



HAL
open science

Etude des interactions fonctionnelles entre les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines PINK1 et BNIP3 dans la balance mitophagie/apoptose chez la drosophile

Mélanie Fages

► To cite this version:

Mélanie Fages. Etude des interactions fonctionnelles entre les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines PINK1 et BNIP3 dans la balance mitophagie/apoptose chez la drosophile. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL160 . tel-04597586

HAL Id: tel-04597586

<https://theses.hal.science/tel-04597586v1>

Submitted on 3 Jun 2024

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.

Etude des interactions fonctionnelles entre les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines PINK1 et BNIP3 dans la balance mitophagie/apoptose chez la drosophile

*Investigating functional interactions between the Bcl-2 family proteins and
PINK1 and BNIP3 proteins in mitophagy/apoptosis balance in Drosophila*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577: Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité du doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Graduate School : Science de la Vie et Santé.
Réfèrent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche
LGBC (Université Paris Saclay, UVSQ)
sous la direction de **Isabelle GUENAL**, Professeure, HDR
et le co-encadrement de **Sylvina BOULEAU**, Maîtresse de Conférences

Thèse soutenue à Montigny le Bretonneux, le 19 Décembre 2023, par

Mélanie FAGES

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Marie-Noëlle DIEUDONNE Professeure des universités, UVSQ	Présidente
Giulia BERTOLIN Chargé de Recherche, HDR, Université de Rennes	Rapporteuse & Examinatrice
Thomas RIVAL Maître de Conférences, HDR, Université de Marseille	Rapporteur & Examineur
Nathalie DAVOUST Professeure des universités, ENS Lyon	Examinatrice
Marie-Pierre GOLINELLI Directrice de recherche, CNRS (Université Paris Saclay)	Examinatrice
Muriel PRIAULT Chargé de Recherche, Université de Bordeaux	Examinatrice

Titre : Etude des interactions fonctionnelles entre les protéines de la famille Bcl-2 et les protéines PINK1 et BNIP3 dans la balance mitophagie/apoptose chez la drosophile

Mots clés : PINK1, BNIP3, famille Bcl-2, Apoptose mitochondriale, Mitophagie, Parkin

Résumé : L'apoptose est une mort cellulaire programmée permettant l'élimination physiologique des cellules au cours du développement ainsi que l'élimination des cellules endommagées dans les organismes pluricellulaires. Ce processus sophistiqué est associé à des modifications au niveau des membranes mitochondriales impliquant, entre autres, de nombreux acteurs contrôlant le réseau mitochondrial (fusion, fission) ou le contrôle qualité mitochondrial (mitophagie). Plusieurs liens existent entre ces processus. Certains membres de la famille Bcl-2 (B cell Lymphoma 2), identifiés comme acteurs majeurs de l'apoptose, sont capables de moduler la fission et la fusion mitochondriale. De plus, des régulateurs de la mitophagie, nécessaires au maintien de l'intégrité mitochondriale, telle que PINK1 (PTEN Induces Kinase 1) et BNIP3 (BCL2 interacting protein 3) peuvent moduler l'activité apoptotique de certaines protéines de la famille Bcl-2 (BAX, BAK,...). Les relations entre mitophagie et apoptose restent cependant complexes. La capacité de PINK1 à protéger contre l'apoptose est aujourd'hui controversée dans certains tissus. BNIP3, quant à lui, présente un rôle double pro-apoptose et pro-mitophagie.

Nos résultats, dans le modèle drosophile, suggèrent un rôle régulateur positif pour PINK1 et négatif pour BNIP3, dans l'apoptose induite par rbf1 (l'homologue du gène de susceptibilité au rétinoblastome) ou par Debcl (un pro-apoptotique de la famille Bcl-2). Ce processus apoptotique s'accompagne de mitophagie qui semble, dans le cas de Rbf1, impliquer la protéine PINK1. Cela renforce l'idée d'un lien étroit entre les acteurs de l'apoptose et la mitophagie et nous pousse à nous interroger sur le rôle moins connu de PINK1 dans le processus apoptotique.

Title: Investigating functional interactions between the Bcl-2 family proteins and PINK1 and BNIP3 proteins in mitophagy/apoptosis balance in *Drosophila*

Keywords: PINK1, BNIP3, Bcl-2 family, Mitochondria Apoptosis, Mitophagy, Parkin

Abstract: Apoptosis is a programmed cell death, allowing the physiological elimination of cells during development and that of damaged cells in multicellular organisms. This sophisticated process is associated with modifications at the level of the mitochondrial membranes involving, among others, numerous actors controlling the mitochondrial network (fusion, fission) or mitochondrial quality control (mitophagy). Several links exist between these processes. Some members of the Bcl-2 family (B cell Lymphoma 2), identified as significant players in apoptosis, can modulate mitochondrial fission and fusion. In addition, mitophagy regulators necessary for maintaining mitochondrial integrity, such as PINK1 (PTEN Induces Kinase 1) and BNIP3 (BCL2 interacting protein 3), can modulate the apoptotic activity of specific proteins of the Bcl-2 family (BAX, BAK,...). However, the relationship between mitophagy and apoptosis remains complex. PINK1 ability to protect against apoptosis is challenged in some tissues. For its part, BNIP3 has a dual function: pro-apoptosis and pro-mitophagy.

In the *Drosophila* model, our results show a positive regulatory role of PINK1 and a negative one for BNIP3 in apoptosis induced by rbf1 (the homolog of the retinoblastoma susceptibility gene). This apoptotic process accompanies mitophagy, which seems, in the case of RBF-1, independent of the PINK1 protein. This observation reinforces the idea of a close link between apoptosis and mitophagy and prompts us to question the role of PINK1 in this process. This project should make it possible to better understand the consequences of PINK1 deregulation according to the tissue types, neuronal or subject to renewal.

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à mes rapporteurs : **Giulia BERTOLIN** et **Thomas RIVAL**. Merci à mes examinatrices : **Marie-Noëlle DIEUDONNE**, **Nathalie DAVOUST**, **Marie-Pierre GOLINELLI** et **Murielle PRIAULT**.

La thèse est une aventure avec des hauts et des bas. Je n'aurais pas pu rêver d'une meilleure équipe pour la vivre.

Merci à **Isabelle**, ma directrice de thèse, pour sa bonne humeur. Merci de m'avoir suivi pendant ce sprint final et complexe de la rédaction de ce manuscrit. Et bien évidemment, pour tes super blagues sur les légumes ainsi que tes conseils avisés au bowling.

Sylvina, ces quelques mots ne suffiront pas à t'exprimer toute ma gratitude. Mille mercis pour tout ce que tu m'as apporté au cours de cette thèse et de mes stages. Merci de m'avoir montré à quel point la science c'est « génial ». Merci de m'avoir guidée du début à la fin de cette extraordinaire aventure. Merci pour ta patience face à mon esprit lent. Merci d'avoir supporté mon entêtement. Merci d'avoir été là dans les moments de doute. Et surtout, merci d'avoir si bien dirigé notre équipe de curling.

Merci à l'intégralité de l'équipe du **LGBC** pour l'ambiance au sein du laboratoire et vos conseils tant sur la vie qu'à propos de mes manips. Merci **Aurore** pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci **Jean-Marc** pour tes discussions sur le sens de la vie, je pars papillonner plus loin. Merci **Bernard** pour tes relectures fines (presque co-auteur de cette thèse). **Christine**, je sais que ces derniers temps ont été durs pour toi mais du début à la fin j'ai pu compter sur ma petite maman du labo, alors un immense merci. Merci **Delphine** pour tes conseils, tes chats des émotions nous manquent (toi aussi) ! Merci **Juliette** pour ton accueil dans le bureau 31. Merci **Vincent**, mon compagnon de kiné. Merci **Emma** pour tes sublimes et délicieux gâteaux. Merci **Nesrine** pour tes conseils de vie. Merci à **Maxence** et ses coffres. Merci à **Justine**, ma copine de genou cassé. Merci à **Hamadoun**, la meilleure source de potins du bâtiment. Merci à **Nathalie** pour son énergie et ses conseils en matière de jeux de société. Merci aux **Seb(s)** et leurs jeux de mots, à **Arnaud**, à **Moana**, à **José**, à **Adrien**, à **Nawal**, à l'ensemble du troisième étage et à tous ceux que j'ai malheureusement oublié.

Ces trois années de thèse m'ont apporté des collègues mais aussi des amis. Merci **Kamila** de m'accompagner dans les sorties à Disneyland à chaque fois que nous en avons l'occasion. **Marion**, bien que cette thèse aura duré trois ans, seuls deux auront été nécessaires pour que tu aimes le thé. C'est peut-être ma plus belle réussite ! Merci pour ton soutien indéfectible et ton « retour sur expérience » qui m'ont été essentiels tout au long de ce projet. Merci **Florine** pour ta motivation inébranlable, tu es mon phare dans cet océan qu'est la biologie moléculaire. Merci pour ta patience, ta bonne humeur permanente. Merci à toutes les deux pour toutes nos activités, d'avoir été avec moi sur la glace, sur la neige, sur l'eau, dans les arbres, tout au long de ces deux dernières années. Merci pour nos fous rires et ces choses qui font que la vie est belle (et vos blagues qui, en vrai, me font un peu rire).

En dehors du labo, merci à **Pauline**, ma binôme de toujours, merci à **Céline** pour m'avoir encouragé du début à la fin de ma thèse. Merci **Alex** d'avoir été ma copine, depuis la chine jusqu'à bac+8 ... ça fait un sacré bout de chemin.

Merci à ma famille. Merci **Mam's**, Merci **Pap's** d'avoir fait le chauffeur pendant toute la période de la thèse (ci-suit ce que j'ai cherché ET trouvé). Merci **le nain** d'être le relou que tu es. Merci **Marraine** pour tes encouragements. Enfin merci à mon ligament perdu de m'avoir rappelé les priorités de la vie.

C'est dur d'essayer mais c'est encore pire de n'avoir jamais essayé de réussir.

