S2A and C). Similarly, succinate driven respiration was inhibited in presence of AtpeninA5 (Fig. S2B and D). Interestingly, uncoupled respiration assessed in presence of succinate and rotenone (Fig. 3A-B) was almost identical to succinate driven respiration measured on permeabilized mitochondria (Fig. 2A-B). However, when succinate driven uncoupled respiration was assessed in absence of rotenone, respiration values were decreased by 40% in heart and 30% in liver mitochondria (Figs. 3A-B and S1C-D). The necessity to add rotenone to assess maximal succinate driven respiration on metabolically active mitochondria has been explained as complex I inhibition could prevent accumulation of oxaloacetate (OAA) a potent competitive inhibitor of complex II [37,40,47]. To characterize the specificity and the metabolic relevance of OAA inhibition, permeabilized mitochondria incubated with succinate or NADH were recorded in presence of increasing concentration of OAA (Fig. S3A). These analyses clearly demonstrated that OAA is a powerful and highly specific complex II inhibitor, as no inhibitory side effects could be observed on NADH driven respiration. To elucidate the potential regulatory function of OAA on succinate respiration in intact mitochondria, we developed an enzymatic assay to quantify OAA levels (Fig. 3C-D). Our analyses performed on both heart and liver mitochondria confirmed that the stimulation of succinate respiration by rotenone (Fig. 3A and B) was associated with a striking lowering of OAA level (Fig. 3C-D). As expected, extemporaneous fluorometric measurement of mitochondrial internal NAD(P)H level demonstrated that inhibition of complex I by rotenone massively increased mitochondrial redox (NAD(P)H) state (Figs. 3E and S3B). Interestingly, NMR spectroscopy analyses showed that treatment of succinate-metabolizing mitochondria with rotenone, provoked an excretion of malate and fumarate (Fig. 3F). Altogether, our analyses support that the increase in NADH/NAD⁺ ratio secondary to complex I inhibition by rotenone could prevent MDH2 driven OAA accumulation (Fig. 3C-D) which consequently increases succinate respiration (Fig. 3A-B).

To determine the respective contribution of complex I and II in fuelling RC with electrons on intact mitochondria, we applied the inhibitor-driven approach. This approach was validated on intact mitochondria as rotenone and atpeninA5 sensitive respirations, assessed under uncoupled conditions, were additive and independent of the sequence of addition of inhibitors (Fig. S3C-D). Intriguingly, in contrast to the results obtained on permeabilized mitochondria (Fig. 2A-B), complex I dependent respiration was preserved in presence of multiple substrates, whereas complex II respiration was similar or even lower than the 'OAA inhibited' succinate respiration measured in absence of rotenone (Fig. 3A-B). Interestingly, the OAA levels perfectly matched the

degree of inhibition of the succinate respiration when all substrates were provided to heart (Fig. 3C) and liver (Fig. 3D) mitochondria. Altogether, our data identified OAA as a key metabolic regulator orchestrating the respective contribution of complex I and II to RC electron flow. The OAA regulation occurring in intact mitochondria could totally counteract the natural RC priority given to complex II, to favour NADH oxidation.

2.4. MDH2 is a metabolic switch rewiring respiratory chain and TCA fuelling

The importance of MDH2-generated OAA in orchestrating mitochondrial NADH or succinate oxidation, prompted us to investigate the metabolic relevance of this new regulatory mechanism. MDH2 is a mitochondrial metabolic checkpoint located at the crossroad of TCA cycle and MAS (Fig. 4A). To decipher the functional interplay between MAS, RC and TCA cycle, we assessed complex II driven respiration mimicking a cytosolic NADH redox stress by increasing the extramitochondrial malate level within physiologically relevant concentration range (Fig. 4A) [7,48,49].

This experiment demonstrated that complex II driven respiration decreased proportionally in response to increased malate concentration (Figs. 4B-D and S4A-C). As control, we showed that malate per se did not impact succinate respiration in permeabilized mitochondria (Fig. S4D). This observation further explained why malate inhibition only occurred in metabolically active mitochondria where OAA can be generated and accumulated. In line with this observation, the decrease in complex II driven respiration associated with increase malate concentration was perfectly correlated with an increase in mitochondrial OAA level (Figs. 4D and S4C). Altogether, our data show that more than 60% of complex II driven respiration can be downregulated in response to increased extramitochondrial malate concentration through a MDH2-mediated metabolic regulation in both heart and liver.

To confirm that OAA could act as mitochondrial metabolic sensor adjusting RC fuelling to mitochondrial metabolic activity, we investigated how mitochondrial metabolic pathways consuming OAA could impact succinate and NADH dependent respirations. To this end, mitochondrial RC activity was assessed in presence of succinate (Succ) and glutamate (Glu) or/and pyruvate (Pyr) to metabolically flush OAA through MAS (GOT2 dependent pathway) or through the TCA cycle (pyruvate dehydrogenase and citrate synthase dependent pathway) (Fig. 4A). Our analyses demonstrated that both pyruvate and glutamate were efficient in consuming internal OAA as both substrates added alone or in combination decreased OAA to similar residual level as the one measured in presence of succinate and rotenone (Figs. 4E and S4E). The metabolic flush of OAA did not only increase succinate driven respiration by releasing complex II inhibition, but it also fuelled complex I with NADH (Figs. 4F and S4F). Eventually, we decided to determine if MDH2 could metabolically rewire RC electrons entry from succinate toward NADH, when MAS driven external NADH oxidation demand is increased (increasing malate concentration within physiological range). Our results clearly showed that Malate-OAA dependent respiration rewiring from complex II to complex I occurs, even when OAA produced by the MDH2 is metabolically flushed through MAS and TCA cycle (Fig. 4G). Remarkably, imported malate oxidized through MDH2 not only downregulates succinate driven respiration, but it also increases MDH2 driven NADH production and complex I driven NADH oxidation capacity.

3. Discussion

Our present work indicates that the differences between heart and liver mitochondrial bioenergetics activities mainly correlate with change in abundance and stoichiometry of OXPHOS complexes. For instance, differences in complex I and II levels (Fig. 1H) are in line with the different NADH and succinate driven respiration capacities of heart and liver mitochondria (Fig. 1A-D). In contrast, the proportion of complex I and II assembled into respirasome is not changed between heart

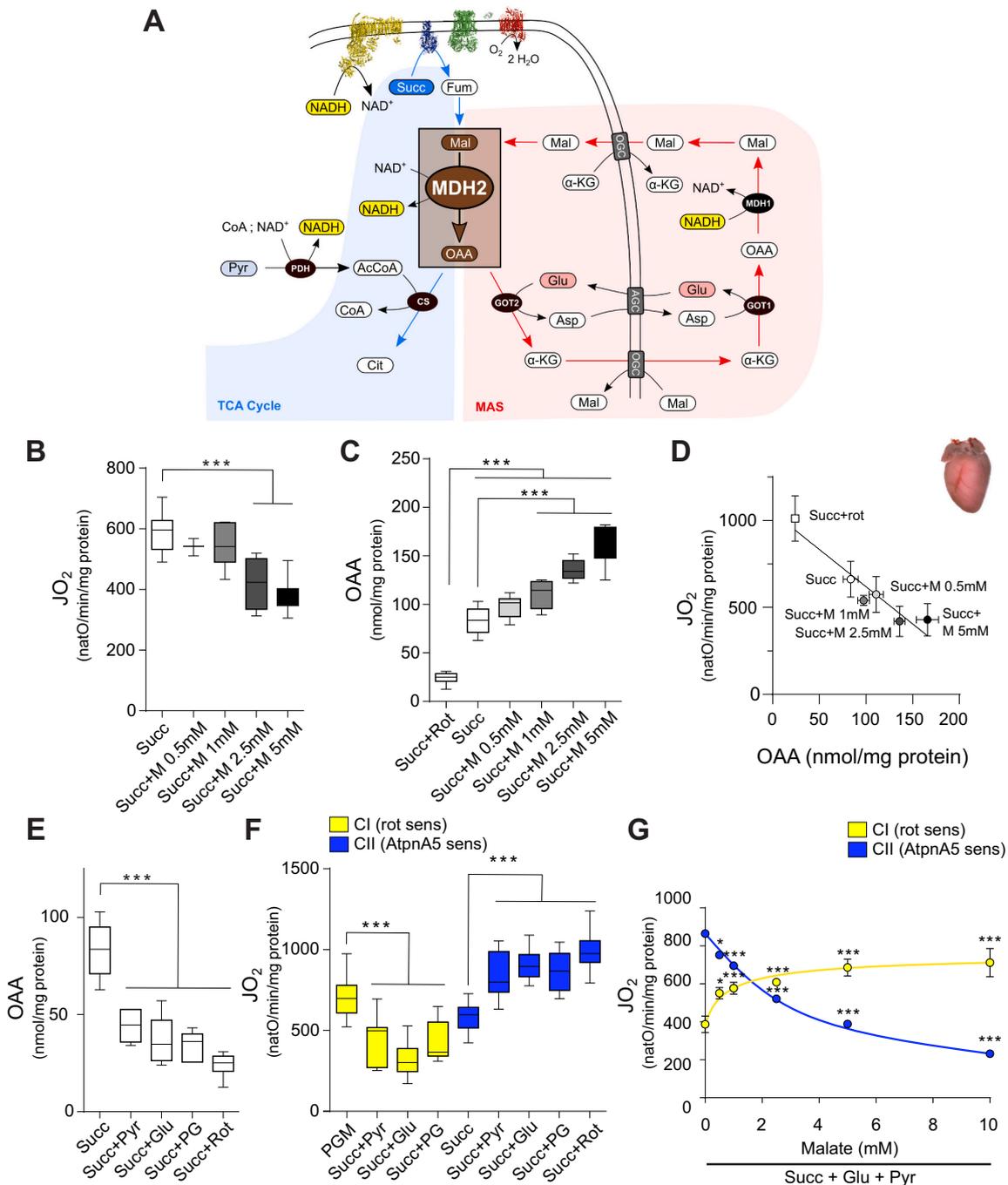


Fig. 4. MDH2 produced OAA rewires TCA cycle and respiratory chain electron flows to favour NADH oxidation
 Scheme of respiratory chain, TCA cycle (blue background), and malate-aspartate shuttle (MAS, red background) enlightening the key metabolic role played by MDH2. **Abbreviations:** succinate (Succ), fumarate (Fum), malate (Mal), oxaloacetate (OAA), glutamate (Glu), aspartate (Asp), α -ketoglutarate (α -KG), acetyl-CoA (AcCoA), citrate (Cit), pyruvate (Pyr), aspartate-glutamate carrier (AGC) 2-oxoglutarate carrier (OGC), malate dehydrogenase (MDH1, MDH2), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1, GOT2), citrate synthase (CS), pyruvate dehydrogenase (PDH)
 (B, C) Oxygen consumption (B) and oxaloacetate level (C) assessed with intact heart mitochondria fed with succinate and increased concentration of malate (M) during uncoupled respiration. ($n = 4$), error bars represent the mean \pm SEM.
 (D) Correlation between mitochondrial oxygen consumption and oxaloacetate levels of intact heart mitochondria isolated fed with succinate and increased concentration of malate (M). Error bars represent the mean \pm SEM.
 (E) Oxaloacetate levels assessed with intact heart mitochondria in presence of different substrates condition metabolizing endogenously produced OAA (Succ+Glu, Succ+Pyr, Succ+PG). ($n = 4$), error bars represent the mean \pm SEM.
 (F) Oxygen consumption of intact heart mitochondria fed with indicated substrates (Succ+Glu, Succ+Pyr, Succ+PG). Addition of specific inhibitor of complex I (rotenone, 30 nM) and complex II (AtpeninA5, 20 nM) during uncoupled respiration, determine the complex I driven respiration (yellow bars) or complex II driven respiration (blue bars). ($n = 8$), error bars represent the mean \pm SEM.
 (G) Correlation between oxygen consumption of intact heart mitochondria fed with succinate, pyruvate, glutamate and increasing concentration of malate. Complex I driven (yellow circle) or complex II driven (blue circle) respiration are determined through sequential addition of specific complex I (rotenone, 30 nM) and complex II (AtpeninA5, 20 nM) inhibitors. ($n = 4$), error bars represent the mean \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and liver RC (Figs. 2E-I and S2E-I). In line with previous works performed in different tissues or model organisms, the supramolecular organization of mouse heart and liver RC demonstrates that about 90% of complex I is associated in supercomplexes whereas complex II is never found associated with other RC complexes [45,46]. This striking difference in the supramolecular organization of the CoQ-oxidoreductases led to the assumption that the physical association of complex I with other RC complexes could reduce the diffusion distance of CoQ and Cyt c between organized complexes, promoting NADH oxidation [30–32]. To decipher the functional relevance of the supramolecular organization of the complex I and II on their ability to fuel the RC, we developed a new experimental strategy using permeabilized mitochondria to (i) provide non-limited amount of NADH and succinate and follow their oxidation rate, (ii) remove thermodynamic constraints linked to the protonmotive force on complex I and on the RC activity, (iii) prevent the interfering inhibition of complex II by OAA. Surprisingly, the inhibitor driven approach as well as multiple flux (J_{NAD⁺} and J_{O₂}) analyses consistently demonstrates that when permeabilized mitochondria are incubated with both NADH and succinate, the complex II driven respiration is preserved whereas complex I driven respiration is strongly decreased in heart and liver mitochondria (Fig. 2A-D). Interestingly, the fact that NADH driven respiration is drastically reduced in the presence of succinate clearly demonstrates that the respirasome is not functionally disconnected from the respirasome free complex II (Fig. 2C-D). Our observations indicate that respirasomes structuration does not lead to strict, physical and functional, partitioning between RC complexes and electrons carriers (CoQ and Cyt c) and thus support previous work [31,33,34]. The discovery of a mechanism enabling the RC to orchestrate the activities of coenzymes Q oxidoreductases constitutes a major conceptual breakthrough in the field of mitochondrial energy metabolism. This regulatory mechanism called ‘electron competition’ or ‘CoQ-contest’ originally discovered in *S. cerevisiae* allows the yeast RC to prioritize oxidation of cytosolic NADH [50–52]. The fact that, in contrast to succinate oxidation, the NADH driven respiration is found drastically affected when heart and liver RC are incubated with both NADH and succinate clearly demonstrate that the ‘CoQ contest’ mechanisms is not restricted to the yeast model but also orchestrates mammalian heart and liver RC electron flow (Fig. 2A-D). Moreover, in line with observations made with yeast, the priority given to certain CoQ-oxidoreductase is (i) independent of the RC supramolecular organization [53] and (ii) independent of the stoichiometry between CoQ-oxidoreductases involved (Figs. 1F-H and 2E-F).

The paramount importance of the maintenance of the NADH/NAD⁺ redox balance by the mitochondria for cell metabolism and cell functions was consistently observed in various eukaryotes models expressing different fermentative pathways and presenting different NADH CoQ-oxidoreductase systems fuelling the RC [54–57]. In humans complex I or redox shuttles loss of functions cause numerous pathologies and the resulting NADH redox imbalance often lead to life-threatening lactic acidosis crises [58–61]. Recent studies have shown that the control of the cellular redox balance by the mitochondria is essential for the maintenance of cellular proliferative capacities [62,63]. Until recently, mitochondria were described as being impermeable to NAD⁺/NADH [64]. However, this dogma has been recently challenged by the demonstration that NAD(H) could be imported in mammalian mitochondria [65] and by the identification of SL25A51 as a mammalian mitochondrial NAD(H) transporter [66] compensating the absence of intramitochondrial NAD(H) synthesis. However, the rate of NADH import through this transporter is extremely limited and therefore is not directly involved in connecting cytosolic and mitochondrial NADH/NAD⁺ redox homeostasis. Instead, connection between the cytosolic and mitochondrial redox homeostasis is ensured by redox shuttles such as the MAS [8,9].

The impressive enzymatic equipment metabolizing cytosolic and mitochondrial OAA demonstrates its metabolic importance and positioned this metabolite at the crossroad between glycolysis (Pyruvate

Carboxylase 1 and 2), gluconeogenesis (PEPCK1, PEPCK2), TCA cycle (MDH2, CS) and Malate aspartate Shuttle (MDH1, MDH2, GOT1, GOT2). Bioenergetic analyses of heart and liver mitochondria, early on characterized through their high MAS metabolic capacities [9,42], support recent work from the Sivitz group claiming that regulation of complex II activity by OAA is of great metabolic interest [40,41]. Our analyses extend and refine mitochondrial metabolic processes controlling internal OAA levels and therefore regulating the complex II activity. Importantly, our data demonstrate that MDH2 acts as a metabolic conductor synergistically orchestrating RC and TCA activity adjusting mitochondrial NADH oxidation to MAS activity. First, our work confirms that production of OAA by MDH2 relies on mitochondrial redox (NADH/NAD⁺) maintenance by complex I and can be abolished when complex I is inhibited by rotenone (Figs. 3C-F and S3B). Secondly, the complex II inhibition caused by MDH2 driven OAA production can be completely reversed when OAA is metabolized by PDH and CS (succ+pyr) or GOT2 (succ+glut) (Fig. 4E-F). Surprisingly, we show that extra-mitochondrial malate, added at physiologically relevant concentrations range, can increase internal OAA, leading to a dominant inhibition of complex II, rewiring RC electrons fuelling as well as the TCA anaplerosis. This dose dependent inhibition of the complex II driven respiration by extra-mitochondrial malate is associated with an increase in complex I driven respiration (Fig. 4G). Beyond complex II inhibition, MDH2 activity is crucial to sustain complex I activity through direct NADH production and by producing OAA indispensable for mitochondrial metabolism of pyruvate and glutamate (Fig. S1A-B). Moreover, the immediate and reversible inhibition of complex II by OAA indicate that mitochondrial OAA levels could act as a metabolic sensor adjusting electrons fuelling the RC to fit cell metabolic needs. This metabolic regulation synergistically increases RC's NADH oxidative capacity and rewires MDH2 driven TCA anaplerosis, preventing malate production from succinate to favour oxidation of imported malate (Fig. 4G). This discovery prompts us to hypothesise that MAS does not only passively balance cytosolic and mitochondrial NADH but instead, through MDH2 oxidation of imported malate, MAS actively rewires RC's fuelling, and TCA anaplerosis to boost complex I activity and fuelling.

To conclude, our work first demonstrated that permeabilized heart and liver mitochondria incubated with both NADH and succinate prioritize RC fueling from succinate. This observation challenges recent hypothesis supporting that the supramolecular organization of complex I with other RC complexes could favour RC fueling from NADH against the respirasome free complex II. Furthermore, multilevel analyses performed on permeabilized and metabolically active mitochondria demonstrate that the preferential succinate driven respiration is tightly controlled by intramitochondrial OAA level. Altogether, our analyses demonstrate that the MDH2 produced OAA can synergistically rewire the fuelling of the RC and TCA cycle to adjust RC's NADH oxidative capacity in response to extramitochondrial malate metabolically produced by the MAS.

4. Experimental procedures

4.1. Biological materials

All mice used in this study were inbred C57Bl/6N background. The bioenergetic phenotype presented in this manuscript is not gender specific and therefore analyses performed with isolated heart and liver mitochondria isolated from male and female were pooled. Mice were maintained on a standard mouse chow diet and sacrificed, between 20 and 40 weeks of age, by cervical dislocation in strict accordance with the recommendations and guidelines of the Federation of the European Laboratory Animal Science Association, and obtain with an authorization from the French ministry of Agriculture (APAFIS#12648-2017112083056692v7).

4.2. Heart and liver mitochondria isolation

Isolation of heart and liver mitochondria was performed by differential centrifugation allowing to obtain a mitochondrial fraction with high purity degree while preserving their metabolic and bioenergetic state. The purity and intactness of this isolation protocol was previously demonstrated through FACS and electron tomography analyses [43,67]. Briefly, right after the sacrifice, tissues were collected, minced and cleaned with mitochondria isolation buffer (MIB; 310 mM sucrose, 20 mM Tris-Base, 1 mM EGTA, pH 7.2) for the heart and MIB + BSA (MIB and 0.25 mg/ml of delipidated Bovine serum albumin (BSA)) for the liver. The pieces of heart were collected and homogenized with few strokes of a Potter S homogenizer (Sartorius) using a loose Teflon pestle, in an ice cold MIB supplemented with trypsin (0.5 g/l). Liver tissues homogenisation was performed in a Potter S homogenizer (Sartorius) using a Teflon pestle, and in ice cold MIB + BSA. Mitochondria were isolated by differential centrifugation, a low speed one (1000 g, 10 min, 4 °C) in a swing out rotor and another one at high speed (3500 g, 10 min, 4 °C for heart mitochondria and 10,000 g, 10 min, 4 °C for liver mitochondria) using a fixed angle rotor. The pellet of crude mitochondria obtained is suspended in MIB + BSA. Protein concentration was measured using Bio-Rad DC Protein Assay kit according to provider's instructions.

4.3. High-resolution oxygen consumption measurement

Oxygen consumption of intact crude mitochondria was measured at 37 °C, using respectively 50 µg and 100 µg of heart and liver mitochondria diluted in 2.1 ml of respiratory buffer (RB: 120 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 4 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.25 mg/ml delipidated BSA; pH 7.2) in an Oxygraph-2 k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) [68]. Oxygen consumption was measured by using different association of substrates: succinic acid (10 mM; pH 7.2), sodium pyruvate (10 mM; pH 7.2), L-Glutamate acid (5 mM; pH 7.2), L-Malic acid (concentrations are indicated in the figure legends; pH 7.2). Oxygen consumption rate was measured under 3 different conditions: in the phosphorylating state with addition of ADP (5 mM; pH 7.2), in the non-phosphorylating state with addition of oligomycin (50 ng/ml), and in the uncoupled state by successive addition of carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) up to 0.5 µM to reach the maximal respiration of the RC.

Activity of the RC was also recorded using permeabilized crude mitochondria obtain after freeze and thaw cycle. Oxygen consumption by the RC was measured as previously described [68], using respectively 50 and 100 µg of heart and liver mitochondria diluted in 2.1 ml of potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) and incubated with saturating concentrations of cytochrome *c* (62.5 µg/ml), NADH (0.625 mM) and succinate (10 mM). No oxygen consumption could be detected in absence of cytochrome *c*, and no oxygen consumption link to complex I activity was recorded when permeabilized mitochondria are incubated with pyruvate, glutamate and malate, confirming the loss of integrity of mitochondrial internal compartment.

The determination of oxygen consumption link to electron coming from complex I and complex II was determined after addition of rotenone (Rot, 30 nM) for complex I and/or atpenin A5 (AtpnA5, 20 nM) for complex II. As a control, Antimycin A (100 nM) was added at the end of each experiment to control the proportion of oxygen consumption which is not linked to RC.

4.4. Mitochondrial cytochromes quantification

The different cytochromes of the mitochondrial respiratory chain were measured by dual-wavelength spectrophotometry by comparing the spectra of fully oxidized vs. fully reduced cytochromes. In each of the two cuvettes, 2 mg of heart or 16 mg of liver mitochondrial protein were suspended in 1 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.2), and 0.05% (vol/

vol) Triton X-100 were added. In the “oxidized” cuvette, 10 µl of ferricyanide (0.5 M) were added while a few grains of sodium hydrosulfite were added in the “reduced” cuvette. The components were mixed, and the absorbance spectrums of both cuvettes were recorded. A typical difference between reduced minus oxidized spectra was obtained. Wavelength pairs and absorption coefficient used were: cytochrome *c* + *c*1 (550–540 nm) $\epsilon = 18 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$, cytochrome *b* (563–575 nm) $\epsilon = 18 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$ and cytochrome *a* + *a*3 (605–630 nm) $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$.