Président T. Roosevelt, Chicago, 1899.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES ET TABLES.....	9
INTRODUCTION.....	11
1. Les mitochondries.....	12
a.Généralités sur les mitochondries.....	12
i. Mise en évidence et origine de la mitochondrie	12
ii. Structure et composition	13
iii. Import et export des protéines au sein de la mitochondrie	15
Import dans l’EIM	16
Import dans la matrice	17
b.Les fonctions mitochondriales	18
i. Homéostasie du calcium et du fer	18
ii. Catabolisme des acides gras	18
iii. Régulation de la prolifération cellulaire	18
iv. Chaîne respiratoire.....	19
v. Une réponse au stress mitochondrial, introduction de l’apoptose	19
c.Dynamique mitochondriale.....	20
i. La fusion	21
ii. La fission.....	21
iii. Les fonctions de la dynamique mitochondriale.....	22
d. Dysfonctionnement mitochondrial, contrôle et pathologie	23
i. Les maladies associées à un défaut mitochondrial.....	25
Maladies musculaires	25
Maladies neurodégénératives	25
ii. Les voies de contrôle de la qualité mitochondriale	26
2 La mitophagie, un recyclage sélectif.....	28
a.De l’autophagie sélective à la mitophagie	28
b.Le processus de mitophagie.....	30
i. Récepteur direct/ receptor mediated mitophagy.....	32

Nix/BNIP3L.....	31
FUNDC1.....	31
BNIP3	33
ii. Récepteur indirect/ubiquitin mediated mitophagy.....	34
Parkin	34
PINK1	35
PINK1 et Parkin dans la mitophagie.....	36
PINK1 et Parkin dans Le modèle drosophile.....	37
c. La mitophagie physiologique et pathologique	39
i. Physiologique	39
ii. Dérégulation.....	42
Neurodégénératives	42
Cancers.....	43
3 L'apoptose	44
a. Rôle de l'apoptose	44
i. Physiologique	44
ii. Dérégulation.....	44
b. Les acteurs de l'apoptose	45
i. Les caspases	46
ii. Les IAPs et leurs inhibiteurs	46
iii. La famille Bcl-2, une grande famille chez les mammifères	48
c. L'apoptose, un ballet mortel.....	49
d. Quid de la drosophile	51
e. L'utilisation de gènes de susceptibilité au rétinoblastome pour induire l'apoptose	55
i. pRb, un suppresseur de tumeur humain aux multiples cibles	56
ii. Rbf1, une fonction proche de pRB	56
iii. Rbf1 et l'apoptose, le modèle du laboratoire	56
4 Apoptose et mitophagie un destin lié ?	58
a. Apoptose ou mitophagie, un choix décisif pour la cellule	58
b. Les acteurs de l'apoptose dans la mitophagie	60
c. Les acteurs de la mitophagie dans l'apoptose.....	61
d. Quelles sont les conséquences de ces interactions	62
5. Contexte du sujet et objectif.....	63
MATERIELS ET METHODES.....	65

RESULTATS	71
1. Le processus d'apoptose est-il modulé par les protéines pro-mitophagie ?	72
a. PINK1 et BNIP3	72
b. Parkin.....	101
2. Qui de la mitophagie ou de l'apoptose est induit en premier ?	104
a. L'apoptose dépendante de la mitophagie	105
b. La mitophagie dépendante de l'apoptose	106
3. Turbo Debcl, un outil de détection des partenaires de Debcl	108
a. Le système Turbo ID	108
b. La construction et la validation de l'outil	108
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	113
1. Les protéines de la mitophagie dans l'apoptose induite par Rbf1 et Debcl	115
a. BNIP3 dans le processus apoptotique.....	115
i. Rbf1 ne semble pas moduler l'expression de BNIP3 dans notre système	115
ii. La possibilité pour BNIP3 de réguler les protéines de la famille Bcl-2.....	116
iii. L'activité protectrice de BNIP3 sur les phénotypes induits par Debcl.....	117
b. PINK1 dans le processus apoptotique.....	118
c. La mitophagie au cours du processus apoptotique.....	118
i. BNIP3 un régulateur de la mitophagie basale	118
ii. PINK1 un régulateur de la mitophagie induite par le processus apoptotique....	118
iii. Deux voies de mitophagies distinctes	120
d. Parkin une protéine pléiotropique au rôle complexe	121
e. PINK1 prend son indépendance.....	121
i. Une fonction indépendante de la mitophagie	121
ii. Une fonction indépendante de Parkin	122
2. Les partenaires de Debcl.....	123
a. Drp1 et la balance mitophagie apoptose	123
b. Turbo-ID une autre approche.....	123
CONCLUSION	125
BIBLIOGRAPHIE	127

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN	Acide Desoxyribo Nucléique
AIM	Atg8 Interacting Motif
APAF1	Apoptotic protease-activating factor
ARNm	Acide Ribo Nucléique messenger
Atg	Autophagy related gene
ATP	Adénosine Tri Phosphate
ATPase	ATP synthase

B

Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B Cell Lymphoma
Bcl-xl	B-Cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 Homologue
BNIP3	BCL2/adénovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
Bok	Bcl-2 Ovarian Killer

C

CARD	CAspase Recruitment Domain
CCCP	CarbonylCyanure m-ChloroPhénylhydrazone
Cdk1	Cycline dépendante kinase
Ced	Cell death
CK2	Casein Kinase 2
CMA	Chaperon Mdeiated Autophagy
CMT	Maladie de Charcot Marie Tooth
Co-IP	Co-ImmunoPrécipitation

D

Dark	Apaf-1/CED-4-related caspase activator Dapaf-1S
Dcp-1	Death caspase 1
DED	Death Effector Domain
DIAP	Death-associated Inhibitor of Apoptosis 1/2
DNM1L/DRP1	Dynamin 1 like Humaine
DrICE	Death related ICE-like caspase
Drp1	Dynamin related protein1 chez la drosophile

E

E2F	Transcription factor E2F
-----	--------------------------

egl-1	egg laying 1
EIM	Espace Inter Membranaire
ER = RE	Réticulum Endoplasmique
ERDA	ER-Associated-Degradation
F	
Fis1	mitochondrial Fission protein 1
FUNDC1	FUN14 domain-containing 1
G	
GABARAP	Gamma-AminoButyric Acid A Receptors Protein
GAL4	Regulatory protein GAL4
H	
HIF	Hypoxia Induced Factor
How	Held out wing
Hsp70	70-kD Heat shock-related protein
Htt	Protéine Huntington
I	
IAP	Inhibitor of apoptotic proteins
iIAP	Inhibiteur de IAP
IP	ImmunoPrécipitation
J	
JNK	JuN Kinase
L	
LC3	microtubule associated protein1 Light Chaîne 3
LIR	LC3-Interacting Region
LONP	LON Peptidase 1
M	
MAD	Mitochondrial Associated Degradation
MAM	Mitochondrial Associated Membrane
MARCH5/MITOL	Membrane-Associated RING-CH protein 5
Marf	Transmembrane GTPase Marf
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCR	Mort Cellulaire Régulée
MCU	Mitochondrial Calcium Uniport
Mdiv1	Mitochondrial division inhibitor 1
MDVs	Mitochondrial Derived Vesicles
MER	Minimal Region of Interest

Mff	Mitochondrial fission factor
MFN	Mitofusine
Mid49/51	Mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa
Miro	Mitochondrial Rho GTPase
MM	Matrice Mitochondriale
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase
MPT	Modifications Post-Traductionnelles
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
N	
NBR1	NBR1 autophagy cargo receptor
NIX/BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
O	
Omi/HtrA2	HtrA serine peptidase 2
OPA1	OPTic Atrophy 1
OPTN	OPTiNeurin
P	
p53	Cellular tumor antigen p53
p62/SQSTM1	sequestrosome 1
PARIS	PARkin Interacting Substrate
PARL	Presenilin Associated Rhomboid Like protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGAM	PGAM Family Member 5
PHB2	Prohibitin 2
PINK1	PTEN Kinase Induce 1
PKA	Protéine Kinase A
PLA	Proximity Ligation Assay
pRb	Retinoblasoma associated protein
Q	
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
R	
Rb	Gene de susceptibilité au Retinoblastome
Rbf	Retinoblastoma-family protein
RBR	Ring-Between-Ring
RE	Réticulum Endoplasmique
Ref2P	Refractory to sigma P, Homologue de p62
RHG	Reaper, Hid et Grim

RING	Really INteresting Gene
ROS	espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Spicies)
S	
SAM	Sorting Assembly Machnery
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
Smac/Diablo	Diablo IAP-binding mitochondrial protein
SOD	SuperOxyde Dismutase
T	
TAX1BP1	Tax1 binding protein
TIM	Translocase Inner Membrane
TM	Trans-Membranaire
TOM	Translocase Outer Membrane, complexe protéique
Tom	Translocase outer membrane, sous unité protéique
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
U	
UAS	Upstream Activating Sequence
UBC	Ubiquitin-Conjugaison
UBD	Ubiquitin Binding Domain
Ubl	ubiquitin like
UPRmt	mitochondrial Unfold Protein Response
UPS	Ubiquitin-Proteaseome-System
V	
VDAC	Voltage-Dépendent Anion Channel
Alphabet Grec	
α -syn	α -synucléine
β A	β -Amyloid
$\Delta\Psi$ m	différence de potentiel mitochondrial

LISTE DES FIGURES ET TABLES

Figures

Figure 1 : L'endosymbiose, l'origine de la mitochondrie

Figure 2 : Premières images à haute résolution de mitochondrie

Figure 3 : Schéma structurel de la mitochondrie

Figure 4 : Un réseau mitochondrial aux morphologies variées.

Figure 5 : Import mitochondriale des protéines.

Figure 6 : La balance fusion/fission mitochondriale

Figure 7 : Les fonctions de la dynamique mitochondriale.

Figure 8 : Mécanismes de contrôle qualité mitochondrial.

Figure 9 : Schéma succinct des mécanismes autophagiques.

Figure 10 : Schéma simplifié et image par microscope électronique à transmission de processus macro-autophagique

Figure 11 : Les différents inducteurs de mitophagie.

Figure 12 : Comparaisons des structures primaires des BNIP3, Parkin et PINK1 humaines et chez la drosophile

Figure 13 : La mitophagie induite par PINK1 et Parkin.