4.5. Western-blot analyses

Proteins from crude heart and liver mitochondria were resolved using denaturing (SDS PAGE or native electrophoreses (BN-PAGE and Second dimensional SDS PAGE)).

For SDS PAGE, 50 µg of heart and liver crude mitochondria proteins were solubilized with RIPA buffer (NaCl (150 mM), tris-base (25 mM), NP40 (1% w/v), SDS (1% w/v), deoxycholate (0.25% w/v) and EGTA (1 mM), pH 8). Solubilized mitochondria were mixed with Laemmli buffer [69], separated by Bis-Tris 15% acrylamide gel, and then transferred on nitrocellulose Amersham Protran Premium membrane (Amersham). Immunodetection was performed by fluorescence using a Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences). To perform immunodetection, membranes were blocked with 3% (w/v) milk diluted in Tris Buffer Saline (TBS; pH 8), then primary antibody (Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail; ab110413 Abcam) was added for incubation, and finally an ECL Plex™ G-A-R IgG, Cy@5 (GE Healthcare) anti-mouse secondary antibody was used. The FIJI software was used to determine and analyse densitometric profiles.

4.6. BN-PAGE analyses

For BN-PAGE, 50 µg of crude heart mitochondria and 150 µg of crude liver mitochondria proteins were incubated with digitonin extraction buffer (HEPES (30 mM), potassium Acetate (150 mM), Glycerol (12%), 6-Aminocaproic acid (2 mM), EDTA (2 mM), high-purity digitonin (3 g/g), pH 7.2), and vortexed 1 h at 4 °C to solubilize membranes. After incubation, mitochondria were centrifugated at 30,000g for 20 min, supernatants were collected and 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% or 4–16% acrylamide gradient. To reach the optimal separation and resolution of OXPHOS supramolecular organisations, digitonine solubilized proteins were loaded on 3–12% gradient gel and were migrated at 10 mA for 12 h at 4 °C (complex II are not retained in the gel after overnight run). To analyse the complex II assembly, 4–16% gradient gels were migrated 6 h in order to keep the complex II in gel and for optimal separation of RC supercomplexes. RC complexes were detected using in-gel activity (IGA) assays as described previously [70]. Briefly, native gels were washed and incubated in a potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) containing iodinitrotetrazolium (1 mg/ml) supplemented with NADH (400 µM, pH 7.2) for complex I or Succinate (50 mM, pH 7.2) and Phenazine Methosulfate (20 mM) for complex II. For complex IV in-gel activity assays, native gels were incubated in RB containing Diaminobenzidine (1 mg/ml) and cytochrome *c* (0.5 mg/ml). Coomassie staining was performed with PageBlue protein staining solution. Colorimetric bands were recorded with Optical Densitometry of an Amersham ImageQuant 800.

Proteins were also immunodetected, gels were incubated in Towbin buffer (Tris (0.3% w/v), Glycine (1.44% w/v), Ethanol (10% v/v)) supplemented with SDS (0.2% v/v) and β -mercaptoethanol (0.2% v/v) for 30 min at RT, to denature proteins. Then gels were transferred on polyvinylidene difluoride (PVDF) in Towbin transfer buffer for 2 h at 0.2 A. Immunodetection was performed as described previously using the following primary antibodies: Anti-ND11 (ref abcam: ab181848), anti-SDHC (ref protein tech: 14575-1-AP), anti-UQCRC2 (ref protein tech: 14742-1-AP), anti-COX1 (ref thermofisher: #459600), peroxidase-

conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgGs and Amersham CyDye 800 goat anti-rabbit and anti-mouse were used for immunodetection by chemiluminescence and fluorescence. Immunoreactive bands were recorded with an Amersham ImageQuant 800.

BN-PAGE gels after first dimension electrophoresis, were ran in a denaturing second dimension electrophoresis (2D-SDS PAGE). After collecting the first-dimension band and before the second dimension, first dimension bands were incubated in an Invitrogen™ Bolt™ MOPS SDS Running Buffer (Fisher Scientific) supplemented with β -mercaptoethanol (1% v/v) for 30 min at RT. Acrylamide gradient Bolt™ 4–12% Bis-Tris Plus Gels (Thermo Scientific) were used for 2D SDS-PAGE, the gels were transferred and immunodetection was performed as previously described for classical SDS-PAGE. Immunoreactive bands were incubated with primary antibody (cocktail OXPPOS: ab110413) and detected recording fluorescence and chemiluminescence with an Amersham ImageQuant 800. The FIJI software was used to quantify the perform densitometry analyses of images obtained.

4.7. Oxaloacetate quantification

Oxaloacetate level was measured using enzymatic assay based on citrate synthase activity. Intact heart (200 μ g) and liver (1000 μ g) mitochondria were incubated for oxygen consumption measurement in an Oxygraph-2 k at 37 °C. Briefly, 150 μ l of mitochondria incubated in 2.1 ml RB consuming oxygen under uncoupled condition were collected and quenched with 50 μ l ice cold acidic perchloric acid (PCA 7% without EDTA) every 30 s for three sampling during steady state uncoupled respiration, to assess steady state level of oxaloacetate. Samples were then centrifuged 10 min at 30,000g and supernatants were quickly neutralized with KOMO (KOH (2 M); MOPS (0.5 M)). OAA content was then quantified using citrate synthase buffer (Acetyl-CoA (200 μ M)), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (200 μ M), Citrate Synthase from pig heart (4 U/ml) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2). Absorbance was recorded at 412 nm in UV Greiner bio-one 96-well plate by a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech). Standard curve allowing OAA quantification was determined using fresh OAA solution.

4.8. NADH oxidation flux measurement (J_{NAD^+})

NAD^+ production rate was measured using enzymatic assay using G6PDH from *Leuconostoc mesenteroides*. Permeabilized mitochondria from heart (50 μ g) and liver (100 μ g) were incubated in 2.1 ml of potassium phosphate buffer (50 mM) with saturating concentrations of cytochrome c (62.5 μ g/ml), NADH (0.625 mM) and succinate (10 mM) in an Oxygraph-2k at 37 °C. Five sampling of 150 μ l of mitochondria incubated in potassium phosphate buffer (50 mM) were collected and quenched with 50 μ l ice cold acidic perchloric acid (PCA 7% without EDTA) every 2.5 min. Samples were then centrifuged 10 min at 30,000g and supernatants were quickly neutralized with KOMO (KOH (2 M); MOPS (0.5 M)). Neutralized samples were then subjected to enzymatic assay quantifying NAD^+ content as described previously [50].

4.9. Mitochondrial NAD(P)H quantification

NADH level was measured in intact mitochondria, using respectively 100 μ g/ml of heart mitochondria and 250 μ g/ml of liver mitochondria, by fluorescence (λ_{exc} 340 nm; λ_{em} : 460 nm) at 37 °C, under agitation with an FP-8500 Spectrofluorometer (Jasco). Intact mitochondria from heart and liver were diluted in MIB + BSA and incubated with the different substrates conditions in an High Precision Cell quartz glass (10x10mm; HellmaAnalytics).

4.10. Fumarate and Malate metabolic flux measurement

Metabolic fluxes were measured by ^1H-1D NMR. Intact Heart mitochondria were incubated in the same conditions than oxygen

consumption measurements in an Oxygraph-2 k at 37 °C. During steady state respiration assessed under uncoupled conditions, aliquots collected at 0, 5, 7.5, and 12.5 min of incubation were snap frozen in liquid nitrogen to quench biochemical reactions. Metabolites were extracted with a mix of acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) to a final ACN/MeOH/Water proportion of 2:2:1. They were then vortexed, incubated at $-20C$ for 20 min, and evaporated with a ThermoFisher SpeedVac SC250EXP concentrator. Samples were then dissolved into 200 μ l D_2O solution containing 2 mM Trimethyl-silyl-propionic acid d_4 (TSPd4) used as NMR reference standard, and centrifuged to remove membrane debris. A final 180 μ l volume of the resulting supernatants were transferred into 3 mm NMR tubes. Samples were analyzed by $1H-1D$ NMR on a Bruker Ascend 800 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm QPCI cryoprobe. A quantitative zgpr30 sequence was used with 64 k acquisition points during 128 scans. The total repetition time between scans was set to 7 s. Malate and fumarate concentrations were quantified from their respective signals in the $1H-1D$ NMR spectra using TSPd4 as internal standard. All measurements were performed in triplicates.

4.11. Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM unless otherwise indicated in figure legends. Sample number (n) indicates the number of independent biological samples (individual mice) for each experiment. Sample numbers and experimental repeats are indicated in the figures. Data were analyzed with the GraphPad Prism software using unpaired Student's *t*-test, one-way ANOVA using Turkey's multiple comparison test, or two-way ANOVA using Bonferroni multiple comparison test between group comparison, as appropriate. A 0.05 *p*-value was considered statistically significant.

Declaration of competing interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge for the support, encouragement and useful discussions provided by Dr. Manuel Rojo. We would like to thank Prof. Michel Rigoulet and Prof. Nils-Göran Larsson, Dr. Dusanka Milenkovic for their precious feedback on the manuscript. We also thank Benoit Rousseau and Julien Izotte for the work at animal house (the service commun des animaleries, Animalerie A2 – University of Bordeaux). This work was supported by the AFM-Telethon Trampoline (AFM-19613), INCa-Cancéropôle GSO (N°2020-EM27) and ANR (ANR-16-CE14-0013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. MetaboHub-MetaToul (Metabolomics & Fluxomics facilities, Toulouse, France, <http://www.metatoul.fr>) is supported by the ANR grant MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010. JCP is grateful to INSERM for funding a temporary full-time researcher position.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2022.148532>.

References

- [1] P. Mitchell, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* 191 (1961) 144–148, <https://doi.org/10.1038/191144a0>.
- [2] H.F. Alkan, P.W. Vesely, H. Hackl, J. Foßelteder, D.R. Schmidt, M.G. Vander Heiden, M. Pichler, G. Hoefler, J.G. Bogner-Strauss, Deficiency of malate-aspartate shuttle component SLC25A12 induces pulmonary metastasis, *Cancer Metab.* 8 (2020) 26, <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00232-7>.

- [3] P. Borst, The malate–aspartate shuttle (Borst cycle): how it started and developed into a major metabolic pathway, *IUBMB Life* 72 (2020) 2241–2259, <https://doi.org/10.1002/iub.2367>.
- [4] W.-C. Lee, X. Ji, I. Nissim, F. Long, Malic enzyme couples mitochondria with aerobic glycolysis in osteoblasts, *Cell Rep.* 32 (2020), 108108, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108108>.
- [5] A.I. Cederbaum, C.S. Lieber, D.S. Beattie, E. Rubin, Characterization of shuttle mechanisms for the transport of reducing equivalents into mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 158 (1973) 763–781, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90571-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90571-7).
- [6] A.G. Dawson, Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells, *Trends Biochem. Sci.* 4 (1979) 171–176, [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90417-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90417-1).
- [7] B. Safer, C.M. Smith, J.R. Williamson, Control of the transport of reducing equivalents across the mitochondrial membrane in perfused rat heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2 (1971) 111–124, [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(71\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(71)90065-4).
- [8] K.F. LaNoue, A.J. Meijer, A. Brouwer, Evidence for electrogenic aspartate transport in rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 161 (1974) 544–550, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90337-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90337-3).
- [9] K.F. LaNoue, E.I. Walajjys, J.R. Williamson, Regulation of glutamate metabolism and interactions with the citric acid cycle in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 7171–7183.
- [10] B.E. Baysal, R.E. Ferrell, J.E. Willett-Brozick, E.C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, P.E. Taschner, W.S. Rubinstein, E.N. Myers, C. W. Richard, C.J. Cornelisse, P. Devilee, B. Devlin, Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma, *Science* 287 (2000) 848–851, <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.848>.
- [11] S.E. Browne, A.C. Bowling, U. Macgarvey, M.J. Baik, S.C. Berger, M.M.K. Muquit, E.D. Bird, M.F. Beal, Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 646–653, <https://doi.org/10.1002/ana.410410514>.
- [12] E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, C.-H. Hu, A.J. Dare, A.M. James, S. Rogatti, R.C. Hartley, S. Eaton, A.S.H. Costa, P. S. Brookes, S.M. Davidson, M.R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M.J. Shattock, A. J. Robinson, L.M. Work, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy, Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature* 515 (2014) 431–435, <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- [13] S. Dröse, Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning, *Biochim. Biophys. Acta* 1827 (2013) 578–587, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.004>.
- [14] J. Zhang, Y.T. Wang, J.H. Miller, M.M. Day, J.C. Munger, P.S. Brookes, Accumulation of succinate in cardiac ischaemia primarily occurs via canonical Krebs cycle activity, *Cell Rep.* 23 (2018) 2617–2628, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.104>.
- [15] E.L. Mills, B. Kelly, A. Logan, A.S.H. Costa, M. Varma, C.E. Bryant, P. Tourlomis, J.H.M. Däbritz, E. Gottlieb, I. Latorre, S.C. Corr, G. McManus, D. Ryan, H.T. Jacobs, M. Szibor, R.J. Xavier, T. Braun, C. Frezza, M.P. Murphy, L.A. O'Neill, Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages, *Cell* 167 (2016) 457–470, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>, e13.
- [16] J. Favier, L. Amar, A.-P. Gimenez-Roqueplo, Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine, *Nat. Rev. Endocrinol.* 11 (2015) 101–111, <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.188>.
- [17] A. King, M.A. Selak, E. Gottlieb, Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer, *Oncogene* 25 (2006) 4675–4682, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209594>.
- [18] M.A. Selak, S.M. Armour, E.D. MacKenzie, H. Boulahbel, D.G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M.C. Simon, C.B. Thompson, E. Gottlieb, Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase, *Cancer Cell* 7 (2005) 77–85, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022>.
- [19] L.W.S. Finley, W. Haas, V. Desquiret-Dumas, D.C. Wallace, V. Proccaccio, S.P. Gygi, M.C. Haigis, Succinate dehydrogenase is a direct target of sirTsin3 3 deacetylase activity, *PLoS One* 6 (2011), e23295, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023295>.
- [20] W. He, F.J.-P. Miao, D.C.-H. Lin, R.T. Schwandner, Z. Wang, J. Gao, J.-L. Chen, H. Tlan, L. Ling, Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors, *Nature* 429 (2004) 188–193, <https://doi.org/10.1038/nature02488>.
- [21] Z. Zhang, M. Tan, Z. Xie, L. Dai, Y. Chen, Y. Zhao, Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 58–63, <https://doi.org/10.1038/nchembio.495>.
- [22] H. Schägger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783, <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>.
- [23] R. Acín-Pérez, P. Fernández-Silva, M.L. Peleato, A. Pérez-Martos, J.A. Enriquez, Respiratory active mitochondrial supercomplexes, *Mol. Cell* 32 (2008) 529–539, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>.
- [24] N.V. Dudkina, R. Kouřil, K. Peters, H.-P. Braun, E.J. Boekema, Structure and function of mitochondrial supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1797 (2010) 664–670, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>, 16th European Bioenergetics Conference 2010.
- [25] J.D. Chavez, C.F. Lee, A. Caudal, A. Keller, R. Tian, J.E. Bruce, Chemical crosslinking mass spectrometry analysis of protein conformations and supercomplexes in heart tissue, *Cell Syst.* 6 (2018) 136–141.e5, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.10.017>.
- [26] K.M. Davies, T.B. Blum, W. Kühlbrandt, Conserved in situ arrangement of complex I and III2 in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 3024–3029, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720702115>.
- [27] J. Gu, M. Wu, R. Guo, K. Yan, J. Lei, N. Gao, M. Yang, The architecture of the mammalian respirasome, *Nature* 537 (2016) 639–643, <https://doi.org/10.1038/nature19359>.
- [28] J.A. Lets, K. Fiedorczuk, L.A. Sazanov, The architecture of respiratory supercomplexes, *Nature* 537 (2016) 644–648, <https://doi.org/10.1038/nature19774>.
- [29] B. Rieger, D.N. Shalaeva, A.-C. Söhnel, W. Kohl, P. Duwe, A.Y. Mulikjanian, K. B. Busch, Lifetime imaging of GFP at CoxVIII reports respiratory supercomplex assembly in live cells, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46055, <https://doi.org/10.1038/srep46055>.
- [30] E. Balsa, M.S. Soustek, A. Thomas, S. Cogliati, C. García-Poyatos, E. Martín-García, M. Jedrychowski, S.P. Gygi, J.A. Enriquez, P. Puigserver, ER and nutrient stress promote assembly of respiratory chain supercomplexes through the PERK-eIF2 α Axis, *Mol. Cell* 74 (2019) 877–890, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.031>, e6.
- [31] C. Bianchi, M.L. Genova, G. Parenti Castelli, G. Lenaz, The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36562–36569, <https://doi.org/10.1074/jbc.M405135200>.
- [32] E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, A. Latorre-Pellicer, C. Colás, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P.M. Quirós, E. Calvo, M.A. Rodríguez-Hernández, P. Navas, R. Cruz, Á. Carracedo, C. López-Otín, A. Pérez-Martos, P. Fernández-Silva, E. Fernández-Vizarra, J.A. Enriquez, Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science* 340 (2013) 1567–1570, <https://doi.org/10.1126/science.1230381>.
- [33] J.N. Blaza, R. Serreli, A.J.Y. Jones, K. Mohammed, J. Hirst, Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 15735–15740, <https://doi.org/10.1073/pnas.1413855111>.
- [34] J.G. Fedor, J. Hirst, Mitochondrial supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling, *Cell Metab.* 28 (2018) 525–531, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.024>, e4.
- [35] M. Trouillard, B. Meunier, F. Rappaport, Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) E1027–E1034, <https://doi.org/10.1073/pnas.1109510108>.
- [36] A.B. Oestreicher, S.G. Van den Bergh, E.C. Slater, The inhibition by 2,4-dinitrophenol of the removal of oxaloacetate formed by the oxidation of succinate by rat liver and heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 180 (1969) 45–55, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(69\)90192-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(69)90192-3).
- [37] P. Schollmeyer, M. Klingenberg, Oxaloacetate and adenosinetriphosphate levels during inhibition and activation of succinate oxidation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4 (1961) 43–47, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(61\)90252-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(61)90252-2).
- [38] L. Wojtczak, A.B. Wojtczak, L. Ernster, The inhibition of succinate dehydrogenase by oxaloacetate, *Biochim. Biophys. Acta, Enzymol.* 191 (1969) 10–21, [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90310-6](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90310-6).
- [39] W.P. Zeylemaker, A.D.M. Klaasse, E.C. Slater, Studies on succinate dehydrogenase: V. Inhibition by oxaloacetate, *Biochim. Biophys. Acta, Enzymol.* 191 (1969) 229–238, [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90242-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90242-3).
- [40] B.D. Fink, F. Bai, L. Yu, R.D. Sheldon, A. Sharma, E.B. Taylor, W.I. Sivitz, Oxaloacetic acid mediates ADP-dependent inhibition of mitochondrial complex II-driven respiration, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 19932–19941, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005144>.
- [41] B.D. Fink, L. Yu, W.I. Sivitz, Modulation of complex II-energized respiration in muscle, heart, and brown adipose mitochondria by oxaloacetate and complex I electron flow, *FASEB J.* 33 (2019) 11696–11705, <https://doi.org/10.1096/fj.201900690R>.
- [42] B. Safer, The metabolic significance of the malate-aspartate cycle in heart, *Circ. Res.* 37 (1975) 527–533, <https://doi.org/10.1161/01.RES.37.5.527>.
- [43] T. Brandt, A. Mourier, L.S. Tain, L. Partridge, N.-G. Larsson, W. Kühlbrandt, Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*, *elife* 6 (2017), e24662, <https://doi.org/10.7554/eLife.24662>.
- [44] J.A. Enriquez, Supramolecular organization of respiratory complexes, *Annu. Rev. Physiol.* 78 (2016) 533–561, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>.
- [45] C. Greggio, P. Jha, S.S. Kulkarni, S. Lagarrigue, N.T. Broskey, M. Boutant, X. Wang, S. Conde Alonso, E. Ofori, J. Auwerx, C. Cantó, F. Amati, Enhanced respiratory chain supercomplex formation in response to exercise in human skeletal muscle, *Cell Metab.* 25 (2017) 301–311, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.004>.
- [46] H. Schägger, K. Pfeiffer, The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain Supercomplexes*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37861–37867, <https://doi.org/10.1074/jbc.M106474200>.
- [47] E. Gnaiger, Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1837–1845, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.013>.
- [48] J.J. Hautecler, C.M. Sluse-Goffart, A. Evens, C. Duyckaerts, F.E. Sluse, Effect of aspartate and glutamate on the oxoglutarate carrier investigated in rat heart mitochondria and inverted submitochondrial vesicles, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1185 (1994) 153–159, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90205-4).

- [49] E.A. Siess, D.G. Brocks, O.H. Wieland, in: *Distribution of Metabolites Between the Cytosolic and Mitochondrial Compartments of Hepatocytes Isolated From Fed Rats* 359, 1978, pp. 785–798, <https://doi.org/10.1515/bchm2.1978.359.2.785>.
- [50] O. Bunoust, A. Devin, N. Avéret, N. Camougrand, M. Rigoulet, Competition of electrons to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3407–3413, <https://doi.org/10.1074/jbc.M407746200>.
- [51] A. Mourier, A. Devin, M. Rigoulet, Active proton leak in mitochondria: a new way to regulate substrate oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 255–261, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.10.011>.
- [52] I.-L. Pålman, L. Gustafsson, M. Rigoulet, C. Larsson, Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 18 (2001) 611–620, <https://doi.org/10.1002/yea.709>.
- [53] M. Rigoulet, A. Mourier, A. Galinier, L. Casteilla, A. Devin, Electron competition process in respiratory chain: regulatory mechanisms and physiological functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 671–677, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.030>.
- [54] P. Carneiro, M. Duarte, A. Videira, The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1608 (2004) 45–52, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.10.004>.
- [55] S. Foriel, G.H. Renkema, Y. Lasarzewski, J. Berkhout, R.J. Rodenburg, J.A. M. Smeitink, J. Beyrath, A. Schenck, A *Drosophila* mitochondrial complex I deficiency phenotype array, *Front. Genet.* 10 (2019), <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00245>.
- [56] L.I. Grad, B.D. Lemire, Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 303–314, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh027>.
- [57] M.A.H. Luttkik, K.M. Overkamp, P. Kötter, S. de Vries, J.P. van Dijken, J.T. Pronk, The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24529–24534, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24529>.
- [58] S. Ait-El-Mkadem, M. Dayem-Quere, M. Gusic, A. Chaussonot, S. Bannwarth, B. François, E.C. Genin, K. Fragaki, C.L.M. Volker-Touw, C. Vasnier, V. Serre, F. Lespinasse, S. Richter, G. Eisenhofer, C. Rouzier, F. Mochel, A. De Saint-Martin, M.-T. Abi Warde, Jans JJM, J. Amiel, Z. Avsec, C. Mertes, T.B. Haack, T. Strom, T. Meitinger, P.E. Bonnen, R.W. Taylor, J. Gagneur, P.M. van Hasselt, A. Rötig, A. Delahodde, H. Prokisch, S.A. Fuchs, V. Paquis-Flucklinger, M.G.M. de Sain-van der Velde, K.L.I. van Gassen, Mutations in MDH2, encoding a Krebs cycle enzyme, cause early-onset severe encephalopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 100 (2017) 151–159, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.014>.
- [59] D.J. Hayes, D.J. Taylor, P.J. Bore, D. Hilton-Jones, D.L. Arnold, M.V. Squier, A. E. Gent, G.K. Radda, An unusual metabolic myopathy: a malate-aspartate shuttle defect, *J. Neurol. Sci.* 82 (1987) 27–39, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(87\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0022-510x(87)90004-9).
- [60] A. Munnich, P. Rustin, Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders, *Am. J. Med. Genet.* 106 (2001) 4–17, <https://doi.org/10.1002/ajmg.1391>.
- [61] C.D.M. van Karnebeek, R.J. Ramos, X.-Y. Wen, M. Tarailo-Graovac, J.G. Gleeson, C. Skrypnik, K. Brand-Arzamendi, F. Karbassi, M.Y. Issa, R. van der Lee, B. I. Drögemöller, J. Koster, J. Rousseau, P.M. Campeau, Y. Wang, F. Cao, M. Li, J. Ruiter, J. Ciapaitė, L.A.J. Kluijtmans, M.A.A.P. Willemsen, J.J. Jans, C.J. Ross, L. T. Wintjes, R.J. Rodenburg, M.C.D.G. Huigen, Z. Jia, H.R. Waterham, W. W. Wasserman, R.J.A. Wanders, N.M. Verhoeven-Duif, M.S. Zaki, R.A. Wevers, Bi-allelic GOT2 mutations cause a treatable malate-aspartate shuttle-related encephalopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 105 (2019) 534–548, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.07.015>.
- [62] K. Birsoy, T. Wang, W.W. Chen, E. Freinkman, M. Abu-Remaileh, D.M. Sabatini, An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis, *Cell* 162 (2015) 540–551, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>.
- [63] L.B. Sullivan, D.Y. Gui, A.M. Hosios, L.N. Bush, E. Freinkman, M.G. Vander Heiden, Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells, *Cell* 162 (2015) 552–563, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>.
- [64] J.L. Purvis, J.M. Lowenstein, The relation between intra- and extramitochondrial pyridine nucleotides, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2794–2803, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61739-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61739-4).
- [65] A. Davila, L. Liu, K. Chellappa, P. Redpath, E. Nakamaru-Ogiso, L.M. Paoletta, Z. Zhang, M.E. Migaud, J.D. Rabinowitz, J.A. Baur, Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria, *elife* 7 (2018), e33246, <https://doi.org/10.7554/eLife.33246>.
- [66] T.S. Luongo, J.M. Eller, M.-J. Lu, M. Niere, F. Raith, C. Perry, M.R. Bornstein, P. Oliphant, L. Wang, M.R. McReynolds, M.E. Migaud, J.D. Rabinowitz, F. B. Johnson, K. Johnson, M. Ziegler, X.A. Cambronne, J.A. Baur, SLC25A51 is a mammalian mitochondrial NAD+ transporter, *Nature* 588 (2020) 174–179, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2741-7>.
- [67] A. Mourier, E. Motori, T. Brandt, M. Lagouge, I. Atanassov, A. Galinier, G. Rappl, S. Brodesser, K. Hulthenby, C. Dieterich, N.-G. Larsson, Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels, *J. Cell Biol.* 208 (2015) 429–442, <https://doi.org/10.1083/jcb.201411100>.
- [68] A. Mourier, S. Matic, B. Ruzzenente, N.-G. Larsson, D. Milenkovic, The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms, *Cell Metab.* 20 (2014) 1069–1075, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.005>.
- [69] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [70] Wittiget al., n.d., I Wittig R Carrozzo FM Santorelli H. Schägger n.d. Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28:3811–3820. doi:10.1002/elps.200700367.

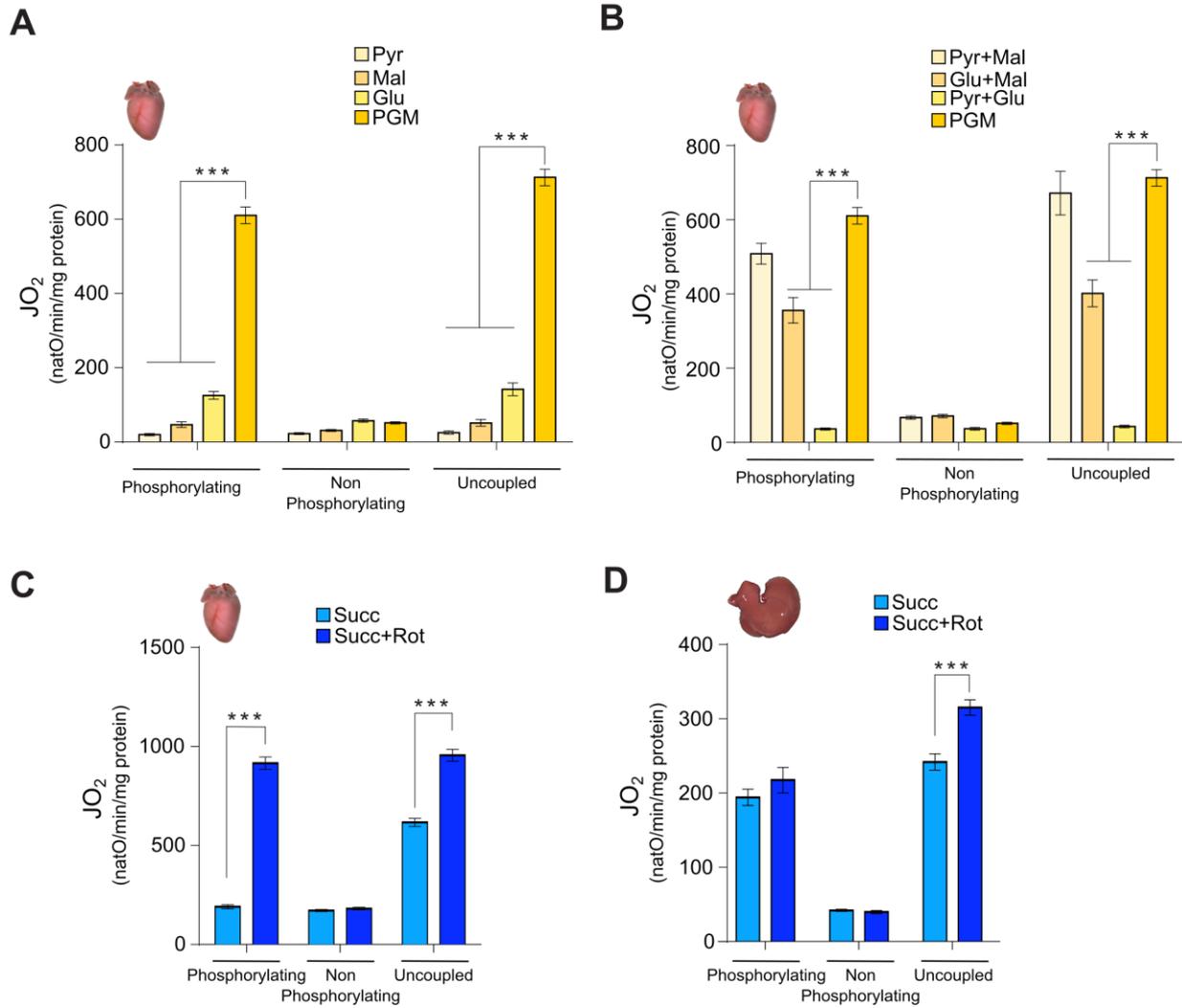


Fig. 1S. Complex I and complex II driven respiration depends strongly on substrate combination. (A, B) Oxygen consumption of intact mitochondria isolated from heart were assessed in presence of unique (A) or mixed combination of substrates (B) which mitochondrial metabolism result in delivering NADH to complex I (pyruvate 10 mM, glutamate 5 mM, malate 5 mM). Respiration are assessed under phosphorylating conditions (ADP +Pi), non-phosphorylating conditions (oligomycin), and uncoupled (CCCP titration). (n = 4) Error bars represent the mean \pm SEM. (C, D) Oxygen consumption of intact mitochondria isolated from heart (C) and liver (D) are assessed in presence of succinate \pm rotenone (30 nM) under phosphorylating conditions (ADP+Pi), non-phosphorylating conditions (oligomycin), and uncoupled (CCCP titration). Heart (n = 28), Liver (n = 11), Error bars represent the mean \pm SEM.

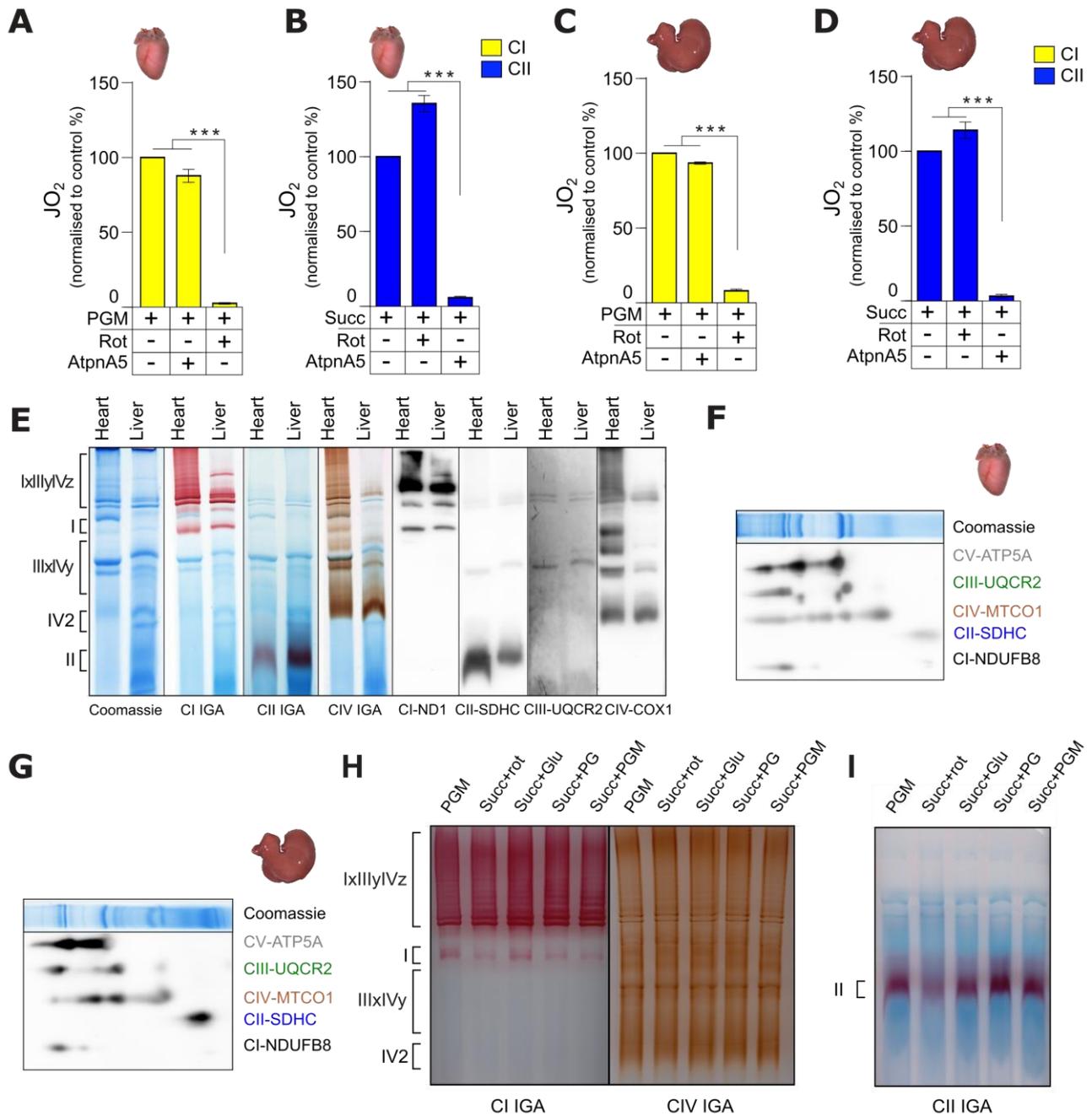


Fig. 2S. Heart and liver mitochondrial respiratory chain's enzymes stoichiometry, supramolecular organization and preferential electron fuelling.

(A–D) Oxygen consumption of uncoupled heart (A, B) and liver (C, D) intact mitochondria in presence of mitochondrial complex I substrates (PGM, yellow bars) (A, C), or complex II substrate (Succ, blue bars) (B, D). Complex I (A, C) or complex II (B, D) driven respiration are recorded \pm rotenone (rot, complex I inhibitor, 30 nM), or Atpenin A5 (AtpnA5, complex II inhibitor, 20 nM). Heart ($n = 5$), liver ($n = 5$). Error bars represent the mean \pm SEM. (E) Supramolecular organisation of heart and liver respiratory chain. Heart and liver mitochondria are solubilized with a digitonin/protein ratio of 3:1 (g/g) and high MW assemblies are resolved using 4–16% BN-PAGE, followed by complex I-, complex II- and complex IV-IGA assays, or by western blot analyses using antibody against ND1, SDHC, UQCR2 or COX1 subunits. Representative of three different experiments. Heart ($n = 3$), liver ($n = 3$). (F, G) RC complexes composition of heart (F) and liver (G) SC assessed by 2D-BN/SDS-PAGE and immunoblot analyses are performed with OXPHOS cocktail antibodies against NDUFB8, MTCO1, UQCR2 and ATP5A subunits. Heart ($n = 3$), liver ($n = 3$). (H, I) Supramolecular organisation of heart respiratory chain incubated with different respiratory substrate. Heart and liver mitochondria incubated with PGM, succinate \pm rotenone (Succ, Succ+rot), succinate glutamate (Succ+Glu) or succinate pyruvate and glutamate (Succ+PG) are solubilized with a digitonin/protein ratio of 3:1 (g/g) and RC are resolved with 3–12% (H) or 4–16% (I) BN-PAGE, followed by complex I-, complex II- and complex IV-IGA assays. Representative of three different experiments. Heart ($n = 3$).

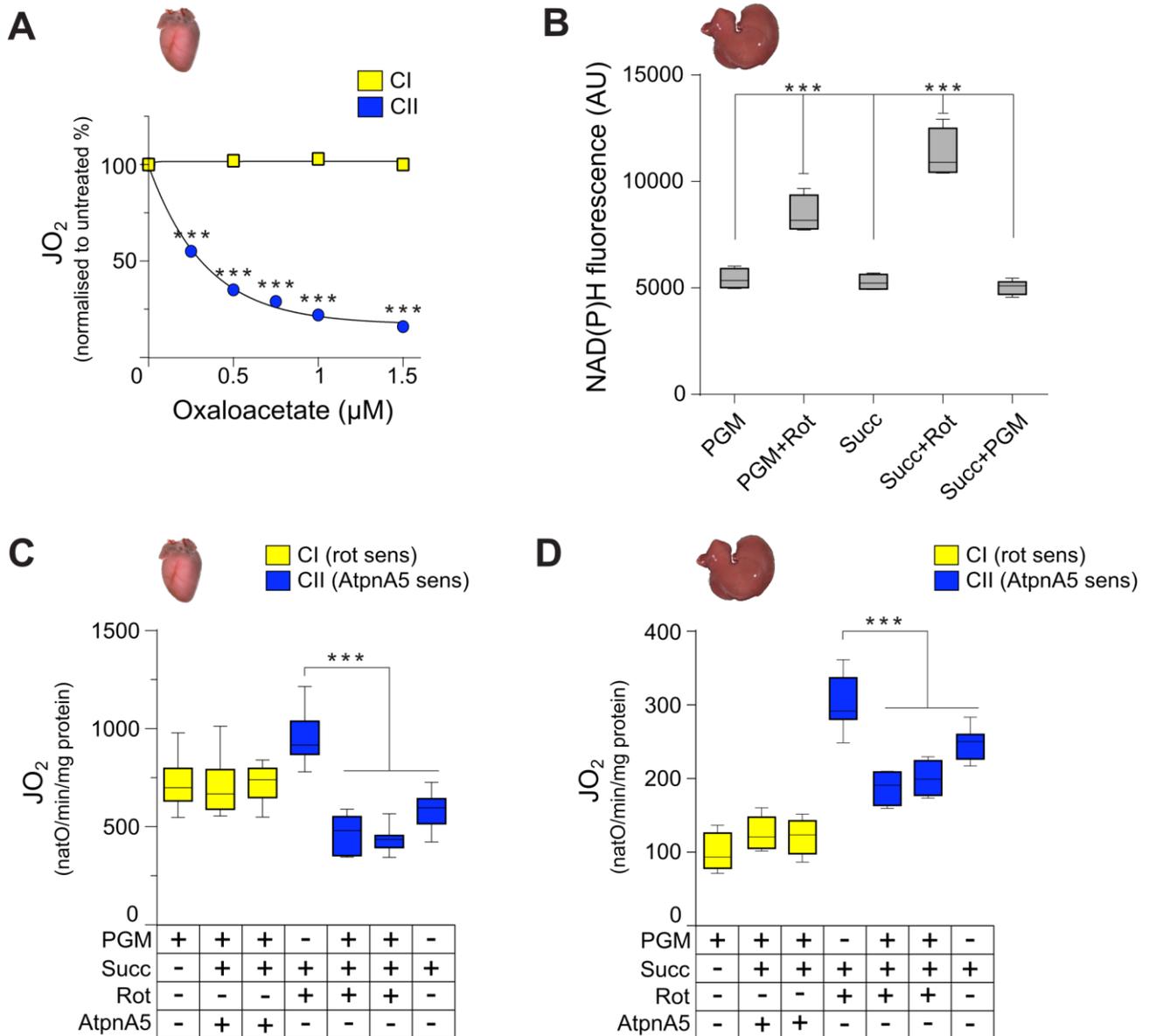


Fig. 3S: Internal OAA level orchestrates the respective contribution of complex I and II to feed the respiratory chain with electrons.

(A) Oxygen consumption of permeabilised heart mitochondria in presence of cytochrome c (62.5 µg/ml), and increasing concentration of oxaloacetate are added when mitochondria are incubated with NADH (yellow bars) or with succinate (blue bars). (n = 3), error bars represent the mean ± SEM. (B) NAD(P)H fluorescence of uncoupled liver mitochondria incubated with complex I substrates (PGM) ± rotenone (30 nM), or complex II substrate (Succ) ± rotenone (30 nM), or both (Succ+PGM). Liver (n = 3), error bars represent the mean ± SEM. (C, D) Oxygen consumption of uncoupled heart (C) and liver (D) intact mitochondria fed with complex I substrates (PGM) and/or complex II substrate (Succ). Addition of complex I (rotenone, 30 nM) or complex II (atpeninA5, 20 nM) specific inhibitor are used to discriminate complex I dependent respiration (yellow bars) and complex II dependent respiration (blue bars) when mitochondria are incubated with both PGM and succinate. Complex I and complex II inhibitor were added sequentially (2 possible sequences of inhibitor are presented, second and fifth column is when AtpnA5 is added first then rotenone, the third and sixth column is when rotenone is added first and then AtpnA5). Heart (n = 11), liver (n = 4), error bars represent the mean ± SEM.

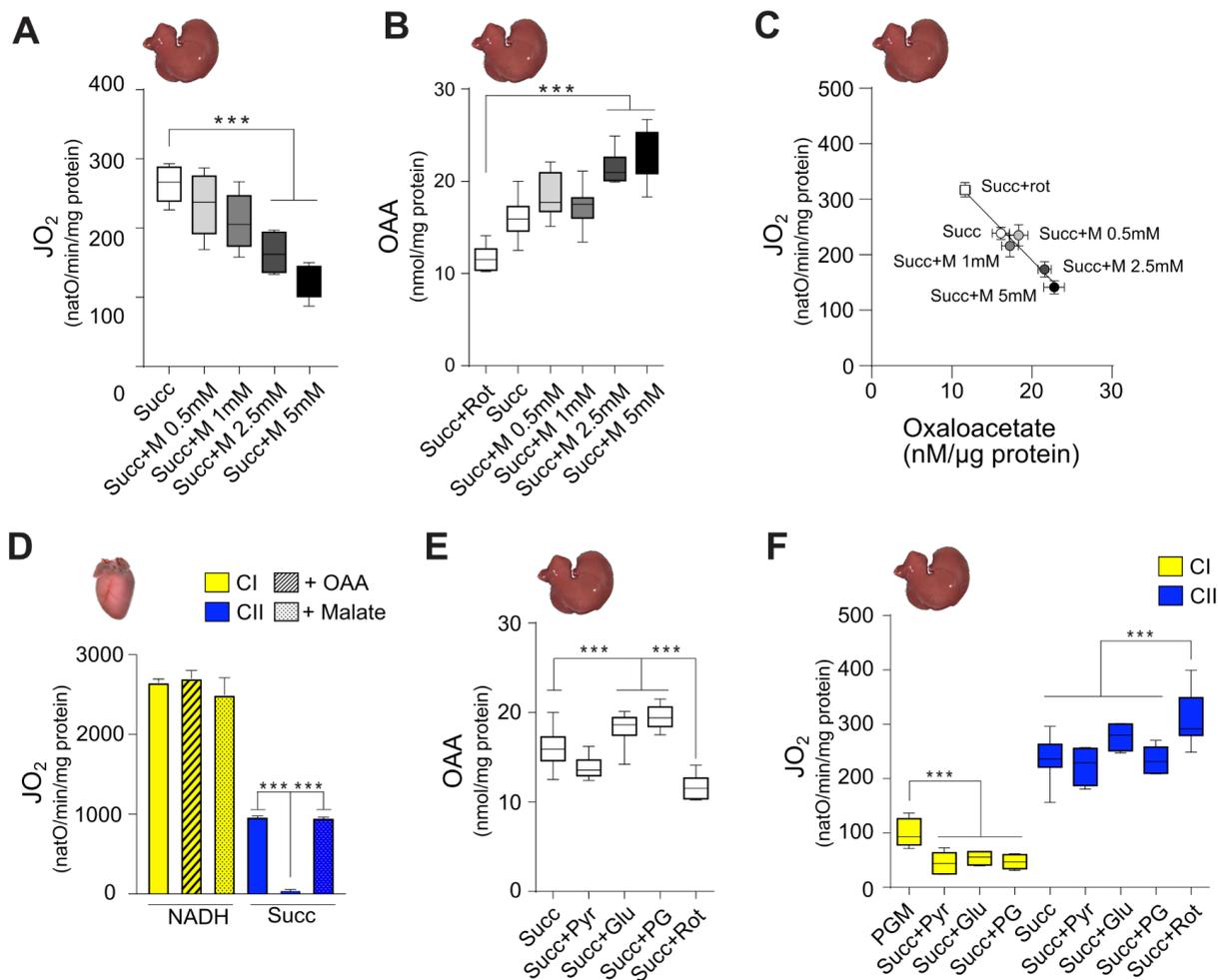
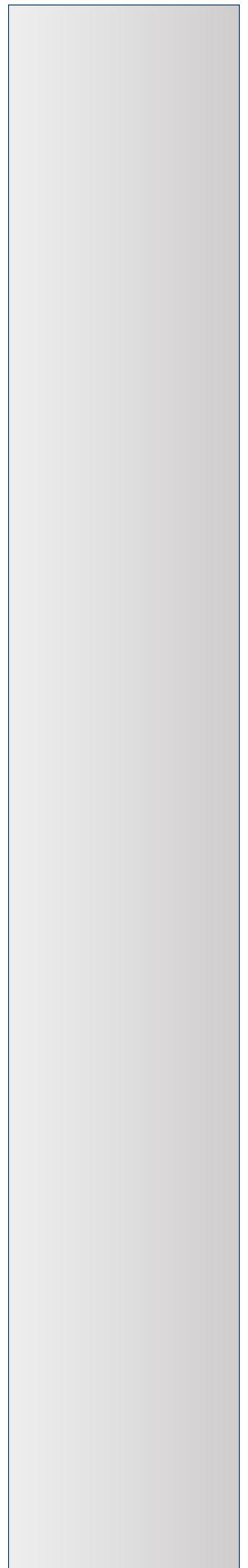


Fig. 4S. MDH2 rewire TCA cycle and respiratory chain electrons flow to favour NADH oxidation.