Figure 14 : Les rôles de la mitophagie au sein des cellules.

Figure 15 : Méthode de détection de la mitophagie

Figure 16 : La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères

Figure 17 : Induction spécifique de gène chez la drosophile

Figure 18 : Schéma comparatif de la mort cellulaire chez la drosophile et chez le mammifère

Figure 19 : L'apoptose induite par Rbf1 chez la drosophile

Figure 20 : Balance apoptose/mitophagie.

Figure 21 : Schéma des hypothèses concernant les rôles des protéines PINK1 et BNIP3 dans le processus cellulaire induit par *rbf1* ou *debcl*

Figure 22 : Effet d'une diminution de Parkin sur les phénotypes d'ailes et l'apoptose au niveau larvaire induits par Rbf1 et Debcl (résultats à confirmer).

Figure 23 : Taux relatifs d'ARNm des gènes codant Parkin, Drp1, How et Buffy en condition de surexpression de *rbf1* au niveau du disque imaginal d'aile.

Figure 24 : Schéma des hypothèses des chronologies des événements cellulaires induits par un stress mitochondrial.

Figure 25 : Schéma des cibles utilisées pour bloquer l'apoptose ou l'autophagie.

Figure 26 : Observation des phénotypes d'ailes et mesures du taux d'apoptose induits par Rbf1 en condition mutante ou non du gène *atg7*.

Figure 27 : Mesure de la mitophagie induite par *rbf1* en contexte mutant hétérozygote pour *debcl* ou en présence d'une surexpression de l'inhibiteur d'apoptose p35.

Figure 28 : Construction des souches transgéniques TurboS et TurboD-Debcl.

Figure 29 : Validation de l'outil Turbo.

Figure 30 : Schéma bilan des résultats et hypothèses

Tables

Table 1 : lien entre pathologies neurodégénératives et dérégulation de la dynamique mitochondriale

Table 2 : Tableau récapitulatif des acteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères et le modèle drosophile

Table 3 : Les interactions entre PINK1 et les acteurs du processus apoptotique

Table 4 : Parkin dans le processus apoptotique

Crédits :

Les figures réalisées ici ont été générées à partir de :

- Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 non portée.
- Biorender.com

INTRODUCTION

1. Les mitochondries

a. Généralités sur les mitochondries

i. Mise en évidence et origine de la mitochondrie

En 1857, une structure cellulaire inconnue est décrite par Kolliker [1]. Quelques années plus tard cette structure, identifiée comme un organite, est nommée bioplaste par Richard Altmann [2]. Il l'a décrit comme un « organisme élémentaire » vivant dans la cellule. Il faut attendre 1898 pour que son nom change pour devenir mitochondrie, du grec mitos « fil » et chondros « grain » [3]. Cette notion d'organisme élémentaire résonne d'autant plus aujourd'hui, compte tenu de l'hypothèse de l'origine bactérienne présumée des mitochondries. Cette structure autonome est très proche des chloroplastes, ce qui laisse à penser que leur origine est similaire. En 1883, le Professeur Andreas Schimper [4] compare les chloroplastes aux cyanobactéries, et des similitudes de morphologie lui permettent d'en déduire que les chloroplastes sont issus de la symbiose de deux cellules. C'est Paul Portier [5] qui, 30 ans plus tard, transpose l'idée aux mitochondries. Aujourd'hui cette théorie s'appelle l'endosymbiose. Les mitochondries seraient issues de l'incorporation d'une protéo-bactérie aérobique dans une cellule eucaryote anaérobie (Figure 1). Cette origine est cohérente avec la morphologie de la mitochondrie illustrée en 1952 avec la publication de la première photographie de mitochondrie, 100 ans après sa première description (Figure 2). Elle est réalisée par le Professeur George Palade [6] grâce à un microscope électronique à haute résolution. La structure de la mitochondrie apparaît clairement, avec une membrane encerclant des sections perpendiculaires internes. Cette organisation pousse les scientifiques à émettre de nombreuses hypothèses sur son rôle au sein de la cellule. Parmi ces hypothèses, il est suggéré par Benjamin Kingsbury que l'organite serait essentiel à la fonction de réduction de la respiration cellulaire [7]. Cette hypothèse se base uniquement sur la composition lipidique de la mitochondrie et sur sa morphologie. Rapidement il devient évident qu'une meilleure connaissance de sa structure et de sa composition constitue une des étapes nécessaires pour comprendre sa fonction cellulaire [8].

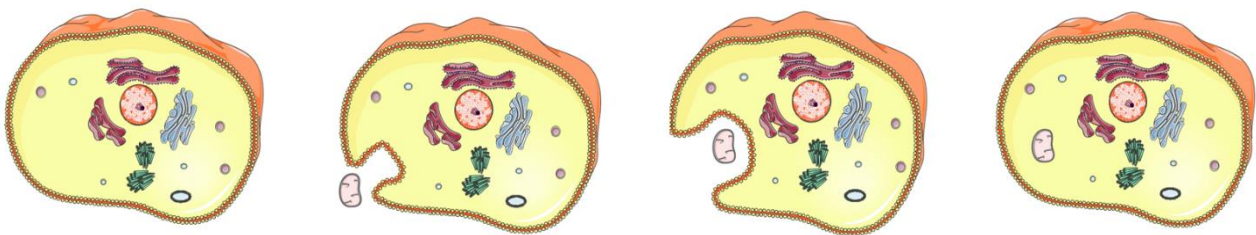


Figure 1 : L'endosymbiose, l'origine de la mitochondrie

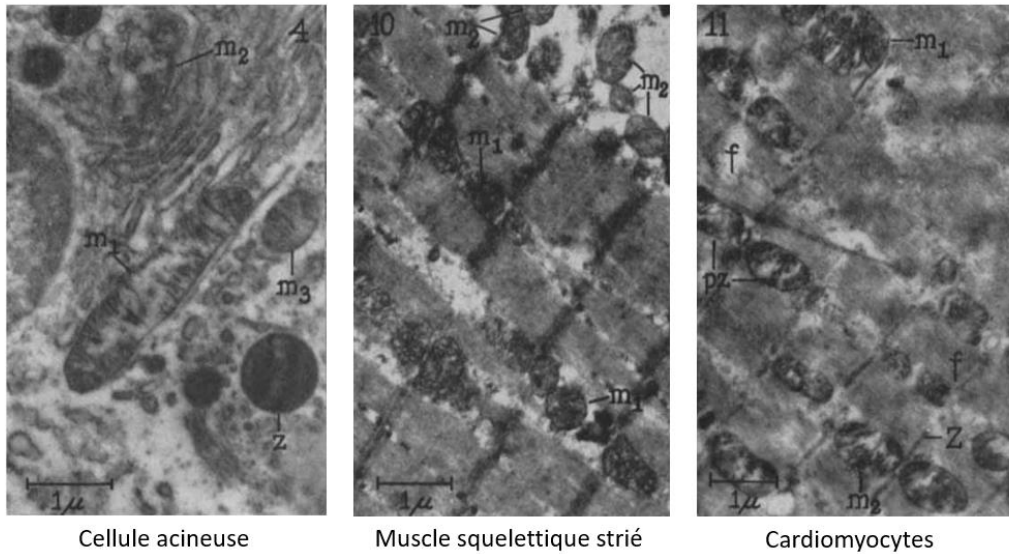


Figure 2 : Premières images à haute résolution de mitochondrie. Image tirée de « The fine structure of mitochondria » de George E. Palamade [6]. Les tissus de rats sont observés au microscope électronique

ii. Structure et composition

Leur origine bactérienne confère aux mitochondries des caractéristiques spécifiques. Elles sont dotées d'une double membrane [9] et contiennent de l'ADN circulaire, appelé ADN mitochondrial [10–13] (Figure 3).

Cet ADN circulaire est intégralement séquencé chez plusieurs espèces et contient 37 gènes codant 13 protéines mitochondriales chez les vertébrés [14,15]. Ces 13 protéines ne représentent pas l'intégralité du protéome mitochondrial et le reste des protéines mitochondriales est codé par le génome nucléaire. Ces dernières sont traduites dans le cytosol puis importées dans la mitochondrie. Cette importation nécessite dans certains cas, de passer les deux membranes mitochondriales [16,17]. Ces deux membranes conduisent à la compartimentation spécifique de la mitochondrie. Une première membrane est appelée membrane mitochondriale externe (MME) et délimite les contours de la mitochondrie, l'isolant du cytosol. L'espace intermembranaire mitochondrial (EIM) est un espace délimité par la MME et par la membrane mitochondriale interne (MMI). Dans la lumière de cette MMI se trouve le dernier espace, la matrice mitochondriale (MM).

La membrane la plus externe est la MME. Cette membrane est également en contact avec d'autres organites (le Réticulum Endoplasmique (RE) ou encore les lysosomes) au niveau de sites de contacts appelés MAM (Mitochondria Associated Membrane) [18]. Cette interaction permettrait une modulation de l'activité mitochondriale. De plus la composition en lipides de cette membrane est particulière. Elle est majoritairement composée de phosphatidylcholines et de phosphatidyléthanolamines, toutes deux essentielles pour maintenir son intégrité et sa perméabilité. Elle possède également un lipide spécifique aux mitochondries, la cardiolipine. Ce lipide participe à de nombreuses fonctions mitochondriales, en particulier au niveau de la MMI [19,20]. Au niveau de la membrane externe la cardiolipine participe au recrutement de protéines,

INTRODUCTION: La mitochondrie

en particulier la protéine de modulation de la morphologie mitochondriale DRP1 (Dynamine Related Protein 1) [21].