(A) Oxygen consumption (B) oxaloacetate level assessed with intact liver mitochondria fed with succinate and increased concentration of malate (M) during uncoupled respiration. ($n = 3$), error bars represent the mean \pm SEM. (C) Correlation between mitochondrial oxygen consumption and oxaloacetate levels of intact liver mitochondria isolated fed with succinate and increasing concentration of malate (M). Error bars represent the mean \pm SEM. (D) Oxygen consumption of permeabilised heart mitochondria fed with complex I (NADH, yellow bars) or complex II (Succ, blue bars) substrates \pm addition of oxaloacetate (hatched bars) or malate (dotted bars). ($n = 4$), error bars represent the mean \pm SEM. (E) Oxaloacetate levels assessed with intact liver mitochondria in presence of different substrates condition metabolizing endogenously produced OAA (Succ+Glu, Succ+Pyr, Succ+PG). ($n = 3$), error bars represent the mean \pm SEM. (F) Oxygen consumption of intact liver mitochondria fed with indicated substrates conditions (Succ+Pyr, Succ+Glu or Succ+Pyr+Glu). Addition of specific inhibitor of complex I (rotenone) and complex II (AtpeninA5) during uncoupled respiration, determine the complex I driven respiration (yellow bars) or complex II driven respiration (blue bars). ($n = 5$), error bars represent the mean \pm SEM.

**Etude des capacités
respiratoires des complexes
I et II et du métabolisme
mitochondrial dans des
conditions de respiration
phosphorylante**



5 Partie 3 : Etude des capacités respiratoires des complexes I et II et du métabolisme mitochondrial dans des conditions de respiration phosphorylante.

5.1 Etat de l'art :

Le métabolisme cellulaire et les voies anaboliques ont besoin d'énergie sous forme d'ATP pour pouvoir fonctionner et sont donc dépendantes du potentiel phosphate. Comme décrit dans l'introduction, l'un des producteurs majeurs de cette dernière est l'ATP synthase. Dans les mitochondries, certaines enzymes ont besoin d'ATP pour pouvoir fonctionner, comme par exemple la pyruvate carboxylase dans le cycle de Krebs qui permet de générer de l'oxaloacetate à l'aide de pyruvate et d'ATP. L'ATP peut donc être un facteur régulateur de l'interconnexion entre les voies métaboliques que j'ai étudié dans *l'Article 2*.

La mitochondrie possède une double membrane qui lui permet de réguler fortement le transport des protéines, lipides et métabolites vers la matrice. Certains des transporteurs mitochondriaux sont dépendants de l'ATP (Kumar et al., 2019; Liesa et al., 2012; Yamamoto et al., 2014), et du potentiel de membrane (Devin et al., 2019; Frigerio et al., 2008; Palmieri et al., 2020; Palmieri and Monné, 2016), ce qui traduit d'un lien étroit, autre qu'au niveau de l'approvisionnement en substrats, entre le transport et le fonctionnement de l'OXPPOS. En étudiant les mécanismes de transports des métabolites à l'intérieur des mitochondries, une multitude de métabolites utilisés durant nos expériences de respiration dépend de ces transporteurs. Le glutamate, par exemple, est transporté par l'intermédiaire de l'AGC (Aspartate-glutamate carrier) en échange d'aspartate et d'un proton, mais il peut également l'être par le transporteur glutamate carrier (GC) (Frigerio et al., 2008). Le malate peut être échangé contre l' α -cétoglutarate *via* le 2-oxoglutarate carrier (OGC), et il en existe d'autres pour le pyruvate et le citrate qui peuvent même faire intervenir des échangeurs

entre ces divers métabolites (Dolce et al., 2014; Korla et al., 2015; Palma et al., 2010; Palmieri and Monné, 2016; Vacanti et al., 2014), impliquant donc un lien étroit entre les métabolites produits et présents dans la matrice et dans l'espace extra-mitochondrial.

La complexité de l'étude du métabolisme mitochondrial provient notamment de cette grande diversité des transporteurs de métabolites ayant une affinité plus ou moins forte pour ces métabolites. Un métabolite pourra donc avoir une multitude d'entrée dans la mitochondrie, ne faisant pas intervenir les mêmes partenaires protéiques et métaboliques, et pouvant dépendre du tissu étudié. Comme dit ci-dessus, le glutamate possède deux voies d'entrée (Frigerio et al., 2008), dans un cas, il permettra à la MAS de fonctionner plus efficacement, dans l'autre il sera d'avantage redirigé vers la GDH et le cycle de Krebs. Il a été décrit que AGC possédait deux isoformes dont l'expression était dépendante des tissus, AGC1 étant présente dans les tissus excitables comme les muscles striés squelettiques et le cerveau, alors que AGC2 serait beaucoup plus abondante dans les tissus comme le foie, (Frigerio et al., 2008; Satrustegui et al., 2007). La voie d'entrée des métabolites sera donc également une spécificité tissulaire qui compliquera l'étude du métabolisme mitochondrial, mais qui pourrait être clé pour caractériser la fonction des tissus.

5.2 Résultats et discussions :

La dernière partie de mon travail de thèse que je présenterai dans ce manuscrit s'est centré sur une étude plus poussée du métabolisme mitochondrial cardiaque dans des conditions de respirations phosphorylantes, afin notamment de déterminer la contribution respective des complexes I et II pour alimenter les chaînes respiratoires et des implications sur le métabolisme mitochondrial.

L'étude de cette condition métabolique est primordiale car elle est celle qui se rapproche le plus de l'état physiologique des mitochondries. Comme décrit dans l'*Etat de l'art*, les conditions de respiration phosphorylante sont plus difficiles à appréhender métaboliquement, par rapport à des conditions de mitochondries découplées. En effet, un plus grand nombre d'acteurs, dépendants du potentiel de membrane et de l'ATP, est impliqué dans le fonctionnement du métabolisme mitochondrial.

Lors de ce travail, j'ai voulu (1) utiliser la stratégie d'inhibition exploitée dans les *articles 1 et 2* pour étudier l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, et par la suite (2) trouver des stratégies complémentaires permettant de discriminer les flux respiratoires provenant des complexes I et II autre que par l'utilisation d'inhibiteurs des complexes.

5.2.1 La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II ne peut être appréhendée par une stratégie d'inhibition dans des conditions de respiration phosphorylante.

L'une des particularités des respirations de mitochondries de tissus est que la respiration phosphorylante est sensiblement la même que celle mesurée en conditions découplées (*Article 2 figure 1A-B et figure 1S*), par opposition aux respirations de cellules en culture perméabilisées dans lesquelles la respiration double entre ces deux états respiratoires (*Article 1 figure 4A-C*). Ces observations tendent à démontrer que la baisse de potentiel de membrane associée à la synthèse d'ATP, augmente la respiration à un niveau proche de la respiration maximale mesurée à l'état découplé. L'activité de la chaîne respiratoire, en conditions phosphorylantes, est donc d'avantage dépendante du flux d'électrons ou de l'approvisionnement en substrats que de la consommation de la force proton motrice, dans la majorité des conditions de substrats respiratoires. Pour autant, j'ai pu observer que la respiration phosphorylante mesurée en présence de succinate était bien plus impactée par l'absence de roténone que la respiration découplée (*Article 2 figure 1SD et Figure 42 A*). L'équipe du Pr. SIVITZ a décrit dans ces travaux que la concentration d'oxaloacetate était dépendante de la concentration d'ADP et de son rôle sur le potentiel de membrane. Cette observation pourrait expliquer que le complexe II soit plus inhibé en respiration phosphorylante qu'en respiration découplé (Fink et al., 2018).

Lorsque les substrats des complexes I et II sont présents simultanément en conditions de respiration phosphorylante, à l'instar des conditions de mitochondries découplées, la réoxydation du NADH et du succinate ne peut pas se faire au maximum de leur capacité (*Article 2 figure 1A-B et figure 1S et Figure 42 A*). Ces observations semblent indiquer, ici encore, qu'un mécanisme de compétition à l'entrée des électrons est mis en place entre les complexes I et II. Les inhibiteurs spécifiques de ces ubiquinone oxydoréductases ont été utilisés, lors de respiration en conditions phosphorylantes cette fois. Durant la mise au point de cette stratégie dans la *partie 4*, l'une des bases fondamentales pour valider notre approche était que la répartition des flux respiratoires, provenant des complexes I et II, devait être indépendante de la séquence d'ajout des inhibiteurs (*voir matériel et méthode partie 2.2.2.1*), ce qui n'est pas le cas ici (*Figure 42 B*). En effet, lorsque la roténone est rajoutée en premier, le flux majoritaire provient du complexe II (fonctionnant à 81% de ses capacités maximales par rapport à la condition

simple substrat), le complexe I ne contribuant au flux d'électrons que de façon minoritaire (44% de ses capacités mesurées par rapport à la condition simple substrat). A l'inverse, lorsque l'atpenine A5 est rajoutée en premier, la respiration provenant du complexe I est majoritaire (81% de sa respiration maximale), alors que la respiration du complexe II est minoritaire (54% de ses capacités maximales) (*Figure 42B*). La séquence d'ajout des inhibiteurs ayant un rôle sur la répartition des flux, ces résultats démontrent qu'il n'est pas possible, par cette approche, de discriminer les flux respiratoires provenant de ces complexes en conditions phosphorylantes.

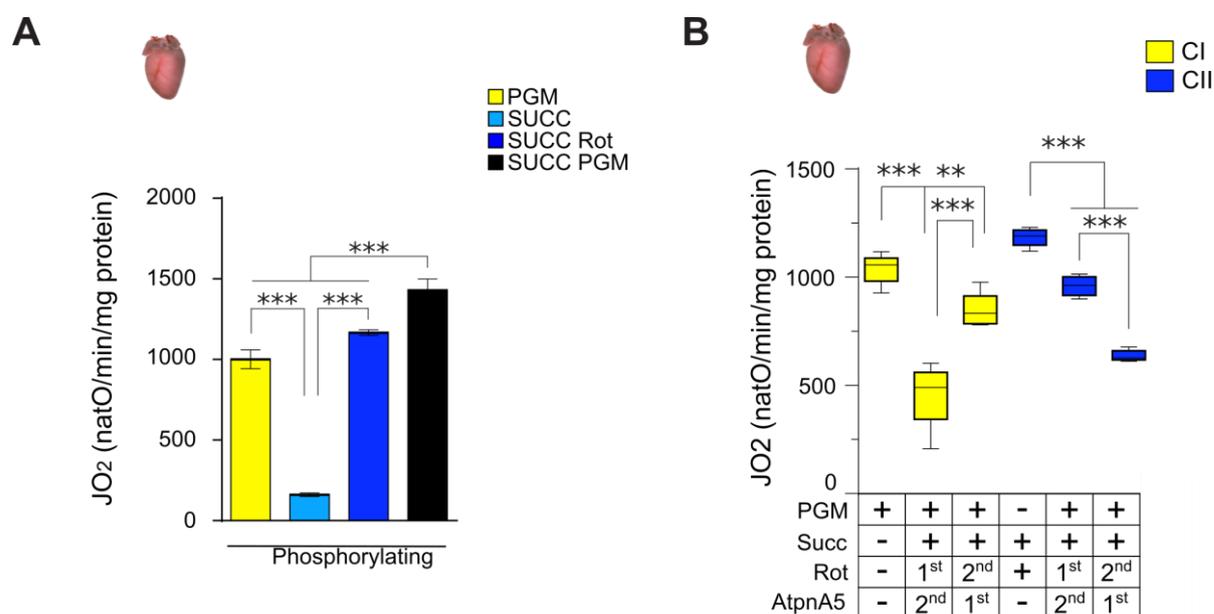


Figure 42. Capacités respiratoires en conditions phosphorylantes des complexes I et II en présence de substrats simples ou multiples.

(A) Respirations en conditions phosphorylantes pour les conditions de substrats indiquées contenant, 10mM de pyruvate (P), 5mM de Glutamate (G), 1mM de Malate (M), 10 mM de Succinate (Succ), 5mM d'ADP. (B) Respirations de mitochondries cardiaques en conditions phosphorylantes approvisionnées avec les substrats du complexe I (PGM), du complexe II (Succ Rot) ou les deux (Succ PGM). L'addition d'inhibiteurs spécifiques du complexe I (rotenone, 30nM) ou du complexe II (AtpeninA5, 20nM) sont utilisés pour discriminer la respiration dépendante de l'activité du complexe I (en jaune) et du complexe II (en bleu), lorsque les mitochondries sont incubées avec le PGM et le Succ. Les inhibiteurs du complexe I et du complexe II sont ajoutés séquentiellement et sont indiqués dans le tableau sous le graphe : 1st pour ajouté en premier et 2nd pour ajouté en second. (n=5)

L'une des hypothèses permettant d'expliquer ces résultats est que l'inhibition d'un complexe impacte les voies métaboliques dépendantes de l'activité de ce complexe, impliquant des phénomènes de compensations ou de redirections des flux métaboliques qui

induisent que la séquence d'ajout des inhibiteurs influence la proportion de flux dépendant des complexes I et II.

Afin d'illustrer ces propos, je vais prendre le cas spécifique des proportions de flux respiratoires en conditions découplées, pour les conditions de substrats succinate et glutamate. Dans ces conditions, l'ajout d'atpenine A5 met en évidence que la respiration est presque uniquement dépendante de l'activité du complexe II (*Figure 43A*). Néanmoins, lorsque la roténone est ajoutée en premier, un flux respiratoire provenant du complexe I est observable (*Figure 43A*). Des expériences préliminaires visant à quantifier le flux de production de métabolites par RMN 1H-1D, montrent une production de malate, d' α -cétoglutarate et d'aspartate au cours de la respiration (*Figure 43B-D*). Le métabolisme en produisant ces métabolites crée des sources génératrices de NADH par l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α KGDH), mais également par MDH2, qui possède une source de malate apportée par le succinate (*Article 2 Figure 3F*). Ces expériences démontrent que la diminution de la respiration liée à l'inhibition de l'activité d'un des complexes n'impacte pas seulement l'oxydation des substrats de ce complexe, mais également toutes les voies en aval dépendantes de cette activité. Les conditions décrites ci-dessus m'ont permis de définir cette notion de « respiration dépendante de l'activité de » *via* une condition simple avec deux substrats en respiration découplée. Les conditions de respirations phosphorylantes apportent, avec l'ATP et le potentiel de membrane, une complexité supérieure à l'étude du métabolisme mitochondrial. Une approche visant à utiliser uniquement les inhibiteurs pour discriminer les flux dépendants de l'activité des complexes I et II n'est pas envisageable.

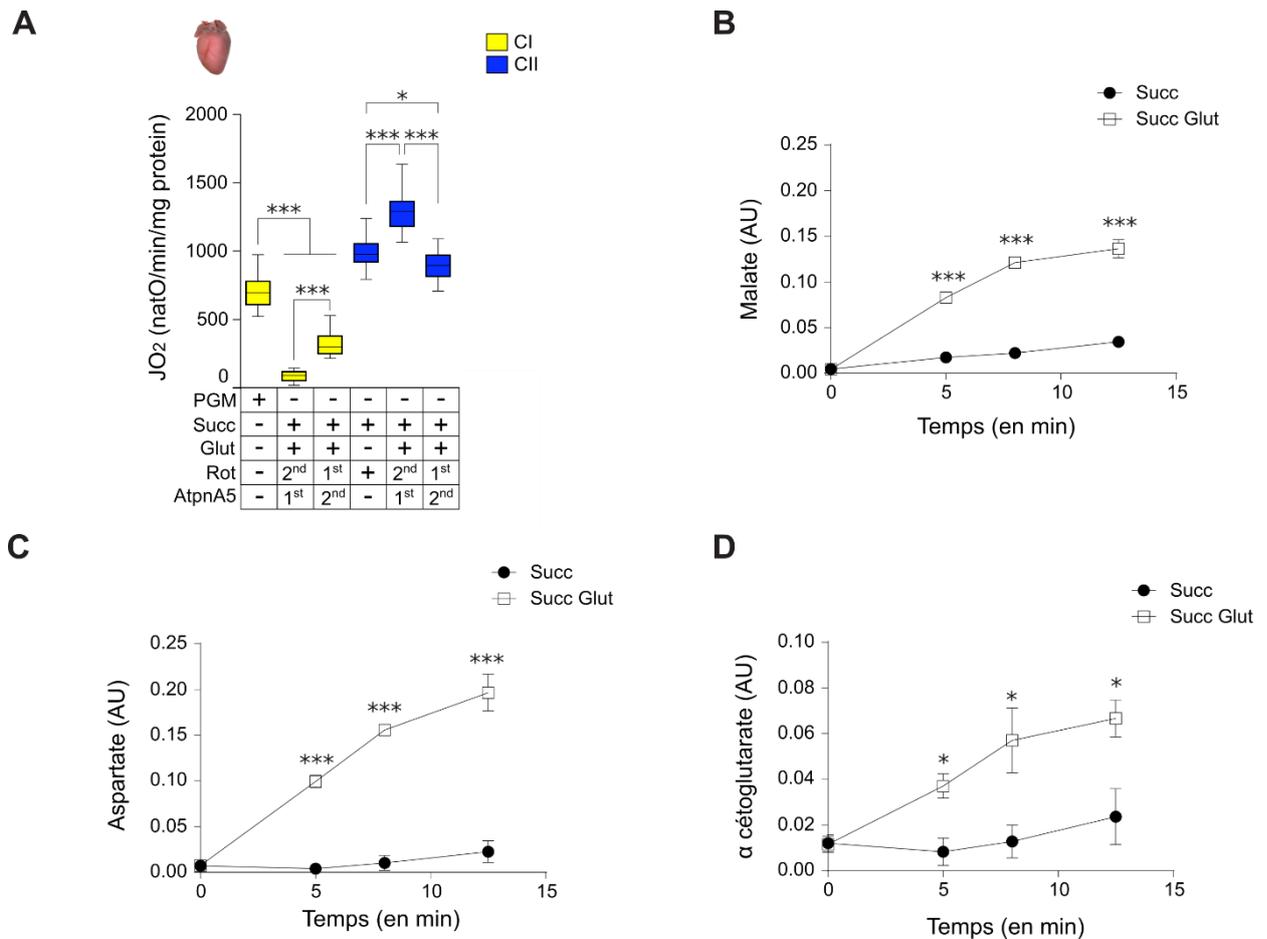


Figure 43. Flux respiratoires et métaboliques dépendant de l'ajout du glutamate en présence de succinate.

(A) Respirations de mitochondries cardiaques en conditions découplées approvisionnées avec les substrats du complexe I (PGM), du complexe II (Succ Rot) ou avec du succinate et du glutamate (Succ Glut). L'addition d'inhibiteurs spécifiques du complexe I (rotenone, 30nM) ou du complexe II (AtpeninA5, 20nM) sont utilisés pour discriminer la respiration dépendante de l'activité du complexe I (en jaune) et du complexe II (en bleu), lorsque les mitochondries sont incubées avec le succinate et le glutamate. Les inhibiteurs du complexe I et du complexe II sont ajoutés séquentiellement et sont indiqués dans le tableau sous le graphe : 1st pour ajouté en premier et 2nd pour ajouté en second. (B-D) Quantification par RMN 1H-1D de la quantité (B) de malate, (C) d'aspartate (D) d' α -cétoglutarate au cours du temps, en présence de 10mM succinate (cercle noir) ou de 10mM de succinate et de 5mM de glutamate (carré blanc) (n=3).

5.2.2 La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes I et II ne peut être appréhendée en mesurant le rendement de l'OXPPOS par le J_{ATP}/JO_2 .

Afin de trouver une autre approche pour discriminer ses flux d'entrée des électrons, j'ai tenté d'utiliser le rendement de l'OXPPOS qui est le ratio entre la synthèse d'ATP et

la respiration. Comme j'ai pu le décrire lors de la présentation de la chaîne respiratoire, les complexes I, III et IV couplent le transfert d'électrons à la translocation de protons. Ces protons sont par la suite utilisés par l'ATP synthase pour générer de l'ATP. Lors de la respiration, le nombre de protons extrudés par électrons transloqués varie entre le complexe I et le complexe II, l'oxydation du NADH (2 électrons) est décrite comme permettant la translocation de 10 protons par la chaîne respiratoire et celle du succinate (2 électrons) seulement de 6 protons (Galkin et al., 1999; Hinkle, 2005; Krab and Wikström, 1986; Wikström and Hummer, 2012). Par conséquent, à stoechiométrie H^+/e^- fixe, pour faire sortir le même nombre de protons que le complexe I, le complexe II devrait approximativement transférer 3 électrons, contre 2 électrons pour le complexe I, et consommera donc plus de succinate et d'oxygène. Le ratio ATP produit par oxygène consommé sera donc plus faible pour le complexe II. Ma stratégie a été d'utiliser le ratio J_{ATP}/J_{O_2} pour appréhender la répartition du flux respiratoire provenant des complexes I et II.

Les valeurs obtenues pour les J_{ATP}/J_{O_2} sont de 3.1 pour le PGM et de 2.2 pour le Succ+Rot, comme attendu le rendement de l'OXPHOS est significativement supérieur pour le complexe I par rapport au complexe II. Ces valeurs sont dans les ordres de grandeurs de celles décrites dans la littérature (*Figure 44A*) (Hinkle, 2005). Il est admis que pour le NADH, la valeur du J_{ATP}/J_{O_2} est de 2,5-3 et de 1,5-2 pour le succinate (Hinkle, 2005; Petersen et al., 2012; Turina et al., 2003; Walraven et al., 1996). De façon étonnante, et bien que la respiration et la production d'ATP augmentent avec l'ajout des différents substrats (Succ+G, Succ+PG, Succ+PGM) (*Figure 44B et C*), les J_{ATP}/J_{O_2} mesurés sont sensiblement les mêmes que ceux en Succ+Rot (*Figure 44A*). Dans ces conditions, je m'attendais à avoir un J_{ATP}/J_{O_2} intermédiaire entre les conditions PGM et Succ+Rot. La stratégie utilisant les inhibiteurs ne permet pas de discriminer et d'évaluer les flux d'électrons provenant de l'oxydation du NADH ou du succinate, néanmoins, il permet d'observer que la respiration dépendante du complexe I n'est pas négligeable (*Figure 43*). En l'état, le ratio J_{ATP}/J_{O_2} ne semble pas non plus utilisable pour discriminer les flux dépendants des complexes I et II. Cependant, ces données montrent que l'augmentation de la respiration induite par l'ajout de substrats multiples, n'est pas suivie par une augmentation proportionnelle de la vitesse de production d'ATP, ce qui met en évidence une baisse du rendement de l'activité de l'OXPHOS et donc d'une perte d'énergie.

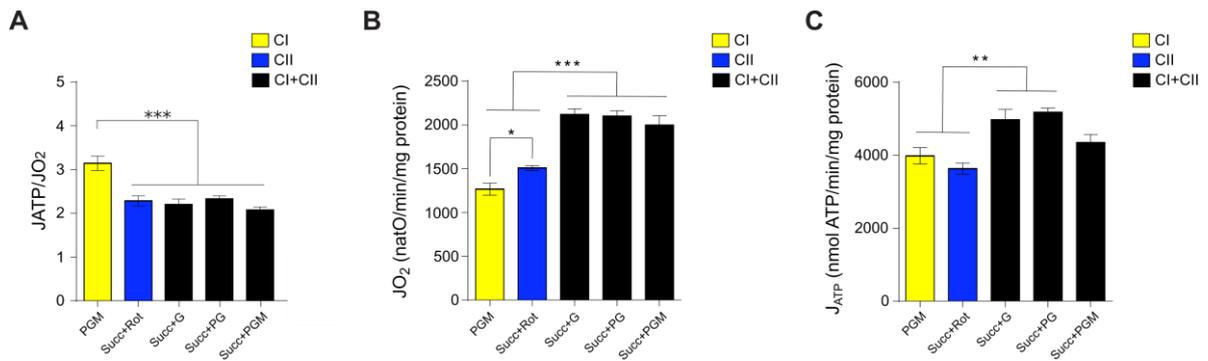


Figure 44. Rendement de l'OXPHOS suivant les conditions de substrats.