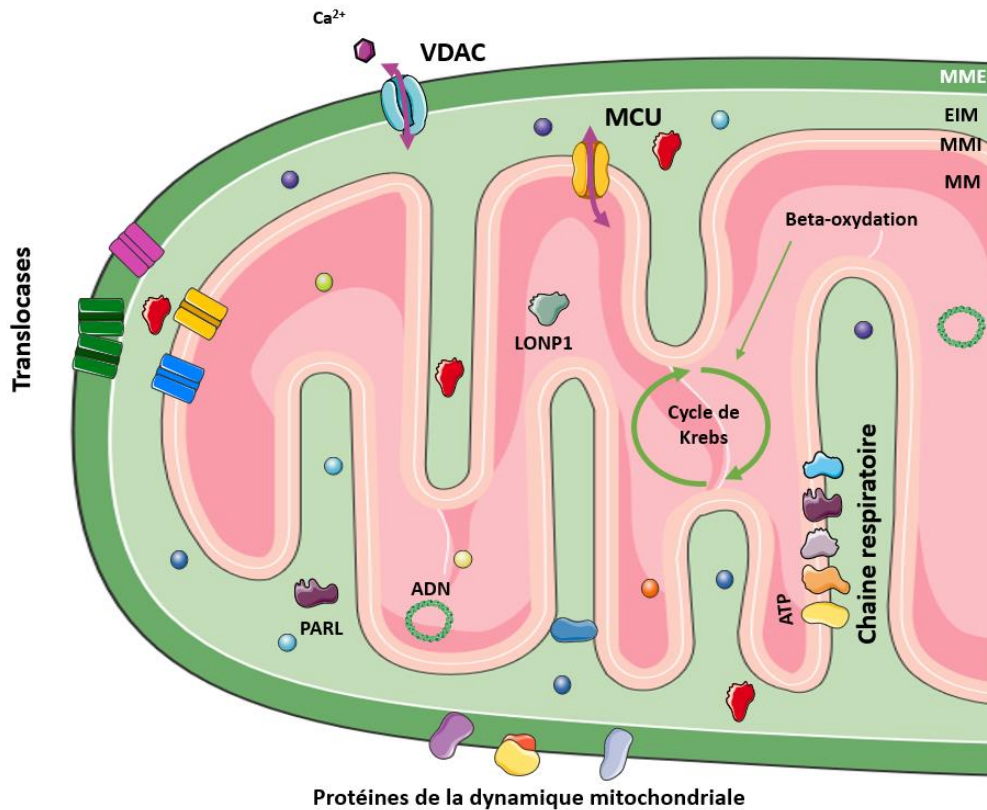


Figure 3 : Schéma structurel de la mitochondrie

L'EIM, délimité par les deux membranes mitochondriales, est un compartiment particulièrement petit et riche en protéines [22]. Ces protéines sont variées et assurent de nombreuses fonctions cellulaires, en particulier des processus spécifiques à la mitochondrie comme la production d'ATP (Adénosine tri Phosphate) ou l'apoptose. L'EIM contient aussi des protéines chaperonnes responsables de l'adressage des protéines synthétisées dans le cytosol, aux mitochondriales et du contrôle qualité des mitochondries.

La matrice mitochondriale est délimitée par la MMI qui l'isole de l'EIM permettant une composition chimique et moléculaire distincte de l'espace intermembranaire. La MMI est bien plus imperméable que la membrane externe. Contrairement à la MME qui a pour principal rôle d'assurer les échanges entre l'organite et le cytosol, la membrane interne présente une autre fonction. Elle a une organisation en deux domaines [23]. On trouve un premier domaine proche de la membrane externe et un deuxième composé d'invaginations appelées crêtes. Ces invaginations permettent d'augmenter la surface de la MMI et subissent de constants réarrangements. Cette surface est essentielle à la réalisation de nombreuses fonctions mitochondriales qui nécessitent des protéines de l'EIM et de la MM.

La MM est particulièrement riche en métabolites, en enzymes et autres éléments tels que l'ADN mitochondrial cité plus haut. Des réactions spécifiques ont lieu dans ce compartiment, comme la synthèse de protéines à partir de l'ADN mitochondrial ou la production d'énergie sous forme d'ATP. Cette dernière implique la création d'une différence de potentiel ($\Delta\Psi_m$) de part et d'autre de la MMI [24]. La consommation en ATP d'une seule et même cellule varie au cours du temps. Pour répondre aux besoins cellulaires, la mitochondrie est sujette à des modulations morphologiques, ce qui en fait un élément cellulaire dynamique [25]. On parle ici de dynamique mitochondriale (Figure 4).

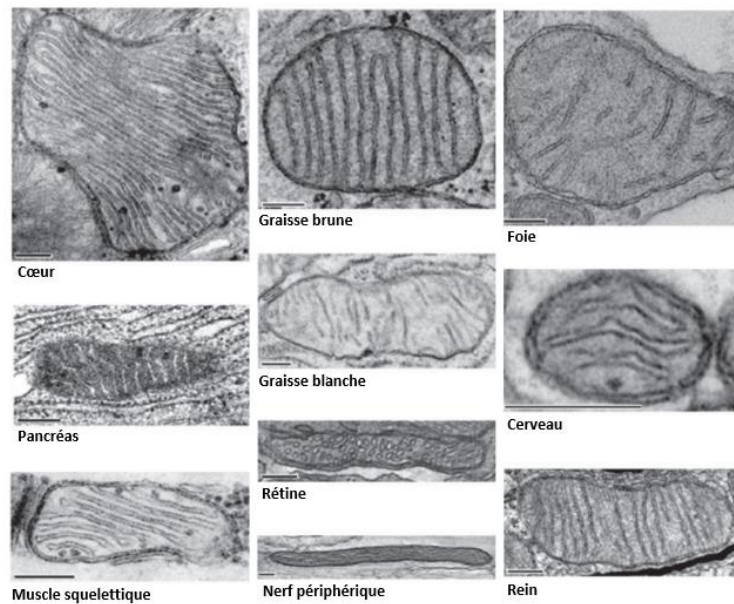


Figure 4 : Un réseau mitochondrial aux morphologies variées. Modifié d'après Vafai et Mootha, 2012 [26]. La barre représente 200nm.

En plus de cette dynamique, la mitochondrie présente un système d'import essentiel à son fonctionnement. Le génome mitochondrial code peu de protéines, si bien que la grande majorité des protéines composant la mitochondrie sont issues du génome nucléaire. Pour permettre aux protéines et aux molécules l'accès aux compartiments mitochondriaux internes, un système d'import existe. Cet accès est régulé en fonction de l'identité moléculaire de l'élément transporté (Figure 3).

iii. Import et export de protéines au sein de la mitochondrie

Pour les éléments mitochondriaux non synthétisés en son sein, l'accès aux compartiments internes est conditionné au passage des membranes citées plus haut : la MME pour accéder à l'EIM puis la MMI pour accéder à la MM (Figure 5).

INTRODUCTION: La mitochondrie

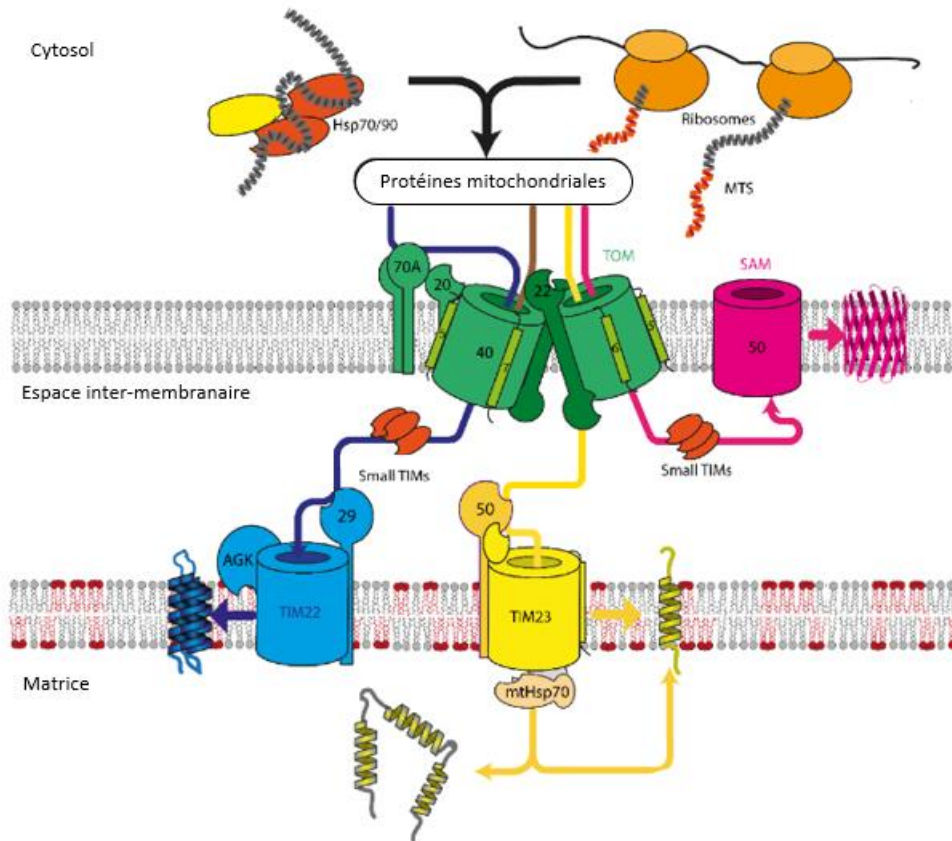


Figure 5 : Import mitochondriale des protéines. Adapté de Bogrodskiy et al. 2021 [27]. Les protéines traduites ou en cours de traduction traversent le complexe TOM. Dans l'espace intermembranaire elles sont adressées à un second complexe pour terminer leur voyage. Le complexe SAM permet leur insertion dans la MME. Sur la membrane interne, TIM22 permet l'insertion dans la MMI alors que TIM23 permet l'insertion dans la MMI mais aussi l'accès à la MM. Concernant le transport dans la matrice, bien que cela ne soit pas représenté sur ce schéma, on observe des sites de contact entre les membranes facilitants le transport des protéines vers la MM.

Import dans l'EIM

L'import au niveau de l'EIM nécessite le passage de la MME à l'aide de nombreux complexes protéiques. Il s'agit principalement de canaux (porines) et de translocases. Les porines mitochondriales sont les protéines les plus abondantes de la MME [28]. Il s'agit de canaux ioniques dépendants du voltage mitochondrial. Le canal VDAC pour Voltage Dépendent Anions Channel est particulièrement étudié [29]. Il permet le transport du calcium. Le transport de protéines localisées au niveau de la MME est réalisé par des translocases. Les translocases sont des complexes protéiques tels que les translocases TOM (Translocase of the Outer Membrane) [30] ou encore SAM (Sorting and Assembly Machinery) [31], respectivement impliqués dans l'import et l'insertion dans la membrane des protéines mitochondriales au niveau de MME. Les protéines mitochondriales traduites dans le cytosol sont adressées aux complexes translocases par l'intermédiaire de protéines chaperonnes notamment Hsp70 (70-kD Heat shock-related protein) [32,33]. Le complexe TOM, est composé des sous-unités Tom40, Tom22, Tom5 Tom6 et Tom7 qui composent le cœur et Tom20, et Tom70 qui sont des récepteurs périphériques. En plus de ces récepteurs périphériques, Tom22 peut reconnaître les séquences d'adressage mitochondrial

présentes sur les protéines qui en possèdent [34]. Cette séquence est généralement une séquence de 15 à 70 acides aminés localisés dans la partie N terminale de la protéine. Une partie de ces protéines subissent un clivage du peptide signal par des peptidases ou des protéases une fois arrivées à destination [35]

Import dans la matrice

En ce qui concerne les protéines adressées à la MM ou à la MMI, les protéines TOM travaillent en collaboration avec les transporteurs de la MMI. Pour cela, les protéines adressées à la matrice se lient aux protéines de transport, tel que hsp70, qui les adressent aux translocases [36,37]. Le complexe TOM va adresser les protéines aux différents complexes TIM [38,39]. Au niveau de la membrane mitochondriale interne les translocases sont les complexes TIM22 et TIM23 (Translocase of Inner Membrane). Le complexe TIM22 permet l'insertion de protéines au niveau de la MMI [40]. TIM23 est un complexe bien plus volumineux qui va permettre le passage de protéines vers la MM.

b. Les fonctions mitochondriales

Homéostasie du calcium et du fer

Un rôle essentiel de la mitochondrie est la gestion du calcium intracellulaire. Pour ce faire la mitochondrie sert de site de stockage du calcium pour maintenir une concentration stable dans le cytosol. Le calcium est un élément majeur de la communication cellulaire mais il sert aussi pour d'autres processus comme la mort cellulaire [41]. De plus, le calcium stocké dans les mitochondries est utilisé pour certaines fonctions mitochondriales [42]. On trouve des canaux et des pores spécifiques de l'entrée et de la sortie du calcium au niveau de la mitochondrie. Le MCU (Mitochondrial Calcium Uniport) au niveau de la MMI dépend du potentiel de membrane mitochondrial pour permettre l'entrée du calcium [43,44]. La porine VDAC (Voltage-Dépendent Anion Channel) quant à elle favorise l'entrée et la sortie du calcium [45]. Le calcium est également un cofacteur d'enzymes mitochondriales qui participent à la production d'énergie sous forme d'ATP. C'est notamment le cas de l'ATP synthase (ATPase). Dans les cardiomyocytes, la protéine S100A1 interagit avec l'ATPase pour augmenter la production d'ATP. Cette interaction est dépendante du calcium.

La mitochondrie est également impliquée dans le stockage et la libération du fer cytosolique [46]. Le fer a de nombreuses fonctions cellulaires en tant que cofacteur, pour le transport des électrons et ce qui nous intéresse ici, la respiration cellulaire [47]. Pour générer de l'ATP, la mitochondrie a besoin des cofacteurs (utilisés par les complexes de la chaîne respiratoire) mais également d'hèmes (qui composent une partie des complexes de la chaîne respiratoire), tous deux composés de fer [48]. Aujourd'hui le passage par la mitochondrie est considéré comme une étape essentielle au métabolisme du fer, permettant la synthèse des hèmes et des centres fer-soufre. Elle permet aussi l'initiation de la formation et le stockage de la ferritine, une protéine mammifère capable de stocker le fer.

iv. Catabolisme des acides gras

Le catabolisme des acides gras, aussi appelé la β -oxydation ou encore spirale de Lynen, a lieu dans la matrice mitochondriale [49]. Elle consiste en la dégradation des acides gras pour

INTRODUCTION: La mitochondrie

former d'une part l'acétyl-CoA qui sera utilisé par le cycle de Krebs d'autre part le NADH et FADH₂ qui seront utilisés par la chaîne respiratoire au cours de la phosphorylation oxydative.

v. Régulation de la prolifération cellulaire

La production, plus précisément la production d'ATP au niveau de la mitochondrie, est la source d'énergie principale de nombreux processus cellulaires notamment impliqués dans la prolifération. La quantité d'ATP dans une lignée cellulaire de leucémie humaine varie en fonction du cycle cellulaire. Un seuil minimal d'ATP est nécessaire pour la progression dans le cycle [50]. De plus, chez la *Drosophila melanogaster* (la drosophile), une étude a montré qu'une mutation dans la sous unité ϵ de l'ATP synthase conduisant à une réduction de la production d'ATP altérait la division embryonnaire [51]. En plus de l'ATP, la régulation calcique médiée par la mitochondrie joue un rôle clé dans la progression du cycle cellulaire [52].

vi. Chaîne respiratoire

La fonction la plus connue de la mitochondrie est la production d'énergie. La production d'ATP journalière est équivalente au poids de l'organisme [53]. Les complexes protéiques permettant la respiration cellulaire se situent au niveau de la MMI [54] (figure 3). La chaîne respiratoire, formée de ces complexes, permet une circulation d'électrons de complexe en complexe au sein de la MMI. Ces électrons entrent au cours de la réduction de coenzymes au niveau des complexes de la chaîne respiratoire et sont transportés de complexe en complexe par des transporteurs. Le transfert d'électrons s'accompagne du pompage de proton de la MM vers l'EIM, conduisant à une concentration élevée en ions H⁺ dans l'espace intermembranaire à l'origine d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la MMI cité plus haut sous le nom de $\Delta\Psi_m$ [24]. Ces ions H⁺ vont servir à la production d'ATP en entrant dans la matrice par le complexe ATP synthase. La différence de potentiel est essentielle au bon fonctionnement des mitochondries. Elle permet le fonctionnement des porines comme VDAC [29] et l'insertion des protéines telle que TIM22 [55]. En plus de cette différence de potentiel, l'activité de la chaîne respiratoire conduit à l'apparition de ROS (espèces réactives de l'oxygène). En faible quantité, les ROS ont une fonction physiologique pour les cellules en tant que molécules de signalisation cellulaire ou pour permettre la destruction d'agents pathogènes envahissants. En grande quantité, les ROS deviennent néfastes, induisant un stress oxydatif qui endommage protéines, ADN et lipides, et favorisent le vieillissement cellulaire et le développement de pathologies (cancers, maladies neurodégénératives...). Il existe donc un système de détoxification pour les éliminer. La détoxification est assurée par des antioxydants tels que l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Cette enzyme permet de convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui peut ensuite être éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase. Des enzymes de détoxification comme le cytochrome p450 peuvent aussi neutraliser les ROS. En conséquence, le niveau de ROS mitochondriaux est finement surveillé, tout comme le maintien du potentiel mitochondrial. Cette régulation est permise par un système de contrôle qualité des mitochondries complexe et varié.

vii. Une réponse au stress mitochondrial, introduction de l'apoptose

Un stress mitochondrial (augmentation des ROS, défaut de la chaîne respiratoire...) peut avoir des conséquences délétères ou pathologiques. Des mécanismes de protection permettant

de maintenir l'homéostasie mitochondriale et/ou la survie de la cellule, peuvent être induits dans ces conditions [56]. Toutefois, un stress prolongé peut aussi conduire à une perméabilisation de la MME. Cette perméabilisation permet la libération de facteurs de l'apoptose, une mort cellulaire programmée [57]. L'apoptose constitue un mécanisme de défense à l'échelle de l'organisme qui peut être activé physiologiquement, pour éliminer par exemple, des cellules inutiles ou endommagées par stress. Autre exemple, une accumulation persistante de calcium au niveau de la MM conduit à la formation de pores au niveau de la MME ce qui induit l'apoptose [58,59]. L'accumulation de ROS provoque un stress oxydatif, peut aussi être un facteur initiateur de l'apoptose [60]. De même, l'accumulation de protéines mal conformées initie le processus apoptotique, notamment par l'intervention de la voie UPRmt (mitochondrial Unfold Protein Response) [61]. Inversement, certaines cellules cancéreuses peuvent diminuer le stress mitochondrial en augmentant l'élimination des protéines mal conformées comme cela a été suggéré au cours de l'étude de la réponse UPR dans des cardiomyocytes [62]. La réponse apoptotique sera développée dans une section ultérieure.

En résumé, les mitochondries sont bien plus que de simples organites producteurs d'énergie. Elles sont essentielles tout au long de la vie de la cellule en influençant divers processus, tels que la production d'énergie, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et le stress oxydatif. Leur rôle central dans ces processus en fait des organites cruciaux pour la santé et la survie des cellules et, par extension, des organismes multicellulaires. Pour permettre aux mitochondries de s'adapter aux conditions changeantes, de maintenir leur fonctionnalité et de répondre aux besoins énergétiques de la cellule, le réseau mitochondrial est sujet à des réorganisations. Ce réseau peut prendre des formes plus réticulées ou punctiformes, permettant de connecter les mitochondries entre elles ou à l'inverse de les isoler. Ces modulations sont réunies sous le terme de dynamique mitochondriale.

c. Dynamique mitochondriale

La taille de ses compartiments et membranes varie selon les besoins des cellules. Cela inclut les variations entre les différents types cellulaires mais aussi au cours de la vie d'une seule et même cellule. Le pourcentage de mitochondries varie entre 10 à 40% (voir 0% notamment pour les érythrocytes) du volume d'une cellule [63]. Ici on parle de variations quantitatives mais on observe aussi des variations qualitatives avec l'exemple des neurones qui ont d'importants besoins en énergie au niveau de leurs extrémités axonales. Dans ces circonstances un réseau particulièrement étendu est obtenu pour permettre l'apport d'énergie jusqu'aux terminaisons axonales [64]. Ces événements caractéristiques sont dépendants d'une dynamique mitochondriale efficace.