(A) Rendement de l'OXPHOS (J_{ATP}/J_{O_2}), (B) du flux respiratoire, (C) du flux de production d'ATP mesurés dans les conditions de substrats indiquées contenant, 10mM de pyruvate (P), 5mM de Glutamate (G), 1mM de Malate (M), 10 mM de Succinate (Succ), 5mM d'ADP. (n=5)

Un tel phénomène a déjà été observé chez *S. cerevisiae* où une augmentation de la respiration entraîne une diminution du rendement de l'OXPHOS (Fitton et al., 1994; Rigoulet et al., 1998). Trois phénomènes peuvent expliquer ces résultats : (1) une baisse de la stœchiométrie H^+/O , (2) une baisse du rapport H^+/O ou (3) une augmentation du rapport H^+/ATP . Il a été montré, chez *S. cerevisiae*, qu'à force proton motrice constante le rapport H^+/ATP est insensible aux variations de flux respiratoires (Fitton et al., 1994; Rigoulet et al., 1998). Cette étude montre qu'une diminution du rapport H^+/O est la cause de cette diminution du rendement de l'OXPHOS lors de l'augmentation de la respiration. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer cette baisse de rendement.

La première est le phénomène de «slipping» (Pietrobon et al., 1983). Cette théorie décrit que la stœchiométrie H^+/e^- des pompes à protons peut varier suivant les conditions. A fort flux respiratoire, ce phénomène pourrait induire une diminution de la stœchiométrie d'extrusion des protons par électron transféré, ce qui n'induirait pas de changement dans la force proton motrice mais induirait une diminution du rendement de l'OXPHOS (Rigoulet et al., 1998). La deuxième hypothèse est liée à la perméabilité aux protons de la membrane interne mitochondriale. Il a été décrit que la perméabilité aux protons peut influencer les valeurs de J_{ATP}/J_{O_2} (Hinkle, 2005). En effet, une réentrée des protons, autre que par l'ATPsynthase, induira un « gaspillage » des protons transloqués par la chaîne respiratoire, et donc une diminution du rendement de l'activité de l'OXPHOS. Il existe plusieurs processus permettant d'augmenter la perméabilité des protons de la membrane interne mitochondriale. L'un d'entre eux est le « leak actif », dans des conditions non-phosphorylantes, ce mécanisme décrit la réentrée des protons par l'intermédiaire des

déshydrogénases membranaires qui, lorsqu'elles sont très sollicitées, induisent une réentrée des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (Mourier et al., 2010). Le leak actif a été mis en évidence dans des conditions de respiration non-phosphorylante et, à l'instar du leak passif, il est dépendant de la force proton motrice. Ce phénomène n'a jamais été déterminé dans des conditions phosphorylantes, à force proton motrice plus faible, il pourrait donc n'avoir qu'un impact mineur sur la diminution du rendement de l'OXPPOS. Un autre processus provient du transport des métabolites dans la matrice mitochondriale. En effet, certains transporteurs ont besoin de protons pour pouvoir transporter les métabolites à travers la membrane interne mitochondriale. Il a été décrit que le transporteur ANT ou des transporteurs comme AGC de la MAS, induisent une réentrée des protons, et peuvent donc affecter le rendement de l'activité de l'OXPPOS (Hinkle, 2005; Pfaff and Klingenberg, 1968). Il est donc probable que l'augmentation du flux respiratoire, lié à l'ajout de substrats multiples, soit corrélée avec une augmentation des flux d'entrée des métabolites et donc à une augmentation d'entrée des protons *via* les transporteurs. Ceci pourrait expliquer, potentiellement en partie, que l'augmentation de respiration, liée à l'ajout des différents substrats, n'est pas suivi par une augmentation proportionnelle du flux de production d'ATP.

De plus, suivant les substrats utilisés, les voies d'entrées ou de sorties des métabolites qui sont sollicitées, peuvent induire des variations dans la perméabilité membranaire des protons et affecter le rendement de l'OXPPOS, ne permettant pas de discriminer les flux provenant des complexes de la chaîne respiratoire par cette stratégie.

5.2.3 La discrimination des flux respiratoires dépendants de l'activité des complexes par la mesure des flux de production de métabolites.

Le J_{ATP}/J_{O_2} ne permettant pas de discriminer l'activité des complexes I et II, j'ai tenté de mettre en place une nouvelle stratégie expérimentale permettant de mesurer les flux de productions de métabolites mitochondriaux suivant les différentes conditions de substrats. Le but étant de mesurer les flux de métabolites entrant et sortant de la mitochondrie, et de les corréler avec les mesures de respiration, pour *in fine* calculer les flux d'oxydation du succinate et du NADH par modélisation bio-informatique.

Afin de mettre au point cette stratégie, des mitochondries isolées de cœur ont été incubées dans des conditions de respiration découplée, comme décrit dans *l'Article 2*. Par

cette stratégie, je voulais avoir le maximum de paramètres me permettant de comparer les flux entre eux et de pouvoir contrôler s'il était possible d'avoir des concordances de flux, entre flux respiratoire, flux de production et flux de consommation des métabolites. Ceci permettant de détecter certains problèmes expérimentaux potentiels pour certains métabolites lors de la préparation des échantillons, de l'extraction des métabolites ou lors de la mesure par RMN.

Des mitochondries cardiaques ont été incubées en conditions découplées, dans diverses conditions de substrats. Les échantillons ont été prélevés à intervalle régulier pour avoir une cinétique de production des métabolites. Toute activité biochimique a été arrêtée par congélation rapide dans de l'azote liquide, les échantillons ont par la suite été envoyés et traités à la plateforme métabolomique METATOUL. Les résultats préliminaires montrent que de nombreux métabolites n'ont pu être détectés, comme notamment l'oxaloacetate, ou le citrate. De plus, la sensibilité de la RMN n'a pas permis de mesurer les flux de consommation des métabolites utilisés pour les mesures de respiration. En effet, étant présents en concentrations non limitantes (10mM pour le succinate et le pyruvate, 5mM pour le glutamate et 1mM de malate) le flux de consommation n'est pas mesurable de manière précise. Néanmoins, les flux de production d' α -cétoglutarate, d'aspartate et de malate ont pu être mesurés. Ces expériences sont préliminaires et nécessitent une mise au point plus approfondie, mais de nombreuses informations métaboliques peuvent être tirées de ces résultats.

La respiration dans la condition PGM s'accompagne d'une production d' α -cétoglutarate et d'aspartate dans le milieu extra-mitochondrial (*Figure 45*). Ces résultats ne permettent pas de déterminer si le flux de production du NADH est dépendant de la MAS (par MDH2), du cycle de Krebs (par la PDH, l' α -KDH et/ou la GDH), ou bien des deux. De manière intéressante, les conditions Succ+Glut et Succ+Pyr démontre que, pour le premier, la GOT fonctionne et produit de l' α -cétoglutarate et de l'aspartate, alors que pour le second, seulement l' α -cétoglutarate est produit par l'intermédiaires des enzymes du cycle de krebs (*Figure 45*), donc il semble bien y avoir plusieurs voies de consommation de l'oxaloacetate liées à la MAS et au cycle de Krebs (*Figure 41*). L'ajout simultanée de pyruvate et de glutamate semble montrer une légère augmentation de la production d' α -cétoglutarate qui pourrait indiquer que les deux voies, passant par la MAS et le Krebs, fonctionnent de concert pour générer du NADH, mais la très grande variabilité des résultats (liée au faible nombre de réplicats biologiques), ne permet pas de spéculer sur les différents flux. Ces résultats ainsi que la détection d'autres métabolites intermédiaires

du cycle de Krebs tels que le citrate, cis-aconitate, isocitrate devraient à terme permettre de discriminer l' α -cétoglutarate produit par le cycle de Krebs de celle produit par la MAS.

Dans l'*Article 2*, il a été proposé que le cycle de Krebs ne soit pas fait dans son intégralité car la respiration en PGM ne possédait pas de flux respiratoires dépendants de l'activité du complexe II. Ces résultats mettent en évidence que le cycle de Krebs peut aller au moins jusqu'à la production d' α -cétoglutarate. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle l' α -cétoglutarate pourrait être le métabolite transporté hors de la matrice pour permettre la segmentation le cycle de Krebs.

N'ayant pas eu les résultats des échantillons standards permettant de corréler le signal RMN à nos concentrations de métabolites, les corrélations entre le flux respiratoire et le flux de production des métabolites n'ont pu être réalisées.

Mes expériences démontrent cependant tout le potentiel de ce système de mitochondries isolées associé à des approches métabolomique pour l'étude du métabolisme mitochondrial et la génération de carte de flux. Beaucoup de travaux de mise au point sont encore à réaliser, mais les chemins métaboliques que nous avons définis lors de l'*Article 2* semblent bien être ceux empruntés par le métabolisme pour consommer l'oxaloacetate. Il reste encore à déterminer les proportions qu'ont ces voies dans la consommation de l'oxaloacetate, leur implication dans la production du NADH matriciel, et si d'autres voies métaboliques peuvent être impliquées dans ces conditions de respirations et de substrats.

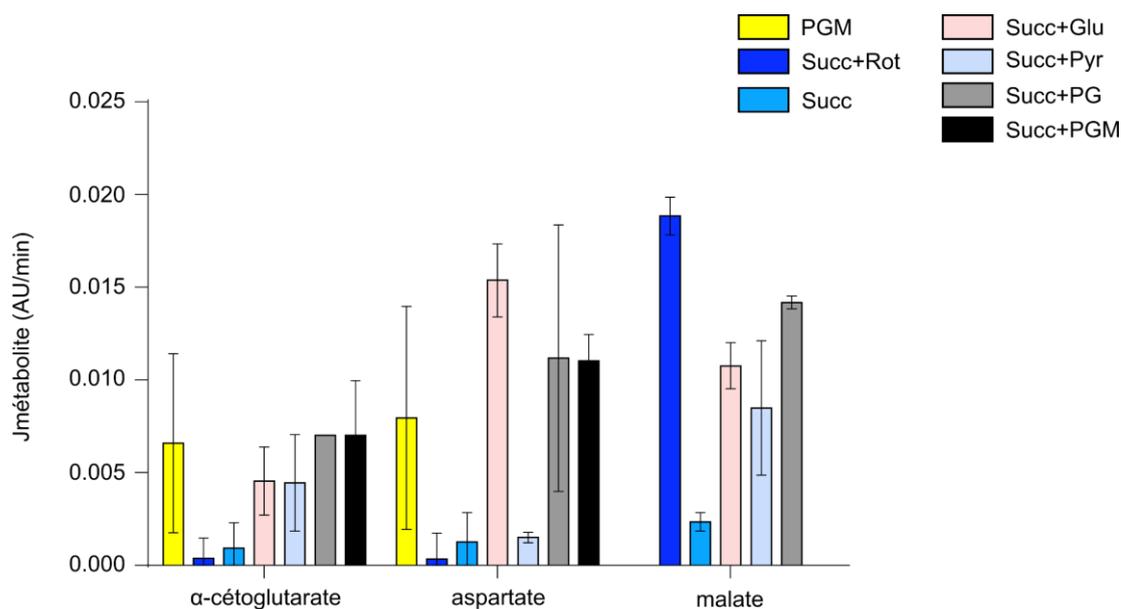


Figure 45. Mesures du flux de production de malate, d'aspartate et d' α -cétoglutarate suivant les conditions de substrats.

Les flux de production des métabolites sont mesurés par RMN 1H-1D dans des conditions de respirations découplées, suivant les conditions de substrats indiquées contenant, 10mM de pyruvate (P), 5mM de Glutamate (G), 1mM de Malate (M), 10mM de Succinate (Succ), 5mM d'ADP. (n=3)

5.2.4 Quantification des métabolites intra-mitochondriaux.

En supplément de l'étude des flux de métabolites, j'ai initié le développement d'une stratégie pour discriminer la quantité des métabolites intra-mitochondriaux de ceux extra-mitochondriaux. Le but de cette stratégie était d'appréhender les capacités d'accumulation des métabolites intra-mitochondriaux et d'observer leurs variations suivant les conditions métaboliques. En effet, l'approche utilisée pour quantifier l'oxaloacetate par activité enzymatique de *l'Article 2*, ou les métabolites du cycle de Krebs par RMN présentés dans la partie suivante (*partie 5.2.3.*) ne permet pas de différencier les métabolites intra-mitochondriaux des extra-mitochondriaux. De plus, cette approche est motivée par notre étude du métabolisme mitochondrial à travers la tissu-spécificité des mitochondries.

Les mitochondries de cœur et de foie sont très différentes notamment structurellement (*Figure 46*) (Brandt et al., 2017). Les mitochondries de cœur possèdent une grande densité de crêtes très organisées (*Figure 46A*). Les mitochondries hépatiques possèdent moins de crêtes et sont moins organisées que les mitochondries cardiaques (*Figure 46B*), mais la matrice des mitochondries de foie est décrite comme étant plus dense

et plus volumineuse que celle du cœur (Brandt et al., 2017; Griffiths and Halestrap, 1993). Ces caractéristiques des mitochondries sont très intéressantes d'un point de vue métabolique, car ces différences de volume matriciel peuvent avoir des conséquences sur la concentration matricielle des métabolites. Il a été mesuré que le volume matriciel des mitochondries de foie est de $1.06\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéines et elle est de $0.88\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéines pour des mitochondries de cœur (Devin et al., 1998; Griffiths and Halestrap, 1993). A ma connaissance, il n'existe pas dans la littérature de concentration réelle de métabolites intra-mitochondriaux spécifiques aux mitochondries de tissus. Cette information est cruciale pour pouvoir appréhender les effets des métabolites sur la régulation du métabolisme mitochondrial entre les tissus.

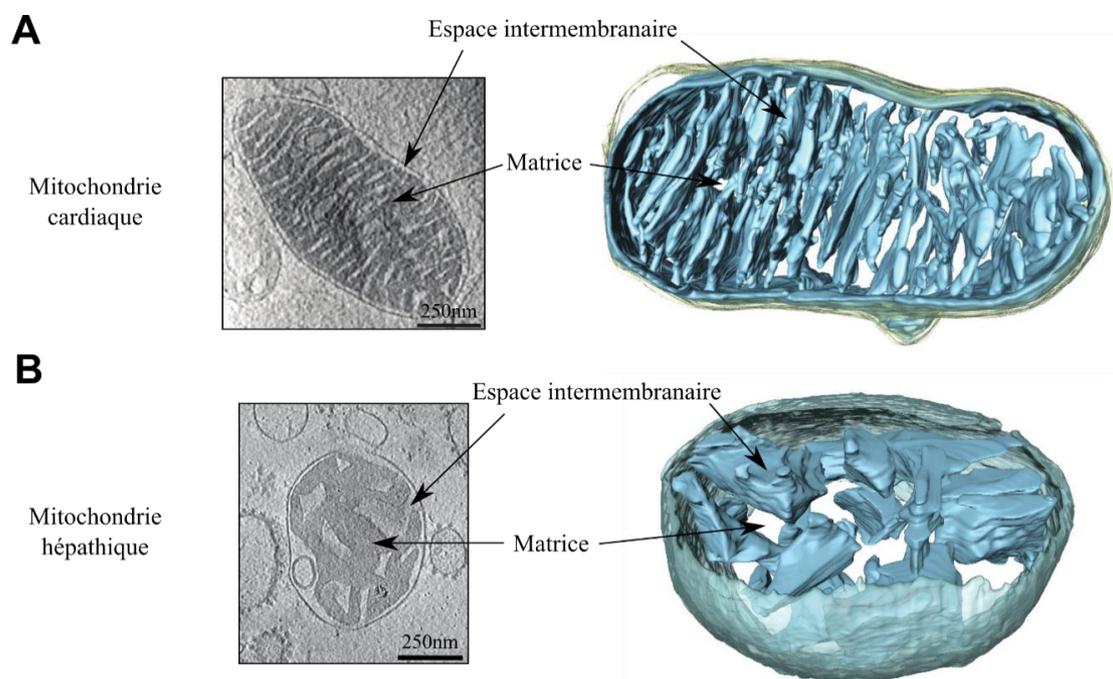


Figure 46. Architecture des mitochondries cardiaques et hépatiques (Modifiée de Brandt et al., 2017).

Images de cryo-microscopie électronique (à gauche) et de tomogramme (à droite) représentant des mitochondries (A) cardiaque et (B) hépatique.

Pour ce faire, j'ai utilisé deux approches basées sur la filtration pour séparer le milieu extra-mitochondrial et les mitochondries. La première est une filtration à l'aide de membrane de polycarbonate ou de PVDF. Il s'est avéré que le système de filtration n'était pas assez puissant pour rapidement et efficacement séparer les mitochondries du milieu extracellulaire, avec les tailles de pores utilisés pour retenir les mitochondries (pores de $0.2\mu\text{m}$). J'ai donc, par la suite, utilisé la filtration à l'aide d'huile de silicone (Devin et al.,

1998; Zuurendonk and Tager, 1974). Cette technique est notamment utilisée pour mesurer la force proton motrice (Rigoulet and Guerin, 1979). En se basant sur les différences de densité, l'utilisation de l'huile permet d'avoir trois phases : la phase supérieure, aqueuse, contenant les mitochondries et le milieu réactionnel, l'huile permettant de séparer la phase supérieure de la phase inférieure et la phase inférieure qui elle aussi est aqueuse (*voir Matériels et méthodes partie 2.2.5.4.2.2*). L'huile sert de barrière physique dans laquelle seules les mitochondries intactes auront la densité pour traverser cette couche.

La composition de la phase aqueuse présente sous l'huile peut être modulable suivant les expériences : elle est soit composée de tampon respiration (MIB), qui a une osmolarité deux fois supérieures à celle utilisée pour l'isolement des mitochondries afin qu'elle soit plus dense, soit du PCA 7%. Le MIB a été utilisé pour contrôler que les mitochondries passant la couche d'huile sont toujours intactes. Le PCA 7% est utilisé pour arrêter toutes réactions biochimiques et réaliser une extraction acide des métabolites. Plusieurs mélanges d'huile ont été réalisés pour optimiser la séparation des phases, optimiser le rendement de passage des mitochondries intactes (si la phase oléagineuse est trop dense les mitochondries ne pourront pas la passer) et obtenir la meilleure reproductibilité. Les mitochondries de cœur sont donc incubées dans un milieu réactionnel contenant différentes conditions de substrats. Une fois l'incubation terminée, une partie du milieu réactionnel est prélevée, puis est délicatement déposée sur la couche d'huile et centrifugée pour séparer les mitochondries intactes du milieu réactionnel.

Les expériences dans lesquelles la phase inférieure contenait du MIB montrent que les mitochondries ayant traversées la couche d'huile sont parfaitement intactes. Le couplage entre respirations phosphorylante et non phosphorylante est le même que les mitochondries n'étant pas passées sous huile, le rendement protéique est sensiblement le même (résultats non montrés). L'ajout de NADH et de cytochrome *c* n'induit aucune variation de flux respiratoire, ce qui permet de conclure que le passage sous huile n'induit aucune altération de la membrane externe ou interne (*Figure 47*), et ceux pour les mitochondries de cœur et de foie.

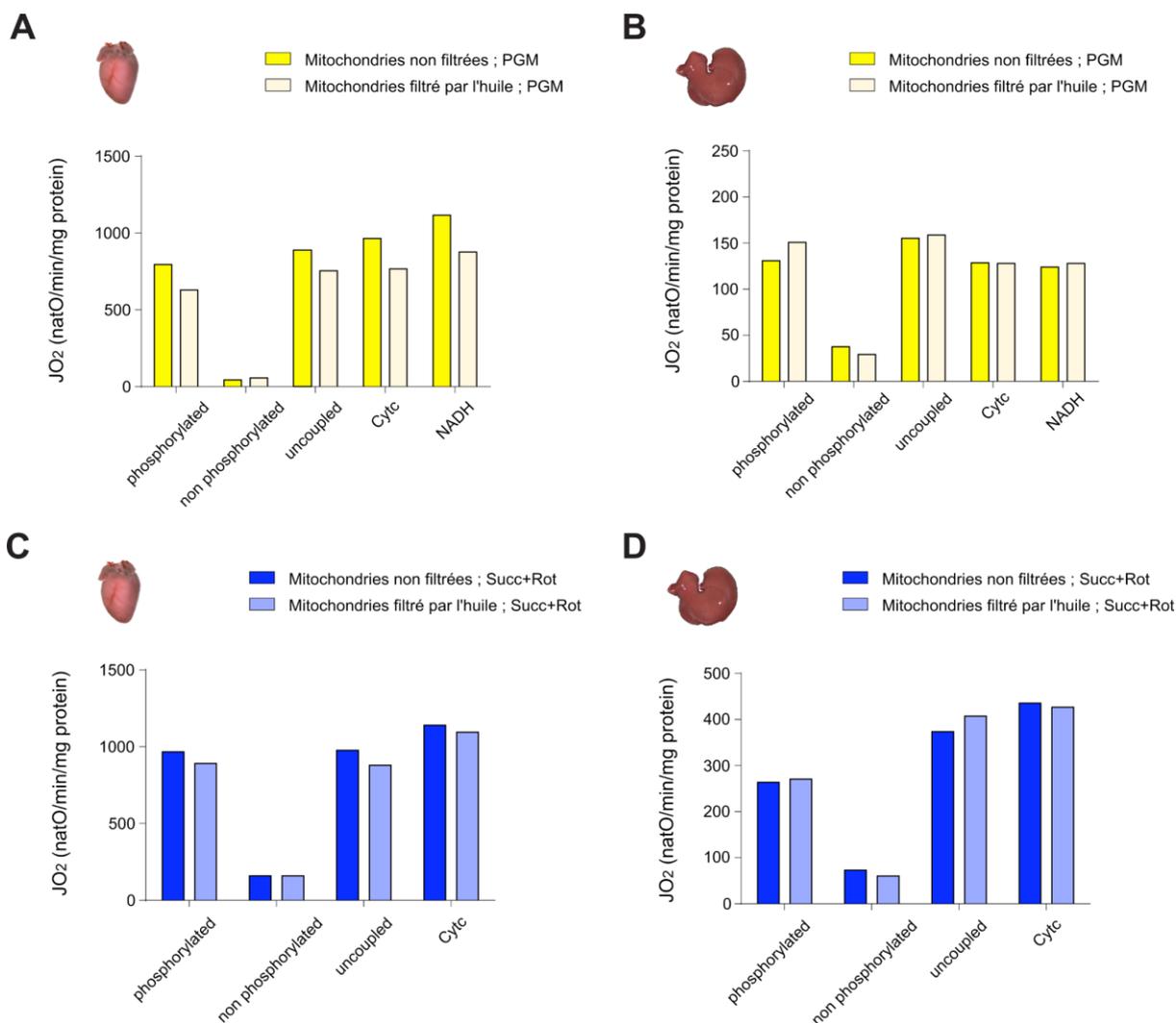


Figure 47. Contrôle de la qualité des mitochondries filtrées avec l'huile de silicone.