La dynamique mitochondriale regroupe le processus de fusion et de fission mitochondriale. Ces deux processus forment un équilibre qui détermine la morphologie du réseau, sous forme punctiforme s'il penche vers la fission ou plus réticulé si la balance penche vers la fusion. Ces deux processus sont modulés par des GTPases appartenant à la famille des dynamines. Après avoir succinctement présenté la fusion, je m'intéresserai plus particulièrement à la fission mitochondriale et à la protéine DRP1 (Figure 6).

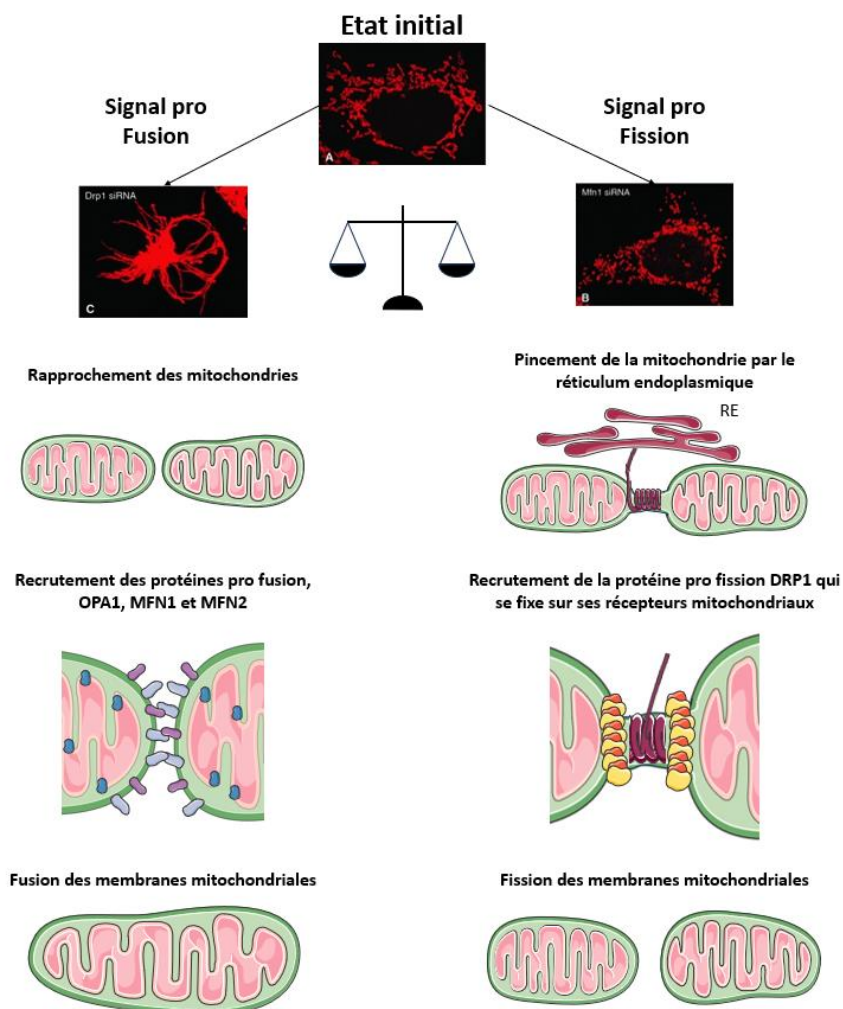


Figure 6 : La balance fusion fission mitochondriale. Image de Zhao et al. 2012 [65]. Les protéines du processus de fusion correspondent aux protéines OPA1 (bleu), MFN1 (mauve) et MFN2 (violet). Les protéines pro fission sont DRP1 (jaune) et les récepteurs de DRP1 (rouge).

La fusion

La fusion consiste en la formation d'une mitochondrie à partir de mitochondries plus petites. Deux protéines sont connues pour participer au processus de fusion mitochondriale : OPA1 (Optic atrophy 1) et MFN1/MFN2 (mitofusine1 or 2). Les protéines MFN sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Ce sont des GTPases qui nécessitent l'hydrolyse du GTP en GDP pour le rapprochement de deux membranes mitochondriales. L'énergie libérée conduit à une interaction homodimère ou hétérodimère [66]. La protéine OPA1 est présente au niveau de la MMI. Elle permet la fusion de la MMI [67] mais aussi l'organisation et le maintien des crêtes mitochondriales. Pour cela des hétéro- ou homodimères de OPA1 se lient pour former un pont entre deux membranes de crêtes adjacentes [68].

viii. La fission

La fission à l'inverse permet la formation de plusieurs mitochondries à partir d'une seule. DNM1L (DyNaMin 1 Like) aussi appelée DRP1 (Dynamain Related Protein) est la protéine majeure permettant la fission mitochondriale. Il s'agit d'une protéine majoritairement cytosolique quand elle est inactive. De nombreux facteurs le que Cdk1 (cycline dépendante kinase) et PKA (protéine kinase A) peuvent réguler DRP1 en phosphorylant la protéine [69–71]. Une fois activée, la protéine va se relocaliser à la membrane externe mitochondriale au niveau de récepteurs spécifiques. Elle va alors s'oligomériser pour former un anneau au niveau de la zone mitochondriale destinée à être sectionnée en utilisant son activité GTPase [72]. Le resserrement de cet anneau va conduire à la fission des MMI et MME.

L'état d'activation de DRP1 est régulé par des mécanismes post-traductionnels, en particulier des phosphorylations. En effet, DRP1 possède au moins neuf sérines phosphorylables [73]. Parmi ces sites, deux sérines sont particulièrement étudiées : S616 et S637. La phosphorylation de S616 permet le recrutement de DRP1 cytosolique vers la mitochondrie pour permettre son oligomérisation. La phosphorylation de ce site est majoritairement associée à une fission mitochondriale. À l'inverse une phosphorylation au site S637 conduit à une diminution de l'activité GTPase de DRP1 [74] et donc à la fusion de la mitochondrie. L'hypothèse la plus couramment admise est que les événements de fission sont régulés par une augmentation de la phosphorylation de S616 et une diminution de la phosphorylation de S637.

Des récepteurs spécifiques à DRP1 sont présents sur la membrane externe pour lui permettre de s'y agglomérer. Les récepteurs les plus étudiés actuellement sont Mff (Mitochondrial fission factor), Fis1 (mitochondrial Fission protein 1) et Mid49/51 (mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa) [75–77].

En amont de l'activation de DRP1 et du processus de fission, des images de microscopie électronique ont montré que les tubules constituant le RE sont en contact et entourent la mitochondrie aux futurs sites de fission [78]. Cette étreinte se resserre permettant de réduire le diamètre de la mitochondrie et de rapprocher les extrémités de la MME. En 2021, Keel et *al.* [79] ont montré, en utilisant des cellules de singe que les lysosomes peuvent également être situés au niveau des zones de fission. Ils ont alors émis l'hypothèse que le lysosome, comme le RE serait

INTRODUCTION: La mitochondrie

capable d'initier la fission. De plus, ils ont identifié deux types de fission, respectivement aux extrémités et au centre de la mitochondrie.

Il existe un homologue de DRP1 chez la *Drosophila melanogaster*, Drp1, qui présente 60% d'identité avec la protéine humaine et un domaine GTPase. De nombreuses études montrent des résultats attestant du rôle de Drp1 dans la fission mitochondriale chez la *Drosophila melanogaster*. Ces études ont été faites à l'aide de surexpression de la protéine DRP1 humaine, de Drp1 étiquetée ou mutée, mais également par l'utilisation d'ARN interférant dirigés contre l'ARNm endogène. Ces données valident le modèle *Drosophila melanogaster* comme un bon modèle d'étude de la fission induite par Drp1 [80–82].

ix. Les fonctions de la dynamique mitochondriale

La fission mitochondriale permet l'isolement d'une section endommagée ou inutile de la mitochondrie. La fusion, quant à elle, a pour objectif l'augmentation de la surface de la membrane interne ou la dilution des dommages internes [83]. Ensemble ces deux processus participent à la régulation de nombreuses fonctions mitochondriales (Figure 7) :

- La réparation mitochondriale
- La biogenèse mitochondriale
- L'adaptation aux besoins énergétiques de la cellule
- Le transport des mitochondries à travers la cellule
- La gestion de la qualité mitochondriale
- La gestion de la réponse au stress

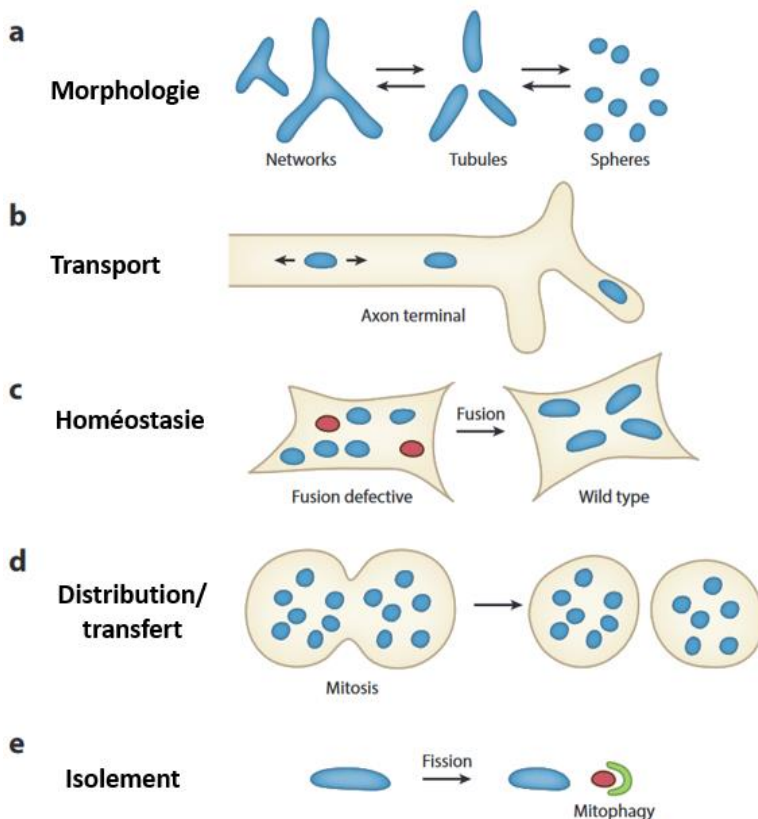


Figure 7 : Les fonctions de la dynamique mitochondriale. Adapté de Chan, 2020 [84]

a. La dynamique mitochondriale permet la modulation morphologique du réseau. b. La fission permet la formation de mitochondries de petite taille facilitant leur transport dans la cellule, notamment au niveau des axones. c. La fusion de mitochondries saines (bleu) et endommagées (rouge) permet de diminuer le taux de protéines endommagées et d'augmenter la tolérance aux dommages dans l'ADNmt. d. Au cours de la mitose, la fission des mitochondries permet une répartition équivalente des mitochondries entre les deux cellules filles. e. La formation de petites mitochondries est observée en amont du processus de mitophagie et permet la formation du mitophagosome.

De nombreux facteurs sont en capacité de moduler le réseau mitochondrial en agissant sur ces protéines. Beaucoup de ces facteurs peuvent être activés suite à l'apparition d'un stress mitochondrial [85]. Un exemple qui sera développé plus tard est le jeu de modifications post-traductionnelles de DRP1. Ces modifications permettent d'induire la fission lors de processus cellulaires tels que l'apoptose ou la mitophagie (élimination des mitochondries par autophagie), notamment au cours de processus développementaux. [86]. Ainsi, que ce soit chez la *Drosophila melanogaster* ou au cours des études effectuées chez les mammifères, un défaut de fission est délétère pour l'organisme. En effet, une perte de ces fonctions conduit à des pathologies multiples (Table 1) [87]. Pour limiter les risques et maintenir un réseau mitochondrial fonctionnel, des contrôles qualité sont mis en place.

d. Dysfonctionnement mitochondrial, contrôle et pathologie

Les maladies associées à un défaut mitochondrial

Au vu de l'importance des fonctions mitochondriales évoquées plus haut, une dérégulation de ces dernières peut avoir des conséquences néfastes sur la cellule. De même une dérégulation de la dynamique mitochondriale peut conduire à de multiples pathologies. Cette section n'a pas pour vocation d'être exhaustive mais juste de mettre en lumière l'impact de certaines dérégulations sur le développement de pathologies. Ici je n'évoquerai que certaines cardiomyopathies, myopathies et maladies neurodégénératives qui sont liées à une dérégulation de la dynamique mitochondriale. Beaucoup de revues publiées ces dernières années montrent les liens entre dérégulation de la dynamique mitochondriale et le développement de pathologie (Table 1).

Table 1 : Lien entre pathologies neurodégénératives et dérégulation de la dynamique mitochondriale					
Maladie	Modèle	Cause de la pathologie	Méthode de modulation de la dynamique mitochondriale	Conséquences	Références
<i>Maladies Neurodégénératives</i>					
Alzheimer	Souris	Mutation (CRND8)	Surexpression de Mdiv1	Restaure le phénotype mitochondrial sauvage et diminue l'accumulation de βA	[88]
		Mutation (Tau)	Mutation hétérozygote de DRP1	Réduit le dysfonctionnement mitochondrial	[89]
Parkinson	Cellules humaines	Induction (a-syn)	Surexpression de Mfn2	Diminution des mouvements mitochondriaux dans les neurones	[90]
	Souris	Mutation (PINK1)	Mutation DRP1	Restaure le phénotype neuronal et la libération synaptique	[91]
		Induction (MPTP)	Surexpression Mdiv1		
		Induction (MPTP)	Inhibition DRP1	Protège les cellules neuronales de la mort cellulaire	[92]
Mutation (a-syn)	DRP1 endogène	Le profil de phosphorylation de DRP1 est altéré conduisant à la diminution de la fission	[93]		
Huntington	Cellules de patient	Génétique (polyQ)	Interaction de la protéine Huntington mutée avec DRP1	Augmente l'activité GTPase de DRP1 et la fragmentation, est réversible avec un mutant DRP1	[94]
	Souris	Mutation (Htt)		Augmente l'activité GTPase de DRP1 et augmente la fragmentation mitochondriale	[95]
			Inhibition DRP1	Améliore la locomotion mitochondriale et diminue la neuropathie	[96]
			Mutation de Mff	Aggrave le phénotype neurologique : perte de neurone et neuroinflammation.	[97]

Maladies musculaires

Au niveau cardiaque, de nombreuses études chez la souris montrent que des altérations des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale conduisent à des altérations multiples du muscle cardiaque [98]. Plus spécifiquement, au niveau du cœur humain, l'étude d'échantillons de cellules de patients atteints de cardiomyopathie a montré un taux plus faible de la protéine OPA1 et plus élevé des protéines Mfn1, Mfn2 et DRP1. Cette dérégulation s'accompagnait d'une altération de la morphologie mitochondriale avec des mitochondries plus petites et plus nombreuses [99]. Dans des cellules musculaires squelettiques, un défaut des facteurs de fusion mitochondriale tels que Mfn1 et 2 est associé à une diminution des performances motrices chez la souris [100]. À l'inverse, un défaut de fission par une réduction de Drp1 et Fis1 conduit à une atrophie musculaire [101]. Enfin, une variation du niveau de DRP1 seule, altère le développement et la croissance musculaire [102].

Maladies neurodégénératives

De nombreuses maladies neurodégénératives présentent des altérations de la dynamique mitochondriale. Dans certains cas c'est la mutation d'un gène spécifique qui est associé à la maladie. C'est le cas d'un sous-type de la maladie de Charcot Marie Tooth (CMT). La CMT est la maladie neurodégénérative d'origine génétique avec la plus haute prévalence (1/5.000). Depuis 2004, un sous-type de la maladie, le type 2A a été associé à une mutation dans le gène codant MFN2 ce qui a été confirmé par des études faites sur des souris [103,104]. De même l'Atrophie Optique dominante qui est la maladie optique héréditaire la plus commune, causée par une perte de cellules ganglionnaires de la rétine est associée à de nombreuses mutations affectant des gènes de la famille des protéines OPA. La plus pertinente est une mutation dans le gène OPA1 qui conduit à une dérégulation d'évènements mitochondriaux [105,106].

D'autres pathologies neurodégénératives semblent impactées par une dérégulation de la dynamique mitochondriale. Ces études ont été réalisées dans des organismes modèles atteints de la pathologie ou dans des cellules de patients. Dans la maladie d'Alzheimer on observe une accumulation de Beta Amyloïde (β A) sous forme de plaques. Cette protéine est issue de la protéine précurseur APP (Protéine Précurseur de l'Amyloïde). Une accumulation de ces protéines dérégule la balance entre fission et fusion en induisant un excès de fragmentation [107]. L'utilisation d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, a montré que la diminution de la fission, en surexprimant la protéine inhibitrice de fission Mdiv1 (Mitochondrial division inhibitor 1) ou en induisant une mutation de la protéine DRP1, permet de réduire le dysfonctionnement mitochondrial cérébral ou de restaurer un phénotype mitochondrial sauvage [108] [89]. Ainsi, diminuer la fission permet d'atténuer une partie des altérations mitochondriales causées par l'induction de la maladie d'Alzheimer dans des modèles de laboratoire.

Par ailleurs, la maladie de Parkinson conduit à une dégénérescence des neurones dopaminergiques. On observe également une amélioration neuronale en inhibant la fission mitochondriale [91]. Dans la même étude, la mutation de DRP1 et la surexpression de Mdiv1 sont faites chez des souris où la maladie a été induite par MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, neurotoxique induisant des symptômes similaires à la maladie de Parkinson)

INTRODUCTION: La mitochondrie

ou des modèles de la maladie obtenue en mutant les gènes codant les protéines PINK1 (PTEN Induce Kinase 1) ou l' α -synucléine. On observe le même effet sur la restauration d'un phénotype sauvage et l'augmentation de la libération synaptique. En utilisant P110, un inhibiteur pharmacologique de DRP1, on observe une protection face à la mort neuronale chez les souris malades [92]. Néanmoins, ces résultats présentent des contre-exemples comme une étude des neurones de souris atteintes de la maladie de Parkinson. Cette étude montre une altération de la phosphorylation de DRP1 qui conduit à une diminution de la fission mitochondriale [93]

Enfin, la maladie de Huntington est causée par des mutations conduisant à une protéine Htt (Huntingtin) défectueuse. Il a été observé chez les patients atteints que cela induisait une augmentation de la fission mitochondriale neuronale. Cette fission pourrait être provoquée par l'interaction de Htt avec DRP1 comme cela a été observé dans des cellules de patients et confirmé chez des souris modèles de la maladie de Huntington [94,95]. Au cours de la recherche de traitements, des tests ont été effectués avec la protéine P110 cela induit une amélioration de la locomotion et diminuent les signes de neuropathie [96]. Enfin, de façon cohérente, les signes de la maladie sont aggravés par une mutation de la Mff [97].

Pour finir, parmi les nombreuses fonctions mitochondriales évoquées, l'apoptose est un mécanisme essentiel, notamment pour la protection contre les cancers [109,110]. En effet, l'acquisition d'une résistance à la mort cellulaire constitue une étape clé du développement tumoral. Or, des événements affectant la dynamique mitochondriale et les facteurs qui la contrôlent sont impliqués dans l'apoptose. Leurs fonctions incluent la modulation de la morphologie du réseau mitochondrial mais aussi l'activation de facteurs apoptotiques. Cette partie sera développée plus loin.

Pour limiter le développement de ces nombreuses pathologies et garder la mitochondrie fonctionnelle, il existe de nombreuses voies de contrôle qualité de la mitochondrie.

i. Les voies du contrôle qualité mitochondriale

Ces contrôles sont interconnectés et concomitants ce qui optimise leur efficacité. Ils ont un impact à différents niveaux et différentes localisations mitochondriales. Nous allons les voir en partant du contrôle le plus interne (à l'échelle de la protéine mitochondriale) au contrôle le plus externe (à l'échelle de la cellule, impliquant l'organe entier) [111–113] (Figure 8).