(A-D) Respiration de mitochondries de cœur (A-C) et de foie (B-D) en présence de PGM (en jaune) (A-B) ou de Succinate et roténone (en bleu) (C-D), suivant les différents états respiratoires. L'intégrité de la membrane externe et interne des mitochondries non filtrées (couleurs foncées) ou filtrées par l'huile (couleurs pâles) sont respectivement vérifiées par l'ajout de cytochrome *c* (62,5µg/ml) puis de NADH (1.2mM). (n=1).

Une fois les conditions de filtration mises au point, j'ai essayé de doser certains métabolites préalablement étudiés. Le premier est l'oxaloacetate avec un dosage enzymatique. Afin d'arrêter toute activité métabolique, le MIB présent sous l'huile est remplacé par du PCA 7%. Les mitochondries sont donc incubées dans les conditions de substrats, puis, les mitochondries sont filtrées grâce à l'huile et la centrifugation. Les deux phases supérieures sont ensuite enlevées et le PCA est récolté, neutralisé puis la quantité d'oxaloacetate est dosée comme décrit précédemment (*voir matériels et méthodes partie 2.2.5.4.2*). Les résultats semblent montrer que la quantité d'oxaloacetate présente dans la

matrice mitochondriale n'est détectable par notre dosage (*Figure 48*). Le dosage des métabolites par RMN est similaire, aucun métabolite intramitochondrial n'est détectable dans nos extraits (résultats non montrés).

Les concentrations de métabolites intra-mitochondriaux semblent être en dessous des limites de détection de notre dosage par activité enzymatique et de la RMN. Ces résultats, bien que très préliminaires, m'ont poussé à vouloir développer cette stratégie pour la spectrométrie de masse, notamment en utilisant le DMSO à la place du PCA7% pour quencher les activités métaboliques. Cette technique étant bien plus sensible, elle pourrait être très intéressante pour doser les métabolites. Cependant, les contraintes expérimentales dues à cette technique sont très grandes et je n'ai, à l'heure actuelle, pas réussi à rendre cette stratégie de filtration par l'huile de silicone compatible avec la spectrométrie de masse.

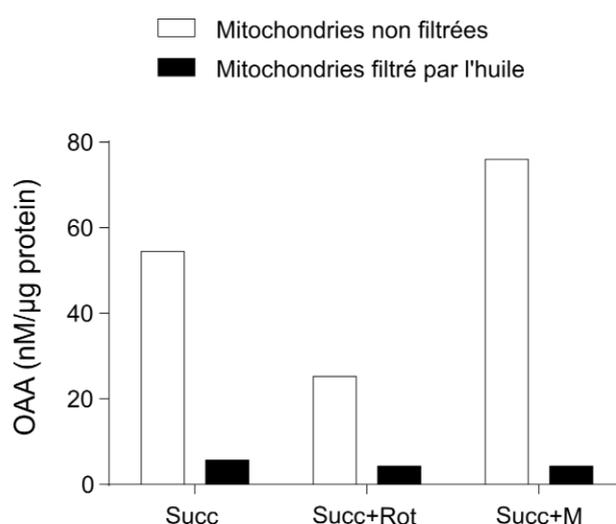


Figure 48. Quantification de l'oxaloacetate intra-mitochondrial.

En conclusion de cette partie, mes résultats démontrent que l'étude du métabolisme mitochondrial et des flux respiratoires provenant des complexes I et II sont beaucoup plus difficiles à appréhender en respirations phosphorylantes que ceux en respirations découplées. Les diverses stratégies n'ont pu aboutir à une réponse concernant le phénomène de compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire lors de conditions phosphorylantes, et ceux même si le phénomène de contrôle du complexe II par l'oxaloacetate semble être conservé. Toutefois, ces études préliminaires m'ont permis de commencer le développement des outils pour étudier le métabolisme mitochondrial matriciel. De nombreux objectifs n'ont pu être atteints et des questions restent entières :

- Est-il possible d'obtenir une concordance de flux entre flux respiratoires dépendants des complexes de la chaîne respiratoire et flux métaboliques ? Cette information permettrait de créer une carte de flux de la mitochondrie cardiaque et hépatique, ce qui faciliterait l'analyse du réseau métabolique lors de l'ajout de différents substrats, et pourrait être un outil indispensable pour comprendre intégralement les mécanismes physiopathologiques liés au métabolisme mitochondrial.
- Est-il possible d'utiliser la RMN, voire la spectrométrie de masse pour doser les métabolites produits au cours de la respiration ? Les limitations de détection engendrées par la RMN induisent une perte d'information et ne permettent d'observer que les métabolites les plus abondants, l'oxaloacetate et le citrate par exemple ne semblent pas détectables dans nos conditions par cette technique. La spectrométrie de masse, elle, est bien plus sensible, mais la présence de beaucoup de sels dans les tampons n'est pas compatible avec cette technique. Le développement de stratégies pour éliminer les sels permettrait d'avoir accès à ces métabolites peu abondants, et permettrait également de pouvoir développer des approches basées sur le marquage isotopique de carbones présents dans les métabolites. En marquant des carbones spécifiques, il sera possible de déterminer le chemin pris par les métabolites dans le réseau mitochondrial.
- Est-il possible de doser les produits des autres ubiquinones oxydoréductases du système ? En mesurant les flux de production du DHAP, ou de l'orotate par exemple, cela permettrait d'étendre l'analyse des compétitions à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire à d'autres ubiquinone oxydoréductases. Par cette approche, l'étude, avec des mitochondries isolées de différents tissus, pourrait être développée, et l'ensemble des ubiquinones pourraient être étudiées simultanément.

Conclusions générales

6 Conclusions générales.

L'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire est en pleine expansion et se poursuit depuis plus de 70 ans. L'organisation et l'impact de cette dernière est un des premiers débats qui a vu le jour dans la communauté, et qui n'a toujours pas livrée de conclusions claires. Il a été déterminé que la chaîne respiratoire était organisée en supercomplexes dans de nombreux organismes (Davies et al., 2018; Milenkovic et al., 2017; Schagger, 2000; Stroh et al., 2004). La particularité du système mammifère est que la NADH ubiquinone oxydoréductase, peut-être la déshydrogénase la plus importante de la chaîne respiratoire, est la seule déshydrogénase associée en supercomplexe (Milenkovic et al., 2017; Schagger, 2000). Ceci a débouché sur de nombreuses spéculations et modèles définissant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, dans lequel les transporteurs mobiles d'électrons sont canalisés au sein de ces structures, influençant les cinétiques et les flux d'entrée des électrons dans le système, mais également dans lesquels les supercomplexes et le complexe I pourraient jouer le rôle de plateforme pour la formation des complexes III et IV (Lapunte-Brun et al., 2013; Milenkovic et al., 2017; Moreno-Lastres et al., 2012; Schagger, 2000).

Le travail que j'ai réalisé durant ces quatre années de thèse avait pour objectif comprendre le fonctionnement de la chaîne respiratoire et de déterminer s'il dépendait de cette organisation supramoléculaire.

La première partie de ce travail a été de déterminer le rôle controversé de la protéine COX7A2L sur les supercomplexes et également d'étudier le rôle de ces derniers sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. La caractérisation des cellules KO COX7A2L a pu mettre en évidence que cette protéine était nécessaire pour l'assemblage du SC III₂-IV mais pas des respirasomes. Cette réorganisation semble avoir un impact sur la quantité du complexe III mais n'affecte pas les autres complexes de la chaîne respiratoire. La caractérisation bioénergétique de cellules perméabilisées a permis de démontrer que cette restructuration n'impactait pas les capacités de réoxydations du NADH et du succinate. Ces résultats indiquent qu'il ne semble pas y avoir de canalisation du cytochrome *c* entre les complexes III et IV, et confirment les expériences menés chez la levure (Boumans et al., 1998; Trouillard et al., 2011).

Actuellement, seul des modèles décrivant la dissociation des complexes III et IV sont répertoriés, aucun modèle ne décrit une dissociation du complexe I avec les autres complexes. L'interaction et la position entre le complexe I et III semblent être conservées au cours de l'évolution (*Figure 24*) (Davies et al., 2018), *a contrario* de la position du complexe IV qui varie beaucoup suivant les organismes. Si le complexe I a un rôle fondamental pour la formation des supercomplexes, ce modèle peut-il exister ? Un tel modèle permettrait de mettre fin au débat de la canalisation de l'ubiquinone au sein des supercomplexes à l'aide d'un modèle génétique, et permettrait de répondre à beaucoup de questions, notamment sur le rôle de ce dernier comme plateforme de maturation des complexes de la chaîne respiratoire, la production de ROS ou le couplage entre les électrons et les protons par exemple.

Mon deuxième travail de thèse, en rapport avec cette première question, reposant sur l'utilisation de mitochondries de cœur et de foie, ayant des capacités de réoxydation du NADH et Succinate opposées et possédant un complexe I associé en supercomplexe, a permis de démontrer que, sans potentiel de membrane et lorsque les complexes sont approvisionnés *ad libitum*, le complexe II était prioritaire sur le complexe I pour fournir en électrons la chaîne respiratoire. Cette expérience révèle pour la première fois un phénomène de compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire de mammifère et exclue l'hypothèse d'une canalisation de l'ubiquinone dans les supercomplexes, permettant de favoriser le flux d'électrons provenant du complexe I sur les autres enzymes non associées. Pour l'heure, aucun mécanisme ne permet de comprendre cette priorisation de l'oxydation du succinate. L'existence de différentes populations d'ubiquinones ayant des états rédox différents au sein de la membrane pourrait expliquer ce phénomène, mais cette hypothèse reste à être confirmée.

La canalisation des électrons, comme suggéré dans la littérature, devrait en théorie permettre de donner un avantage cinétique, néanmoins ceci n'est vrai que si la diffusion des métabolites est le facteur limitant de l'activité dans un système non associé. L'ensemble de mon travail de thèse semble réfuter le fonctionnement de la chaîne respiratoire comme décrit par le modèle « solid state » et le « plasticity model ». A l'heure actuelle, mes expériences n'affirment pas non plus le modèle « liquid state », mais semblent décrire que le contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire dépend de l'approvisionnement en substrats ou des contraintes thermodynamiques. Il semble que l'organisation du complexe I en supercomplexe de la chaîne respiratoire ne permet pas de favoriser le flux d'électron provenant de ce complexe, que ce soit par une canalisation direct ou par une canalisation

de proximité. Le flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire se comporte comme si les complexes étaient physiquement indépendants les uns des autres.

La deuxième et troisième partie de ma thèse reposent sur l'étude du métabolisme mitochondrial et son rôle sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ce travail m'a permis de déterminer que le flux respiratoire provenant du complexe I est grandement dépendant du malate, qui semblent être le métabolite le plus important pour la production de NADH, par MDH2 ou par son rôle de producteur d'oxaloacetate qui approvisionne des voies en aval (*Article 2 Figure 4A*). Les résultats démontrent que la priorité donnée à l'oxydation du succinate est contrebalancée par le métabolisme mitochondrial, *via* l'oxaloacetate, pour favoriser la réoxydation du NADH. Le rôle de l'oxaloacetate comme inhibiteur du complexe II (Schollmeyer and Klingenberg, 1961), ainsi que son rôle dans la MAS (Borst, 2020, 1962; LaNoue et al., 1973) sont connus depuis plusieurs dizaines d'années, cependant aucun travail n'avait corrélé son rôle d'inhibiteur du complexe II et son rôle clé dans l'approvisionnement du complexe I. Nos expériences montrent le rôle actif que pourrait avoir la MAS dans la redirection des flux métaboliques au sein de la mitochondrie lors d'un stress redox cytosolique.

Des travaux se rapprochant plus de la physiologie sont à envisager :

- 1) En réintégrant le métabolisme cellulaire dans son ensemble. En induisant un stress redox cytosolique, par inhibition des lactate déshydrogénases par exemple, l'étude des flux métaboliques provenant du cycle de krebs pourrait confirmer notre mécanisme. Cependant, en réintégrant le métabolisme cellulaire, la mesure des flux métaboliques provenant directement de la mitochondrie est compromise. En effet, avec la présence du cytoplasme, l'accumulation de certains substrats est impossible car ils sont directement convertis en une autre entité. Néanmoins, les empreintes métaboliques (concentrations à l'état stationnaire des métabolites) pourraient être des éléments permettant d'étayer notre modèle.
- 2) En étudiant l'impact de ce mécanisme dans les tissus, notamment dans le cadre de l'ischémie reperfusion. Il a été démontré que le succinate s'accumulait lors de l'ischémie. Lors de la reperfusion, un flux reverse des électrons, allant du complexe II vers le complexe I, produit des ROS qui induisent une altération du tissu cardiaque (Chouchani et al., 2014). La caractérisation du métabolisme des mitochondries cardiaques, ainsi que nos approches pourraient permettre de trouver des principes actifs pharmaco-chimiques, ou une stratégie reposant sur

le métabolisme, permettant de limiter l'accumulation de succinate ou l'activité du complexe II lors du phénomène d'ischémie-reperfusion, afin de réduire les dégâts liés au stress oxydant.

Dans le cadre de mon étude du métabolisme mitochondriale et des compétitions à l'entrée des électrons, l'utilisation de mitochondries isolées pourrait être un outil exceptionnel pour étudier les flux métaboliques et notamment ceux dépendants de l'activité du complexe I, du complexe II et de toutes les autres ubiquinone oxydoréductases du système. Cette approche rend indépendant de l'utilisation d'inhibiteurs, de leurs potentiels problèmes de spécificité, voire de l'absence d'inhibiteur spécifique. La mesure des flux métaboliques pourrait être un outil très puissant permettant de déterminer, suivant les différents tissus, (1) les voies métaboliques prioritaires, (2) les voies de production majeures de certains métabolites ou de régénération de cofacteurs comme le NADH, (3) les voies de transport de métabolites et (4) les interconnexions entre les voies métaboliques qui peuvent exister, d'un point de vue du transport à travers la membrane, à travers des régulations (inhibiteur, activateur). Ces informations seraient plus intéressantes et pertinentes d'un point de vue métabolique qu'une quantité relative de protéines ou de transcrits, notamment si les propriétés de ces enzymes diffèrent suivant les isoformes et suivant les tissus.

L'obtention des flux de production de métabolites permettraient l'obtention de cartes d'identité des mitochondries de différents tissus. Ces cartes seraient un outil pour comparer le métabolisme des mitochondries de différents organes, afin de comprendre leurs rôles et spécificités. Elles pourraient également être utiles pour le diagnostic et la compréhension de phénomènes physiopathologiques, ainsi que pour l'élaboration d'approches thérapeutiques.

7 Abréviations.

S. cerevisiae : Saccharomyces cerevisiae

CR : Chaîne respiratoire

OXPPOS : Oxydations phosphorylantes

GOT : Glutamate-oxaloacetate
transaminase

MDH : Malate déshydrogénase

MAS : navette malate/aspartate

ANT : Transporteur de nucléotides
adényliques

ADP : Adénosine di phosphate

ATP : Adénosine tri phosphate

α -KG : α -ketoglutarate

Mal : Malate

OAA : Oxaloacétate

OGC : Transporteur d'oxoglutarate

AGC : Transporteur d'aspartate et
glutamate

Ndi : NADH déshydrogénase interne

Nde : NADH déshydrogénase externe

G3PDH : Glycérol-3-phosphate
déshydrogénase

DHAP : Dihydroxyacétone phosphate

G3P : glycérol-3-phosphate

Cyt c : cytochrome c

CoQ : Coenzyme Q

PiC : Transporteur de phosphate

FMN : Flavine mononucléotide

ND : NADH déshydrogénase

SDH : Succinate déshydrogénase

FAD : Flavine adénine dinucléotide

TTFA : Thenoylfluoroacetone

AptnA5 : Apténine A5

PI : Iodure de Propidium

MIB : tampon d'isolement sucrose des
mitochondries

RB : tampon de respiration

Rot : Roténone

LBN-PAGE : Light Blue Native Poly
Acrylamide Gel

DAB : Diaminobenzidine

DHO : Dihydroorotate

ORO : Orotate

DHODH : Dihydroorotate
déshydrogénase

ETF : Electron-transferring-flavoprotein

OSCP : Oligomycin sensitivity
conferring protein

SC : Supercomplexe

COX : Cytochrome c oxydase

KO : Knock-out

AOX : Oxydase alternative

Gut2p : Glycérole-3-phosphate
mitochondriale de levure

HEK : Cellules humaines embryonnaires
de rein

Pin A : Piericidine A

DMSO : diméthylsulfoxyde

PBS : Phosphate buffer saline

KCl : Chlorure de potassium

HCl : Chlorure d'hydroxyde

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

EGTA : Acide Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetique
CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
Malo : Mévalonate
AA : Antimycine A
CI : Complexe I
CII : Complexe II
BSA : Albumine de sérum de bœuf
Pyr : Pyruvate
Glut : Glutamate
Succ : Succinate
SDS : DodécylSulfate de Sodium
TBS : Tris buffer saline

INT : Iodonitrotetrazolium formazan
PMS : Phénazine Méthosulfate
PCA : Acide perchlorique
PVDF : PolyVinylidene Fluoride
DTNB : 5,5'-dithiobis(2-acide nitrobenzoic)
TNB : 5-thio-2-nitro-benzoic acid
RMN : Résonance magnétique nucléaire
PGM : Pyruvate-Glutamate-Malate
CS : Citrate synthase
PDH : pyruvate déshydrogénase
GDH : Glutamate déshydrogénase
IDH : Isocitrate déshydrogénase
GC : Glutamate carrier

8 Bibliographie.

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Acin-Perez, R., Enriquez, J.A., 2014. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., Dynamic and ultrastructure of bioenergetic membranes and their components* 1837, 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.009>
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., Enriquez, J.A., 2008. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Agip, A.-N.A., Blaza, J.N., Bridges, H.R., Viscomi, C., Rawson, S., Muench, S.P., Hirst, J., 2018. CryoEM structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically-defined states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 548–556. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0073-1>
- Agip, A.-N.A., Blaza, J.N., Fedor, J.G., Hirst, J., 2019. Mammalian Respiratory Complex I Through the Lens of Cryo-EM. *Annu. Rev. Biophys.* 48, 165–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115704>
- Ait-El-Mkadem, S., Dayem-Quere, M., Gusic, M., Chaussenot, A., Bannwarth, S., François, B., Genin, E.C., Fragaki, K., Volker-Touw, C.L.M., Vasnier, C., Serre, V., van Gassen, K.L.I., Lespinasse, F., Richter, S., Eisenhofer, G., Rouzier, C., Mochel, F., De Saint-Martin, A., Abi Warde, M.-T., de Sain-van der Velde, M.G.M., Jans, J.J.M., Amiel, J., Avsec, Z., Mertes, C., Haack, T.B., Strom, T., Meitinger, T., Bonnen, P.E., Taylor, R.W., Gagneur, J., van Hasselt, P.M., Rötig, A., Delahodde, A., Prokisch, H., Fuchs, S.A., Paquis-Flucklinger, V., 2017. Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.014>
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrienko, T.N., Pasdois, P., Pereira, G.C., Ovens, M.J., Halestrap, A.P., 2017. The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 110, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.016>
- Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P., Brunori, M., 1993. Proton pumping by cytochrome oxidase as studied by time-resolved stopped-flow spectrophotometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5949–5953. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.5949>
- Baker, L.A., Watt, I.N., Runswick, M.J., Walker, J.E., Rubinstein, J.L., 2012. Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11675–11680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204935109>
- Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., Rosen, M.K., 2016. Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* 166, 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- Baracca, A., Gabellieri, E., Barogi, S., Solaini, G., 1995. Conformational Changes of the Mitochondrial F₁-ATPase ϵ -Subunit Induced by Nucleotide Binding as Observed

- by Phosphorescence Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 270, 21845–21851. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21845>
- Barron, J.T., Gu, L., Parrillo, J.E., 1998. Malate-Aspartate Shuttle, Cytoplasmic NADH Redox Potential, and Energetics in Vascular Smooth Muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1571–1579. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0722>
- Bartlett, K., Eaton, S., 2004. Mitochondrial β -oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271, 462–469. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x>
- Bazán, S., Mileykovskaya, E., Mallampalli, V.K.P.S., Heacock, P., Sparagna, G.C., Dowhan, W., 2013. Cardiolipin-dependent Reconstitution of Respiratory Supercomplexes from Purified *Saccharomyces cerevisiae* Complexes III and IV. *J. Biol. Chem.* 288, 401–411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425876>
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., 2001. Regulation of Cytochrome c Oxidase by Adenylic Nucleotides. Is Oxidative Phosphorylation Feedback Regulated by its End-Products? *IUBMB Life* 52, 143–152. <https://doi.org/10.1080/152165401317316545>
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.-P., Casteilla, L., Letellier, T., Rossignol, R., 2006. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 291, C1172–C1182. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00195.2006>
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L., Crofts, A.R., 2000. Structure and Function of Cytochrome bc Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 1005–1075. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.1005>
- Berry, E.A., Trumpower, B.L., 1985. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J. Biol. Chem.* 260, 2458–2467. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89576-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89576-X)
- Bianchi, C., Genova, M.L., Castelli, G.P., Lenaz, G., 2004. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly KINETIC EVIDENCE USING FLUX CONTROL ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* 279, 36562–36569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405135200>
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., Sabatini, D.M., 2015. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 162, 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>
- Blaza, J.N., Serreli, R., Jones, A.J.Y., Mohammed, K., Hirst, J., 2014. Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15735–15740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413855111>
- Borst, P., 2020. The malate–aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway. *Iubmb Life* 72, 2241–2259. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>
- Borst, P., 1962. The aerobic oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide formed by glycolysis in ehrlich ascites-tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta* 57, 270–282. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)91120-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)91120-4)
- Böttinger, L., Horvath, S.E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N., Becker, T., 2012. Phosphatidylethanolamine and Cardiolipin Differentially Affect the Stability of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Mol. Biol.* 423, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.09.001>
- Boumans, H., Grivell, L.A., Berden, J.A., 1998. The Respiratory Chain in Yeast Behaves as a Single Functional Unit. *J. Biol. Chem.* 273, 4872–4877. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.4872>

- Brandes, R., Maier, L.S., Bers, D.M., 1998. Regulation of Mitochondrial [NADH] by Cytosolic [Ca²⁺] and Work in Trabeculae From Hypertrophic and Normal Rat Hearts. *Circ. Res.* 82, 1189–1198. <https://doi.org/10.1161/01.RES.82.11.1189>
- Brandt, T., Mourier, A., Tain, L.S., Partridge, L., Larsson, N.-G., Kühlbrandt, W., 2017. Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. *eLife* 6, e24662. <https://doi.org/10.7554/eLife.24662>
- Bridges, H.R., Mohammed, K., Harbour, M.E., Hirst, J., 2017. Subunit NDUFV3 is present in two distinct isoforms in mammalian complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.12.001>
- Bultema, J.B., Braun, H.-P., Boekema, E.J., Kouřil, R., 2009. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.010>
- Bulutoglu, B., Garcia, K.E., Wu, F., Minter, S.D., Banta, S., 2016. Direct Evidence for Metabolon Formation and Substrate Channeling in Recombinant TCA Cycle Enzymes. *ACS Chem. Biol.* 11, 2847–2853. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00523>
- Bunoust, O., Devin, A., Avéret, N., Camougrand, N., Rigoulet, M., 2005. Competition of Electrons to Enter the Respiratory Chain A NEW REGULATORY MECHANISM OF OXIDATIVE METABOLISM IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *J. Biol. Chem.* 280, 3407–3413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407746200>
- Calvo, E., Cogliati, S., Hernansanz-Agustín, P., Loureiro-López, M., Guarás, A., Casuso, R.A., García-Marqués, F., Acín-Pérez, R., Martí-Mateos, Y., Silla-Castro, J., Carro-Alvarellos, M., Huertas, J.R., Vázquez, J., Enríquez, J.A., 2020. Functional role of respiratory supercomplexes in mice: SCAF1 relevance and segmentation of the Qpool. *Sci. Adv.* 6, eaba7509. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba7509>
- Cantó, C., Menzies, K.J., Auwerx, J., 2015. NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* 22, 31–53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.023>
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2003. Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria *S. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 117–126. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300014-MCP200>
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2006. Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724–32727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607135200>
- Castellana, M., Wilson, M.Z., Xu, Y., Joshi, P., Cristea, I.M., Rabinowitz, J.D., Gitai, Z., Wingreen, N.S., 2014. Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling. *Nat. Biotechnol.* 32, 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nbt.3018>
- Castellani, M., Covian, R., Kleinschroth, T., Anderka, O., Ludwig, B., Trumpower, B.L., 2010. Direct Demonstration of Half-of-the-sites Reactivity in the Dimeric Cytochrome bc₁ Complex ENZYME WITH ONE INACTIVE MONOMER IS FULLY ACTIVE BUT UNABLE TO ACTIVATE THE SECOND UBIQUINOL OXIDATION SITE IN RESPONSE TO LIGAND BINDING AT THE UBIQUINONE REDUCTION SITE. *J. Biol. Chem.* 285, 502–510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072959>
- Chance, B., Williams, G.R., 1955. A Method for the Localization of Sites for Oxidative Phosphorylation. *Nature* 176, 250–254. <https://doi.org/10.1038/176250a0>
- Chazotte, B., Hackenbrock, C., n.d. The Multicollisional, Obstructed, Long-range Diffusional Nature of Mitochondrial Electron Transport 9.

- Chen, Y.-C., Taylor, E.B., Dephoure, N., Heo, J.-M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N.C., Gygi, S.P., Rutter, J., 2012. Identification of a Protein Mediating Respiratory Supercomplex Stability. *Cell Metab.* 15, 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.006>
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., Murphy, M.P., 2014. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature13909>
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., Walker, J.E., 1994. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33, 7971–7978. <https://doi.org/10.1021/bi00191a026>
- Cooper, C.E., Brown, G.C., 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 533. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6>
- Covian, R., Kleinschroth, T., Ludwig, B., Trumpower, B.L., 2007. Asymmetric Binding of Stigmatellin to the Dimeric *Paracoccus denitrificans* bc1 Complex: EVIDENCE FOR ANTI-COOPERATIVE UBIQUINOL OXIDATION AND COMMUNICATION BETWEEN CENTER P UBIQUINOL OXIDATION SITES*. *J. Biol. Chem.* 282, 22289–22297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702132200>
- Covian, R., Trumpower, B.L., 2008. Regulatory interactions in the dimeric cytochrome bc1 complex: The advantages of being a twin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1777, 1079–1091. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.022>
- Covian, R., Trumpower, B.L., 2005. Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc1 complex dimer is reduced through center N. *J. Biol. Chem.* 280, 22732–22740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413592200>
- Crane, F.L., Beinert, H., 1956. On the Mechanism of Dehydrogenation of Fatty Acyl Derivatives of Coenzyme a II. the Electron-Transferring Flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 218, 717–731.
- Crofts, A.R., 2004. The Cytochrome bc1 Complex: Function in the Context of Structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 689–733. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251>
- Dasika, S.K., Vinnakota, K.C., Beard, D.A., 2015. Characterization of the Kinetics of Cardiac Cytosolic Malate Dehydrogenase and Comparative Analysis of Cytosolic and Mitochondrial Isoforms. *Biophys. J.* 108, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.3466>
- Davies, K.M., Blum, T.B., Kühlbrandt, W., 2018. Conserved in situ arrangement of complex I and III2 in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3024–3029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720702115>
- Davies, K.M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J.H., Osiewacz, H.D., Rycovska, A., Zickermann, V., Kühlbrandt, W., 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14121–14126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103621108>

- Desmurs, M., Foti, M., Raemy, E., Vaz, F.M., Martinou, J.-C., Bairoch, A., Lane, L., 2015. C11orf83, a Mitochondrial Cardiolipin-Binding Protein Involved in bc1 Complex Assembly and Supercomplex Stabilization. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1139–1156. <https://doi.org/10.1128/MCB.01047-14>
- Devin, A., Bouchez, C., Molinié, T., David, C., Duvezin-Caubet, S., Rojo, M., Mourier, A., Averet, N., Rigoulet, M., 2019. Chapter 1 - Mitochondria: Ultrastructure, Dynamics, Biogenesis and Main Functions, in: Morio, B., Pénicaud, L., Rigoulet, M. (Eds.), *Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes*. Academic Press, pp. 3–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811752-1.00001-8>
- Devin, A., Espié, P., Guérin, B., Rigoulet, M., 1998. Energetics of swelling in isolated hepatocytes: A comprehensive study. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 107–121. <https://doi.org/10.1023/A:1006847214074>
- Doenst, T., Nguyen, T.D., Abel, E.D., 2013. Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 113, 709–724. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>
- Dolce, V., Cappello, A.R., Capobianco, L., 2014. Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate–Tricarboxylate carriers: from animals to plants. *IUBMB Life* 66, 462–471. <https://doi.org/10.1002/iub.1290>
- Dörner, A., Olesch, M., Giessen, S., Pauschinger, M., Schultheiss, H.-P., 1999. Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1417, 16–24. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00245-4)
- Dudek, J., Cheng, I.-F., Balleininger, M., Vaz, F.M., Streckfuss-Bömeke, K., Hübscher, D., Vukotic, M., Wanders, R.J.A., Rehling, P., Guan, K., 2013. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res.* 11, 806–819. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.05.005>
- Dudek, J., Cheng, I.-F., Chowdhury, A., Wozny, K., Balleininger, M., Reinhold, R., Grunau, S., Callegari, S., Toischer, K., Wanders, R.J., Hasenfuß, G., Brügger, B., Guan, K., Rehling, P., 2016. Cardiac-specific succinate dehydrogenase deficiency in Barth syndrome. *EMBO Mol. Med.* 8, 139–154. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505644>
- Dudkina, N.V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H.-P., Boekema, E.J., 2010. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 16th European Bioenergetics Conference 2010 1797, 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>
- Eaton, S., Bhuiyan, A.K., Kler, R.S., Turnbull, D.M., Bartlett, K., 1993. Intramitochondrial control of the oxidation of hexadecanoate in skeletal muscle. A study of the acyl-CoA esters which accumulate during rat skeletal-muscle mitochondrial beta-oxidation of [U-14C]hexadecanoate and [U-14C]hexadecanoyl-carnitine. *Biochem. J.* 289, 161–168.
- El-Khoury, R., Dufour, E., Rak, M., Ramanantsoa, N., Grandchamp, N., Csaba, Z., Duvillié, B., Bénit, P., Gallego, J., Gressens, P., Sarkis, C., Jacobs, H.T., Rustin, P., 2013. Alternative Oxidase Expression in the Mouse Enables Bypassing Cytochrome c Oxidase Blockade and Limits Mitochondrial ROS Overproduction. *PLOS Genet.* 9, e1003182. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003182>
- Fang, H., Ye, X., Xie, J., Li, Y., Li, H., Bao, X., Yang, Yue, Lin, Z., Jia, M., Han, Q., Zhu, J., Li, X., Zhao, Q., Yang, Yanling, Lyu, J., 2021. A membrane arm of mitochondrial complex I sufficient to promote respirasome formation. *Cell Rep.* 35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108963>

- Fedor, J.G., Hirst, J., 2018. Mitochondrial Supercomplexes Do Not Enhance Catalysis by Quinone Channeling. *Cell Metab.* 28, 525-531.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.024>
- Feichtinger, R.G., Brunner-Krainz, M., Alhaddad, B., Wortmann, S.B., Kovacs-Nagy, R., Stojakovic, T., Erwa, W., Resch, B., Windischhofer, W., Verheyen, S., Uhrig, S., Windpassinger, C., Locker, F., Makowski, C., Strom, T.M., Meitinger, T., Prokisch, H., Sperl, W., Haack, T.B., Mayr, J.A., 2017. Combined Respiratory Chain Deficiency and UQCC2 Mutations in Neonatal Encephalomyopathy: Defective Supercomplex Assembly in Complex III Deficiencies [WWW Document]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2017/7202589>
- Fernández-Vizarra, E., Zeviani, M., 2015. Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front. Genet.* 6, 134. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00134>
- FERSHT, A., 1999. Structure and Mechanism in Protein Science. Guide Enzyme Catal. Protein Fold.
- Fink, B.D., Bai, F., Yu, L., Sheldon, R.D., Sharma, A., Taylor, E.B., Sivitz, W.I., 2018. Oxaloacetic acid mediates ADP-dependent inhibition of mitochondrial complex II-driven respiration. *J. Biol. Chem.* 293, 19932–19941. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005144>
- Fitton, V., Rigoulet, M., Ouhabi, R., Guerin, B., 1994. Mechanistic Stoichiometry of Yeast Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochemistry* 33, 9692–9698. <https://doi.org/10.1021/bi00198a039>
- Fornier, F., Foster, L.J., Campanaro, S., Valle, G., Mann, M., 2006. Quantitative Proteomic Comparison of Rat Mitochondria from Muscle, Heart, and Liver *. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 608–619. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500298-MCP200>
- Frank, V., Kadenbach, B., 1996. Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Lett.* 382, 121–124. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00096-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00096-8)
- Frigerio, F., Casimir, M., Carobbio, S., Maechler, P., 2008. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 15th European Bioenergetics Conference 2008 1777, 965–972. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.04.031>
- Fry, M., Green, D.E., 1981. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 256, 1874–1880. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69888-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69888-1)
- Fuhrmann, D.C., Wittig, I., Dröse, S., Schmid, T., Dehne, N., Brüne, B., 2018. Degradation of the mitochondrial complex I assembly factor TMEM126B under chronic hypoxia. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3051–3067. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2779-y>
- Fuller, G.G., Kim, J.K., 2021. Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *J. Cell Sci.* 134, jcs258469. <https://doi.org/10.1242/jcs.258469>
- Galkin, A. s., Grivennikova, V. g., Vinogradov, A. d., 1999. →H⁺/2e stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett.* 451, 157–161. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00575-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00575-X)
- Gnaiger, E., 2009. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: New perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol., Mitochondrial Dynamics and Function in Biology and Medicine* 41, 1837–1845. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.013>

- Gohil, V.M., Hayes, P., Matsuyama, S., Schägger, H., Schlame, M., Greenberg, M.L., 2004. Cardiolipin Biosynthesis and Mitochondrial Respiratory Chain Function Are Interdependent *. *J. Biol. Chem.* 279, 42612–42618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402545200>
- Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R., Wallace, D.C., 1997. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.* 16, 226–234. <https://doi.org/10.1038/ng0797-226>
- Green, D.E., 1936. α -Glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 30, 629–644.
- Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S.S., Lagarrigue, S., Broskey, N.T., Boutant, M., Wang, X., Conde Alonso, S., Ofori, E., Auwerx, J., Cantó, C., Amati, F., 2017. Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 25, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.004>
- Griffiths, E.J., Halestrap, A.P., 1993. Pyrophosphate metabolism in the perfused heart and isolated heart mitochondria and its role in regulation of mitochondrial function by calcium. *Biochem. J.* 290, 489–495. <https://doi.org/10.1042/bj2900489>
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., Yang, M., 2016. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 537, 639–643. <https://doi.org/10.1038/nature19359>
- Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., Yang, M., 2019. Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF 9.
- Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Huynen, M.A., Arnold, S., 2017. Identification and evolutionary analysis of tissue-specific isoforms of mitochondrial complex I subunit NDUFV3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1858, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.12.004>
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., Yang, M., 2017. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell* 170, 1247–1257.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>
- Gupte, S., Wu, E.S., Hoehli, L., Hoehli, M., Jacobson, K., Sowers, A.E., Hackenbrock, C.R., 1984. Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2606–2610.
- Hackenbrock, C.R., 1966. ULTRASTRUCTURAL BASES FOR METABOLICALLY LINKED MECHANICAL ACTIVITY IN MITOCHONDRIA. *J. Cell Biol.* 30, 269–297.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., Gupte, S.S., 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331–368. <https://doi.org/10.1007/BF00743010>
- Hägerhäll, C., 1997. Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1320, 107–141. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)
- Hanske, J., Toffey, J.R., Morenz, A.M., Bonilla, A.J., Schiavoni, K.H., Pletneva, E.V., 2012. Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 125–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108>
- Harbauer, A.B., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Pfanner, N., Meisinger, C., 2014. The Protein Import Machinery of Mitochondria—A Regulatory Hub in Metabolism, Stress, and Disease. *Cell Metab.* 19, 357–372. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.010>

- Hartley, A.M., Lukoyanova, N., Zhang, Y., Cabrera-Orefice, A., Arnold, S., Meunier, B., Pinotsis, N., Maréchal, A., 2019. Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 78–83. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0172-z>
- Hayes, D.J., Taylor, D.J., Bore, P.J., Hilton-Jones, D., Arnold, D.L., Squier, M.V., Gent, A.E., Radda, G.K., 1987. An unusual metabolic myopathy: a malate—aspargate shuttle defect. *J. Neurol. Sci.* 82, 27–39. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90004-9)
- He, J., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M., Montgomery, M.G., Walker, J.E., 2020. Assembly of the peripheral stalk of ATP synthase in human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 29602–29608. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017987117>
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Dröse, S., Schwamb, B., Zörnig, M., Reichert, A.S., Koch, I., Wittig, I., Brandt, U., 2012. Complexome Profiling Identifies TMEM126B as a Component of the Mitochondrial Complex I Assembly Complex. *Cell Metab.* 16, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.009>
- Hiltunen, J.K., Chen, Z., Haapalainen, A.M., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., 2010. Mitochondrial fatty acid synthesis – An adopted set of enzymes making a pathway of major importance for the cellular metabolism. *Prog. Lipid Res.* 49, 27–45. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.001>
- Hinkle, P.C., 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1706, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.004>
- Hirst, J., 2018. Open questions: respiratory chain supercomplexes—why are they there and what do they do? *BMC Biol.* 16, 111. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0577-5>
- Hirst, J., Roessler, M.M., 2016. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1857, 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.009>
- Höchli, M., Höchli, L., Hackenbrock, C.R., 1985. Independent lateral diffusion of cytochrome bc₁ complex and cytochrome oxidase in the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Cell Biol.* 38, 1–5.
- Hock, D.H., Reljic, B., Ang, C.-S., Muellner-Wong, L., Mountford, H.S., Compton, A.G., Ryan, M.T., Thorburn, D.R., Stroud, D.A., 2020. HIGD2A is Required for Assembly of the COX3 Module of Human Mitochondrial Complex IV. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 1145–1160. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002076>
- Holt, P.J., Morgan, D.J., Sazanov, L.A., 2003. The Location of NuoL and NuoM Subunits in the Membrane Domain of the Escherichia coli Complex I: IMPLICATIONS FOR THE MECHANISM OF PROTON PUMPING *. *J. Biol. Chem.* 278, 43114–43120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308247200>
- Horvath, S.E., Daum, G., 2013. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* 52, 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
- Houštěk, J., Cannon, B., Lindberg, O., 1975. Glycerol-3-Phosphate Shuttle and Its Function in Intermediary Metabolism of Hamster Brown-Adipose Tissue. *Eur. J. Biochem.* 54, 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04107.x>
- Hyman, A.A., Weber, C.A., Jülicher, F., 2014. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
- Ingwall, J.S., 2002. *ATP and the Heart, Basic Science for the Cardiologist.* Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1093-2>
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine

- Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *Science* 281, 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>
- Janssen, R.J.R.J., Nijtmans, L.G., Heuvel, L.P. van den, Smeitink, J.A.M., 2006. Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 499–515. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0362-4>
- Jorfeldt, L., Juhlin-Dannfelt, A., Karlsson, J., 1978. Lactate release in relation to tissue lactate in human skeletal muscle during exercise. *J. Appl. Physiol.* 44, 350–352. <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.44.3.350>
- Kadenbach, B., 2017. Regulation of Mammalian 13-Subunit Cytochrome c Oxidase and Binding of other Proteins: Role of NDUFA4. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.003>
- Kadenbach, B., 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1604, 77–94. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00027-6)
- Kadenbach, B., Hüttemann, M., 2015. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 24, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.07.002>
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Vogt, S., 2013. High efficiency versus maximal performance — The cause of oxidative stress in eukaryotes: A hypothesis. *Mitochondrion* 13, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.11.005>
- Kaila, V.R.I., Wikström, M., 2021. Architecture of bacterial respiratory chains. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 319–330. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4>
- Kappler, L., Hoene, M., Hu, C., von Toerne, C., Li, J., Bleher, D., Hoffmann, C., Böhm, A., Kollipara, L., Zischka, H., Königsrainer, A., Häring, H.-U., Peter, A., Xu, G., Sickmann, A., Hauck, S.M., Weigert, C., Lehmann, R., 2019. Linking bioenergetic function of mitochondria to tissue-specific molecular fingerprints. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 317, E374–E387. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00088.2019>
- Kastritis, P.L., Gavin, A.-C., 2018. Enzymatic complexes across scales. *Essays Biochem.* 62, 501–514. <https://doi.org/10.1042/EBC20180008>
- Koene, S., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Willemsen, M. a. a. P., Sperl, W., Laugel, V., Ostergaard, E., Tarnopolsky, M., Martin, M.A., Nesbitt, V., Fletcher, J., Edvardson, S., Procaccio, V., Slama, A., van den Heuvel, L.P.W.J., Smeitink, J. a. M., 2012. Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 737–747. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9492-z>
- Korla, K., Vadlakonda, L., Mitra, C.K., 2015. Kinetic simulation of malate-aspartate and citrate-pyruvate shuttles in association with Krebs cycle. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 2390–2403. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.1003603>
- Kovářová, N., Mráček, T., Nůsková, H., Holzerová, E., Vrbacký, M., Pecina, P., Hejzlarová, K., Klůčková, K., Rohlena, J., Neuzil, J., Houštek, J., 2013. High Molecular Weight Forms of Mammalian Respiratory Chain Complex II. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071869>
- Koza, R.A., Kozak, U.C., Brown, L.J., Leiter, E.H., Macdonald, M.J., Kozak, L.P., 1996. Sequence and Tissue-Dependent RNA Expression of Mouse FAD-Linked Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 97–104. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0536>
- Krab, K., Wikström, M., 1986. Determination of the stoichiometry of redox-linked proton translocation from the kinetics of pulse experiments: A simulation study. *FEBS Lett.* 201, 198–204. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80608-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80608-1)

- Krämer, R., 1996. Structural and functional aspects of the phosphate carrier from mitochondria. *Kidney Int.* 49, 947–952. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.133>
- Kranz, R.G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S., Frawley, E.R., 2009. Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 73, 510–528. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-09>
- KrÖGER, A., Klingenberg, M., 1973. The Kinetics of the Redox Reactions of Ubiquinone Related to the Electron-Transport Activity in the Respiratory Chain. *Eur. J. Biochem.* 34, 358–368. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02767.x>
- Kumar, V., Santhosh Kumar, T.R., Kartha, C.C., 2019. Mitochondrial membrane transporters and metabolic switch in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 24, 255–267. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9756-2>
- LaNoue, K., Wałajtyś-Rode, E., Williamson, J., 1973. Regulation of glutamate metabolism and interactions with citric acid cycle in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 248, 7171–7183. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43375-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43375-9)
- LaNoue, K.F., Schoolwerth, A.C., 1979. Metabolite Transport in Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 871–922. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.004255>
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., Enríquez, J.A., 2013. Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science* 340, 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Lee, I., Kadenbach, B., 2001. Palmitate decreases proton pumping of liver-type cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 6329–6334. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02602.x>
- Letts, J.A., Fiedorczuk, K., Degliesposti, G., Skehel, M., Sazanov, L.A., 2019. Structures of Respiratory Supercomplex I+III₂ Reveal Functional and Conformational Crosstalk. *Mol. Cell* 75, 1131–1146.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.022>
- Letts, J.A., Fiedorczuk, K., Sazanov, L.A., 2016. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 537, 644–648. <https://doi.org/10.1038/nature19774>
- Letts, J.A., Sazanov, L.A., 2017. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>
- Liesa, M., Qiu, W., Shirihai, O.S., 2012. Mitochondrial ABC transporters function: The role of ABCB10 (ABC-me) as a novel player in cellular handling of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 1945–1957. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.013>
- Liu, F., Lössl, P., Rabbitts, B.M., Balaban, R.S., Heck, A.J.R., 2018. The interactome of intact mitochondria by cross-linking mass spectrometry provides evidence for coexisting respiratory supercomplexes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 17, 216–232. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000470>
- Liu, S., Neidhardt, E.A., Grossman, T.H., Ocain, T., Clardy, J., 2000. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure* 8, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00077-0)
- Lobo-Jarne, T., Nývltová, E., Pérez-Pérez, R., Timón-Gómez, A., Molinié, T., Choi, A., Mourier, A., Fontanesi, F., Ugalde, C., Barrientos, A., 2018. Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization

- Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics. *Cell Rep.* 25, 1786-1799.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.058>
- Lobo-Jarne, T., Ugalde, C., 2018. Respiratory Chain Supercomplexes: Structures, Function and Biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.021>
- Löffler, M., Becker, C., Wegerle, E., Schuster, G., 1996. Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochem. Cell Biol.* 105, 119–128. <https://doi.org/10.1007/BF01696151>
- Löffler, M., Jöckel, J., Schuster, G., 1997. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 125–129. <https://doi.org/10.1023/A:1006859115450>
- Lynen, F., n.d. *Lipide Metabolism* 36.
- Magalon, A., Arias-Cartin, R., Walburger, A., 2012. Chapter Six - Supramolecular Organization in Prokaryotic Respiratory Systems, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology, Advances in Bacterial Respiratory Physiology*. Academic Press, pp. 217–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00006-8>
- Mansilla, N., Racca, S., Gras, D.E., Gonzalez, D.H., Welchen, E., 2018. The Complexity of Mitochondrial Complex IV: An Update of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 662. <https://doi.org/10.3390/ijms19030662>
- McLaughlin, K.L., Hagen, J.T., Coalson, H.S., Nelson, M.A.M., Kew, K.A., Wooten, A.R., Fisher-Wellman, K.H., 2020. Novel approach to quantify mitochondrial content and intrinsic bioenergetic efficiency across organs. *Sci. Rep.* 10, 17599. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74718-1>
- Milenkovic, D., Blaza, J.N., Larsson, N.-G., Hirst, J., 2017. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metab.* 25, 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009>
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., 2014. Cardiolipin-Dependent Formation of Mitochondrial Respiratory Supercomplexes. *Chem. Phys. Lipids* 179, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012>
- Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Miyoshi, H., Osanai, A., Kita, K., Ōmura, S., 2003. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 473–477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237315100>
- Molinié, T., Cougouilles, E., David, C., Cahoreau, E., Portais, J.-C., Mourier, A., 2022. MDH2 produced OAA is a metabolic switch rewiring the fuelling of respiratory chain and TCA cycle. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1863, 148532. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148532>
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M.A., Arenas, J., Barrientos, A., Ugalde, C., 2012. Mitochondrial Complex I plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly. *Cell Metab.* 15, 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.015>
- Mourier, A., Devin, A., Rigoulet, M., 2010. Active proton leak in mitochondria: A new way to regulate substrate oxidation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1797, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.10.011>
- Mourier, A., Larsson, N.-G., 2011. Tracing the Trail of Protons through Complex I of the Mitochondrial Respiratory Chain. *PLoS Biol.* 9, e1001129. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001129>

- Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N.-G., Milenkovic, D., 2014a. The Respiratory Chain Supercomplex Organization Is Independent of COX7a2l Isoforms. *Cell Metab.* 20, 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.005>
- Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Kühlbrandt, W., Larsson, N.-G., 2014b. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2580–2592. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt652>
- Mráček, T., Drahota, Z., Houštěk, J., 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>
- Müller, C.S., Bildl, W., Haupt, A., Ellenrieder, L., Becker, T., Hunte, C., Fakler, B., Schulte, U., 2016. Cryo-slicing Blue Native-Mass Spectrometry (csBN-MS), a Novel Technology for High Resolution Complexome Profiling*. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 669–681. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054080>
- Nakamoto, R.K., Scanlon, J.A.B., Al-Shawi, M.K., 2008. The Rotary Mechanism of the ATP Synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.004>
- Napiwotzki, J., Kadenbach, B., 1998. Extramitochondrial ATP/ADP-Ratios Regulate Cytochrome c Oxidase Activity via Binding to the Cytosolic Domain of Subunit IV. *Biol. Chem.* 379, 335–340. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.3.335>
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., n.d. *Bioenergetics - 4th Edition* [WWW Document]. URL <https://www.elsevier.com/books/bioenergetics/nicholls/978-0-12-388425-1> (accessed 10.5.21).
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., 1997. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* 386, 299–302. <https://doi.org/10.1038/386299a0>
- Ohkawa, K.-I., Vogt, M.T., Farber, E., 1969. UNUSUALLY HIGH MITOCHONDRIAL ALPHA GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT BROWN ADIPOSE TISSUE. *J. Cell Biol.* 41, 441–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.2.441>
- Omini, J., Wojciechowska, I., Skiryecz, A., Moriyama, H., Obata, T., 2021. Association of the malate dehydrogenase-citrate synthase metabolon is modulated by intermediates of the Krebs tricarboxylic acid cycle. *Sci. Rep.* 11, 18770. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98314-z>
- Ovádi, J., Srerret, P.A., 1999. Macromolecular Compartmentation and Channeling, in: Walter, H., Brooks, D.E., Srere, P.A. (Eds.), *International Review of Cytology, Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm*. Academic Press, pp. 255–280. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60529-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60529-X)
- Påhlman, I., Larsson, C., Averét, N., Bunoust, O., Boubekour, S., Gustafsson, L., Rigoulet, M., 2002. Kinetic Regulation of the Mitochondrial Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by the External NADH Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 27991–27995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204079200>
- Påhlman, I.-L., Gustafsson, L., Rigoulet, M., Larsson, C., 2001. Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 611–620. <https://doi.org/10.1002/yea.709>
- Palma, A.D., Prezioso, G., Spagnoletta, A., Genchi, G., Scalera, V., 2010. The oxoglutarate/malate carrier of rat brain mitochondria operates by a uniport exchange mechanism. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 371–379. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9308-5>

- Palmieri, F., Monné, M., 2016. Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, Channels and transporters in cell metabolism 1863, 2362–2378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.03.007>
- Palmieri, F., Scarcia, P., Monné, M., 2020. Diseases Caused by Mutations in Mitochondrial Carrier Genes SLC25: A Review. *Biomolecules* 10, 655. <https://doi.org/10.3390/biom10040655>
- Panteghini, M., 1990. Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin. Biochem.*, NACB 13th Annual Symposium: Diagnostic Applications of Nucleic Acid Probes in the Clinical Laboratory 23, 311–319. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(90\)80062-N](https://doi.org/10.1016/0009-9120(90)80062-N)
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G., 2014. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, Dynamic and ultrastructure of bioenergetic membranes and their components 1837, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.10.006>
- Paynter, K.T., Hoffmann, R.J., Ellis, L.L., Bishop, S.H., 1984. Partial characterization of the cytosolic and mitochondrial aspartate aminotransferase from ribbed mussel gill tissue. *J. Exp. Zool.* 231, 185–197. <https://doi.org/10.1002/jez.1402310204>
- Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Milenkovic, D., Mourier, A., Bratic, A., García-Bartolomé, A., Fernández-Vizarrá, E., Cadenas, S., Delmiro, A., García-Consuegra, I., Arenas, J., Martín, M.A., Larsson, N.-G., Ugalde, C., 2016. COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Rep.* 16, 2387–2398. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.081>
- Petersen, J., Förster, K., Turina, P., Gräber, P., 2012. Comparison of the H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATP synthases from yeast and from chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11150–11155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202799109>
- Pfaff, E., Klingenberg, M., 1968. Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 6, 66–79. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00420.x>
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Schägger, H., 2003. Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873–52880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>
- Pietrobon, D., Zoratti, M., Azzone, G.F., 1983. Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 723, 317–321. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(83\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90131-7)
- Pilet, E., Jasaitis, A., Liebl, U., Vos, M.H., 2004. Electron transfer between hemes in mammalian cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16198–16203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405032101>
- Protasoni, M., Pérez-Pérez, R., Lobo-Jarne, T., Harbour, M.E., Ding, S., Peñas, A., Diaz, F., Moraes, C.T., Fearnley, I.M., Zeviani, M., Ugalde, C., Fernández-Vizarrá, E., 2020. Respiratory supercomplexes act as a platform for complex III-mediated maturation of human mitochondrial complexes I and IV. *EMBO J.* 39, e102817. <https://doi.org/10.15252/emj.2019102817>
- Protasoni, M., Zeviani, M., 2021. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 586. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>
- Purvis, J.L., Lowenstein, J.M., 1961. The Relation between Intra- and Extramitochondrial Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 236, 2794–2803. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61739-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61739-4)
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High

- Rates in Both the Forward and Reverse Reactions*. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>
- Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., Brand, M.D., 2013. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 1, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>
- Rabinowitz, J.D., Enerbäck, S., 2020. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat. Metab.* 2, 566–571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Rak, M., Bénit, P., Chrétien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., El-Khoury, R., Tzagoloff, A., Rustin, P., 2016. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 130, 393–407. <https://doi.org/10.1042/CS20150707>
- Rigoulet, M., Guerin, B., 1979. Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: Effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett.* 102, 18–22. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80919-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80919-9)
- Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R., Guérin, B., 1998. Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: Dependence upon both fluxes and forces. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 35–52. <https://doi.org/10.1023/A:1006858104988>
- Rigoulet, M., Mourier, A., Galinier, A., Casteilla, L., Devin, A., 2010. Electron competition process in respiratory chain: Regulatory mechanisms and physiological functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 16th European Bioenergetics Conference 2010 1797, 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.030>
- Robinson, B.H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J.R., Wallace, D.C., 1992. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 48, 122–126. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(92\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0885-4505(92)90056-5)
- Robinson, J.B., Inman, L., Sumegi, B., Srere, P.A., 1987. Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *J. Biol. Chem.* 262, 1786–1790.
- Rutter, J., Winge, D.R., Schiffman, J.D., 2010. Succinate Dehydrogenase—Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Mitochondrion* 10, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001>
- Safer, B., Smith, C.M., Williamson, J.R., 1971. Control of the transport of reducing equivalents across the mitochondrial membrane in perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2, 111–124. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(71\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(71)90065-4)
- Sakuda, S., Prabowo, D.F., Takagi, K., Shiomi, K., Mori, M., Ōmura, S., Nagasawa, H., 2014. Inhibitory Effects of Respiration Inhibitors on Aflatoxin Production. *Toxins* 6, 1193–1200. <https://doi.org/10.3390/toxins6041193>
- Saraste, M., Penttilä, T., Wikström, M., 1981. Quaternary Structure of Bovine Cytochrome Oxidase. *Eur. J. Biochem.* 115, 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05232.x>
- Satrústegui, J., Pardo, B., del Arco, A., 2007. Mitochondrial Transporters as Novel Targets for Intracellular Calcium Signaling. *Physiol. Rev.* 87, 29–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2006>
- Schagger, H., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Schägger, H., Coo, R. de, Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., Brandt, U., 2004. Significance of Respirasomes for the Assembly/Stability of Human Respiratory Chain Complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349–36353. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404033200>
- Schagger, H., Cramer, W.A., Vonjagow, G., 1994. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and

- Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>
- Schägger, H., Pfeiffer, K., 2001. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I, II, III, IV, and V in bovine heart mitochondria, and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M106474200>
- Schägger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Schlame, M., 2021. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1862, 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148305>
- Schneider, H., Höchli, M., Hackenbrock, C.R., 1982. Relationship between the density distribution of intramembrane particles and electron transfer in the mitochondrial inner membrane as revealed by cholesterol incorporation. *J. Cell Biol.* 94, 387–393. <https://doi.org/10.1083/jcb.94.2.387>
- Schollmeyer, P., Klingenberg, M., 1961. Oxaloacetate and adenosinetriphosphate levels during inhibition and activation of succinate oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 43–47. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90252-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90252-2)
- Schwall, C.T., Greenwood, V.L., Alder, N.N., 2012. The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1817, 1588–1596. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.015>
- Soderberg, K., Nissinen, E., Bakay, B., Scheffler, I.E., 1980. The energy charge in wild-type and respiration-deficient chinese hamster cell mutants. *J. Cell. Physiol.* 103, 169–172. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041030121>
- Sousa, J.S., Mills, D.J., Vonck, J., Kühlbrandt, W., n.d. Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.21290>
- Sowers, A.E., Hackenbrock, C.R., 1981. Rate of lateral diffusion of intramembrane particles: measurement by electrophoretic displacement and rerandomization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6246–6250. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6246>
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., Stuart, R.A., 2012. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1363–1373. <https://doi.org/10.1128/MCB.06369-11>
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., Schägger, H., 2004. Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase Supercomplex Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* 279, 5000–5007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309505200>
- Stroud, D.A., Surgenor, E.E., Formosa, L.E., Reljic, B., Frazier, A.E., Dibley, M.G., Osellame, L.D., Stait, T., Beilharz, T.H., Thorburn, D.R., Salim, A., Ryan, M.T., 2016. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* 538, 123–126. <https://doi.org/10.1038/nature19754>
- Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., Vander Heiden, M.G., 2015. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 162, 552–563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., Rao, Z., 2005. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell* 121, 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>

- Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2018. The role of dynamic enzyme assemblies and substrate channelling in metabolic regulation. *Nat. Commun.* 9, 2136. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04543-8>
- Timón-Gómez, A., Garlich, J., Stuart, R.A., Ugalde, C., Barrientos, A., 2020. Distinct Roles of Mitochondrial HIGD1A and HIGD2A in Respiratory Complex and Supercomplex Biogenesis. *Cell Rep.* 31, 107607. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107607>
- Trouillard, M., Meunier, B., Rappaport, F., 2011. Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1027–E1034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109510108>
- Tucker, E.J., Wanschers, B.F.J., Szklarczyk, R., Mountford, H.S., Wijeyeratne, X.W., Brand, M.A.M. van den, Leenders, A.M., Rodenburg, R.J., Reljić, B., Compton, A.G., Frazier, A.E., Bruno, D.L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M.T., Nijtmans, L.G., Huynen, M.A., Thorburn, D.R., 2013. Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLOS Genet.* 9, e1004034. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004034>
- Turina, P., Samoray, D., Gräber, P., 2003. H⁺/ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF0F1-liposomes. *EMBO J.* 22, 418–426. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg073>
- Vacanti, N.M., Divakaruni, A.S., Green, C.R., Parker, S.J., Henry, R.R., Ciaraldi, T.P., Murphy, A.N., Metallo, C.M., 2014. Regulation of Substrate Utilization by the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Mol. Cell* 56, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.024>
- van Karnebeek, C.D.M., Ramos, R.J., Wen, X.-Y., Tarailo-Graovac, M., Gleeson, J.G., Skrypnik, C., Brand-Arzamendi, K., Karbassi, F., Issa, M.Y., van der Lee, R., Drögemöller, B.I., Koster, J., Rousseau, J., Campeau, P.M., Wang, Y., Cao, F., Li, M., Ruiten, J., Ciapaite, J., Kluijtmans, L.A.J., Willemsen, M.A.A.P., Jans, J.J., Ross, C.J., Wintjes, L.T., Rodenburg, R.J., Huigen, M.C.D.G., Jia, Z., Waterham, H.R., Wasserman, W.W., Wanders, R.J.A., Verhoeven-Duif, N.M., Zaki, M.S., Wevers, R.A., 2019. Bi-allelic GOT2 Mutations Cause a Treatable Malate-Aspartate Shuttle-Related Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 105, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.07.015>
- Varanasi, L., Hosler, J.P., 2012. Subunit III-depleted cytochrome c oxidase provides insight into the process of proton uptake by proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.10.001>
- Vempati, U.D., Han, X., Moraes, C.T., 2009. Lack of Cytochrome c in Mouse Fibroblasts Disrupts Assembly/Stability of Respiratory Complexes I and IV*. *J. Biol. Chem.* 284, 4383–4391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805972200>
- Vercellino, I., Sazanov, L.A., 2021. Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII2CIV. *Nature* 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03927-z>
- Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G., 2016. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., SI: Respiratory Complex I* 1857, 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.004>
- Vinothkumar, K.R., Zhu, J., Hirst, J., 2014. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80–84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>
- Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vögtle, F.N., Meisinger, C., Meyer, H.E., Ziesenis, A., Katschinski, D.M., Jans, D.C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., Deckers,

- M., 2012. Rcf1 Mediates Cytochrome Oxidase Assembly and Respirasome Formation, Revealing Heterogeneity of the Enzyme Complex. *Cell Metab.* 15, 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.016>
- Walraven, H.S.V., Strotmann, H., Schwarz, O., Rumberg, B., 1996. The H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS Lett.* 379, 309–313. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01536-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01536-1)
- Walse, B., Dufe, V.T., Svensson, B., Fritzon, I., Dahlberg, L., Khairoullina, A., Wellmar, U., Al-Karadaghi, S., 2008. The Structures of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with and without Inhibitor Reveal Conformational Flexibility in the Inhibitor and Substrate Binding Sites †. *Biochemistry* 47, 8929–8936. <https://doi.org/10.1021/bi8003318>
- Wang, R., Long, T., Hassan, A., Wang, J., Sun, Y., Xie, X.-S., Li, X., 2020. Cryo-EM structures of intact V-ATPase from bovine brain. *Nat. Commun.* 11, 3921. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17762-9>
- Watmough, N.J., Frerman, F.E., 2010. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., Quinone Binding and Catalysis* 1797, 1910–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.007>
- Wikström, M., Hummer, G., 2012. Stoichiometry of proton translocation by respiratory complex I and its mechanistic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4431–4436. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120949109>
- Wikstrom, M., Krab, K., Saraste, M., 1981. Proton-Translocating Cytochrome Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 623–655. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.003203>
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., Zickermann, V., 2016. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., SI: Respiratory Complex I 1857*, 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., 2007. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1215–1225. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700076-MCP200>
- Wittig, I., Schägger, H., 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., 15th European Bioenergetics Conference 2008* 1777, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.027>
- Wittig, I., Schägger, H., 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *PROTEOMICS* 5, 4338–4346. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500081>
- Wu, M., Gu, J., Guo, R., Huang, Y., Yang, M., 2016. Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I₁III₂IV₁. *Cell* 167, 1598–1609.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.012>
- Xia, D., Esser, L., Tang, W.-K., Zhou, F., Zhou, Y., Yu, L., Yu, C.-A., 2013. Structural Analysis of Cytochrome bc₁ Complexes: Implications to the Mechanism of Function. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1278–1294. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.008>
- Xiao, W., Wang, R.-S., Handy, D.E., Loscalzo, J., 2018. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>
- Yamamoto, M., Arimura, H., Fukushige, T., Minami, K., Nishizawa, Y., Tanimoto, A., Kanekura, T., Nakagawa, M., Akiyama, S., Furukawa, T., 2014. Abcb10 Role in Heme Biosynthesis In Vivo: Abcb10 Knockout in Mice Causes Anemia with

- Protoporphyrin IX and Iron Accumulation. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1077–1084. <https://doi.org/10.1128/MCB.00865-13>
- Yang, S.Y., He, X.Y., Schulz, H., 1987. Fatty acid oxidation in rat brain is limited by the low activity of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase. *J. Biol. Chem.* 262, 13027–13032.
- Yang, Y., Sauve, A.A., 2016. NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 1787–1800. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.014>
- Yankovskaya, V., Sablin, S.O., Ramsay, R.R., Singer, T.P., Ackrell, B.A.C., Cecchini, G., Miyoshi, H., 1996. Inhibitor Probes of the Quinone Binding Sites of Mammalian Complex II and Escherichia coli Fumarate Reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 21020–21024. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21020>
- Zhang, J., Frerman, F.E., Kim, J.-J.P., 2006. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16212–16217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604567103>
- Zhang, J.Z., Mehta, S., Zhang, J., 2021. Liquid–liquid phase separation: a principal organizer of the cell’s biochemical activity architecture. *Trends Pharmacol. Sci.* 42, 845–856. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.07.003>
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504955200>
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.-I., Kim, K.K., Hung, L.-W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.-H., 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 392, 677–684. <https://doi.org/10.1038/33612>
- Zhou, Q., Zhai, Y., Lou, J., Liu, M., Pang, X., Sun, F., 2011. Thiabendazole inhibits ubiquinone reduction activity of mitochondrial respiratory complex II via a water molecule mediated binding feature. *Protein Cell* 2, 531–542. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1079-1>
- Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C., Brandt, U., 2015. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* 347, 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1259859>
- Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., Yang, M., 2018. Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Res.* 28, 1026–1034. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0071-1>
- Zuurendonk, P.F., Tager, J.M., 1974. Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 333, 393–399. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(74\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90022-X)

9 Liste des publications.

Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics.

Lobo-Jarne, T., Nývltová, E., Pérez-Pérez, R., Timón-Gómez, A., **Molinié, T.**, Choi, A., Mourier, A., Fontanesi, F., Ugalde, C., and Barrientos, A. (2018). Cell Report 25, 1786-1799.e4. DOI: [10.1016/j.celrep.2018.10.058](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.058)

Chapter 1 - Mitochondria: Ultrastructure, Dynamics, Biogenesis and Main Functions. In Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabete.

Devin, A., Bouchez, C., **Molinié, T.**, David, C., Duvezin-Caubet, S., Rojo, M., Mourier, A., Averet, N., and Rigoulet, M. (2019). B. Morio, L. Pénicaud, and M. Rigoulet, eds. (Academic Press), pp. 3–32. DOI: [10.1016/b978-0-12-811752-1.00001-8](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811752-1.00001-8)

Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle.

Prola A., Blondelle J., Vandestienne A., Piquereau J., Denis R.G.P., Guyot S., Chauvin H., Maurer M., Henry C., Khadhraoui N., Gallerne C, Mourier A., **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., and Pilot-Storck F. (2021). Science Advances Vol 7, Issue 1, DOI: [10.1126/sciadv.abd6322](https://doi.org/10.1126/sciadv.abd6322)

Specific expression of lactate dehydrogenases in glioblastoma controls intercellular lactate transfer to promote tumor growth and invasion.

Guyon J, Fernandez-Moncada I, Larrieu C, Bouchez CL, Chouleur T, Espedal H, Rosland G, Daher B, Barre A, Dartigues B, Coffe A, Rudewicz J, Romero-Garmendia I, Klink B, Grützmann K, Derieppe M-A, **Molinié T.**, Obad N, Leon C, Miletic H Marsicano G, Nikolski M, Bjerkvig R, Bikfalvi A, Daubon T. (2021). DOI: [10.21203/rs.3.rs-690811/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-690811/v1). (Preprint).

MDH2 produced OAA is a metabolic switch rewiring the fuelling of respiratory chain and TCA cycle

Molinié T., Cougouilles E., David C., Cahoreau E., Portais J.C., Mourier A. (2022) <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148532>.

Etude de la compétition à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire : Une régulation métabolique plus que structurale

Grâce à plusieurs ubiquinones oxydoréductases, de nombreuses voies métaboliques sont sous la dépendance de la chaîne respiratoire de mammifère (Béta-oxydation, synthèse des pyrimidines, navette redox, cycle de Krebs). Physiologiquement, la chaîne respiratoire dispose d'une multitude de substrats respiratoires pouvant alimenter simultanément ces oxydoréductases. Il a été émis l'hypothèse que l'organisation supramoléculaire (appelé supercomplexe) du complexe I de la chaîne respiratoire permettrait de favoriser et prioriser le flux d'électron provenant de ce complexe par rapport aux autres oxydoréductases. L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer la possible incidence fonctionnelle de cette organisation supramoléculaire. En particulier, nous avons développé de nouvelles stratégies expérimentales afin de déterminer si cette organisation supramoléculaire pouvait orchestrer l'approvisionnement en électron de la chaîne respiratoire depuis les différentes ubiquinones oxydoréductases. La première partie de ce travail a caractérisé l'incidence fonctionnelle d'une désorganisation de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire consécutive à la perte du facteur d'assemblage COX7A2L. Cette étude a démontré que la perte des supercomplexes III₂-IV de la chaîne respiratoire n'était associée à aucun défaut bioénergétique majeur affectant la respiration associée à l'oxydation du NADH ou du succinate. La seconde partie de ce travail de thèse a mis en évidence que les chaînes respiratoires des mitochondries hépatiques et cardiaques privilégient l'oxydation du succinate au détriment du NADH. Cette observation démontre que l'organisation supramoléculaire du complexe I avec les autres constituants de la chaîne respiratoire ne permet pas de favoriser l'oxydation du NADH. Notre travail a surtout permis de montrer que l'inhibition directe du complexe II par l'oxaloacetate intramitochondrial pouvait être un mécanisme extrêmement réactif permettant de réorienter les flux métaboliques intramitochondriaux et d'orchestrer l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire afin de privilégier la réoxydation du NADH.

Mots-clés : OXPHOS, Compétition à l'entrée des électrons, Supercomplexes, COX7A2L, navette malate-aspartate, cycle de Krebs, Oxaloacetate,

Study of the mechanism of electron donor competition in the respiratory chain: A metabolic regulation more than structural

The mammalian respiratory chain has several ubiquinone oxidoreductases which place numerous metabolic pathways under the control of its activity (beta-oxidation, synthesis of pyrimidines, redox shuttle, Krebs cycle). Physiologically, the respiratory chain has a multitude of respiratory substrates that can simultaneously supply these oxidoreductases. It has been hypothesized that the supramolecular organization (called supercomplex) of complex I of the respiratory chain would promote and prioritize the flow of electrons from this complex over other oxidoreductases. The objective of this thesis work was to determine the possible functional impact of this supramolecular organization. In particular, we have developed new experimental strategies to determine whether this supramolecular organization could orchestrate the supply of electrons to the respiratory chain from the various ubiquinone oxidoreductases. The first part of this work characterized the functional consequences of a disorganization of the supramolecular organization of the respiratory chain following the loss of the assembly factor COX7A2L. This study demonstrated that the loss of the III₂-IV supercomplexes of the respiratory chain was not associated with any major bioenergetic defect affecting respiration associated with the oxidation of NADH or succinate. The second part of this thesis work showed that the respiratory chains of the hepatic and cardiac mitochondria favor the oxidation of succinate against NADH. This observation demonstrates that the supramolecular organization of complex I with the other constituents of the respiratory chain does not promote the oxidation of NADH. Our work has above all made it possible to show that the direct inhibition of complex II by intramitochondrial oxaloacetate could be an extremely powerful mechanism making it possible to reorient intramitochondrial metabolic flows and to orchestrate the activity of complexes I and II of the respiratory chain in order to favor the oxidation of NADH.

Keywords: OXPHOS, Electron competition, Supercomplex, COX7A2L, Malate-aspartate shuttle, Krebs cycle, Oxaloacetate