Au sein des mitochondries, des protéases ont pour rôle d'éliminer les protéines endommagées mais aussi de permettre la maturation des facteurs nécessitant un clivage post-traductionnel. Ce contrôle s'applique aux protéines codées par le génome nucléaire mais également mitochondrial. PARL (presenilin associated rhomboid like protein) est une sérine protéase, présente chez la drosophile et les mammifères, localisée au niveau de l'EIM [114]. Chez les mammifères sa fonction est essentielle au clivage des substrats impliqués dans des voies mitochondriales variées : la mitophagie (PINK1 [115], l'apoptose (Smac/Diablo, (diablo IAP-binding mitochondrial protein)) [116] ou la nécroptose (PGAM5 (PGAM Family Member 5)) [117].

Dans la MM, la régulation du stress passe notamment par la famille de protéines Lon parmi lesquelles la protéase LONP1 (Lon peptidase 1) est particulièrement importante car elle a plusieurs fonctions au niveau de la MM. Elle joue à la fois le rôle de protéase à sérine, de protéine

chaperonne et enfin elle peut se fixer sur l'ADNmt pour réguler son nombre de copies [118]. Grâce à ces différentes fonctions, elle participe à de nombreux processus mitochondriaux : la production d'énergie, la réponse à l'hypoxie [119], la régulation de l'hème [120], ou la mitophagie [121].

Au niveau de la MME, on observe aussi des contrôles en amont de l'entrée des protéines dans l'organite. Le MAD (mitochondrial associated degradation) permet la dégradation des protéines non fonctionnelles ou partiellement synthétisées dans le cytosol au niveau des translocases (ici TOM). Ce système est très similaire à la réponse ERAD (ER-Associated-Degradation) observée au niveau du réticulum endoplasmique. Ces protéines sont adressées au protéasome pour dégradation [122]. Les protéines mal conformées peuvent aussi être adressées au protéasome par l'intermédiaire de la réponse UPS (Ubiquitin-Proteasome-System). Il s'agit de l'ajout de chaînes de poly-ubiquitines par des E3 ubiquitines ligases tel que MARCH5 (aussi appelée MITOL) aux protéines endommagées, ce qui permet leur adressage au protéasome [123].

Au niveau de l'organite on observe localement des bourgeonnements de MME avec ou sans MMI qui forment des vésicules. Ces « mitochondrial-derived vesicles » (MDVs) peuvent être prises en charge par un système de dégradation spécifique aux mitochondries : la mitophagie, une forme de macroautophagie, qui conduira à leur adressage aux lysosomes pour qu'elles y soient dégradées.

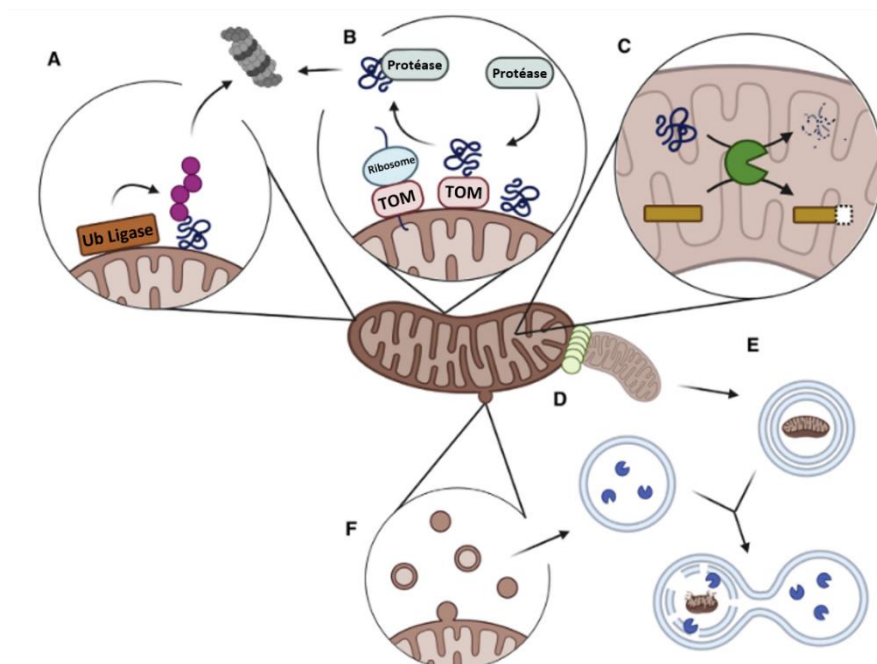


Figure 8 : Mécanismes de contrôle qualité mitochondriale. Modifié d'après Yoke Wui Ng, Wai et Simonsen, 2021 [111]. Contrôle qualité au niveau de la membrane externe (A. et B.) A. Contrôle des protéines mal conformées par la voie UPR. Ajout d'ubiquitine sur les protéines mitochondriales induisant leur adressage au protéasome. B. Voie MAD, blocages de protéines mal conformées au niveau des transporteurs et adressage au protéasome. Au niveau interne de la mitochondrie C. Dégradation protéique en interne par des protéases. Elle permet de protéger la mitochondrie de protéines pathologiques mais c'est également un système de régulation. Contrôle qualité au niveau de l'organite (D., E. et F.). D. Elimination par fission de la section mitochondriale endommagée. E. Dégradation de la section mitochondriale isolée par mitophagie. F. MDVs, vésicules formées à partir de la MME et destinées à être dégradées.

2 La mitophagie, un recyclage sélectif

a. De l'autophagie sélective à la mitophagie

La mitophagie est définie comme l'élimination d'une section mitochondriale par autophagie.

L'autophagie est un processus spécifique aux eucaryotes qui consiste en l'autodigestion d'éléments cellulaires permettant leur élimination. Ces éléments peuvent être des organites endommagés ou inutiles, des éléments pathogènes ou des protéines mal conformées. La définition la plus exacte de l'autophagie, donnée par le Professeur Christian Duve, est l'adressage d'un élément au lysosome. Le lysosome est un compartiment acide composé d'enzymes de dégradation telles que les hydrolases. La manière dont les éléments vont atteindre le lysosome détermine la forme d'autophagie. Quatre formes ont été décrites : la macroautophagie, l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA), la microautophagie, et la crinophagie [124] (Figure 9). Ces différentes formes présentent les caractéristiques suivantes :

- La crinophagie est peu connue [125]. Elle permet l'élimination des granules de sécrétion non sécrétés par la cellule. Ces granules fusionnent directement avec le lysosome pour permettre la dégradation de leur contenu.
- L'autophagie médiée par des chaperonnes concerne uniquement des protéines solubles. Ces dernières possèdent une séquence spécifique reconnue par la chaperonne HSC70 qui est capable de les adresser au lysosome pour permettre leur dégradation si cela est nécessaire [126]. Un canal, formé par Lamp2A est présent sur la membrane du lysosome pour permettre le passage des protéines vers la lumière du lysosome où elles seront dégradées [127].
- Le troisième type d'autophagie est la microautophagie. Une partie de la membrane du lysosome s'invagine pour créer une petite vésicule internalisant une partie du cytoplasme. Ce processus est le plus souvent retrouvé dans les cellules végétales et chez les levures [128].
- Enfin le processus le plus documenté est la macroautophagie (Figure 9). Il est initié par une invagination d'une double membrane appelée phagophore. Cette membrane va s'allonger et se refermer pour contenir une partie du cytosol, des protéines, ou encore une section d'organite, etc. Cette nouvelle structure prend le nom d'autophagosome [129]. Elle est formée grâce à l'intervention des protéines Atg (Autophagy related gène). L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former l'autophagolysosome où le contenu va être dégradé [130].

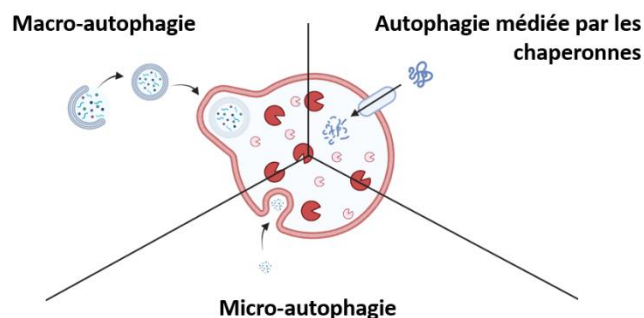


Figure 9 : Schéma succinct des mécanismes autophagiques. L'autophagie sélective, non présentée ici, est une sous-catégorie de la macro-autophagie

L'autophagie est un mécanisme particulièrement conservé au cours de l'évolution et qui s'effectue en plusieurs étapes retrouvées chez de nombreux organismes [131] (Figure 10). La première est l'initiation de la formation de l'autophagosome à partir du phagophore. Il est issu de petites sections de membranes dont l'origine peut être diverse (organite ou membrane plasmique) et dont la formation reste un mécanisme complexe [132]. La formation est initiée par un complexe de protéines incluant les protéines Atg. Ce phagophore est issu de l'isolement des membranes pour générer des structures vésiculaires. Cette étape inclut notamment la protéine Beclin 1 qui est essentielle à cette formation et impliquée dans la plupart des événements de macroautophagie [133,134]. Ensuite, la membrane subit une étape d'élongation médiée encore une fois par des protéines de la famille Atg. Un complexe formé de différentes protéines Atg, va cliver la protéine LC3-I (microtubule associated protein1 light chaîne 3) pour former le LC3-II permettant la translocation de cette protéine au niveau des membranes de l'autophagosome [135]. Le complexe Atg active également GABARAP (Gamma-aminobutyric acid A receptors). LC3 et GABARAP sont deux homologues de la protéine Atg8 de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils sont nécessaires pour la fixation des récepteurs de l'autophagie (FUNDC1 (FUN14 domaines-containing 1), BNIP3 (BCL2/adénovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3), CCPG1 (cell-cycle progression gene 1), ect...) et des adaptateurs de l'autophagie, aussi appelés récepteurs cargos (p62 (SQSTM1, sequestrosome 1), NBR1 (NBR1 autophagy cargo receptor), OPTN (optineurin), TAX1BP1 (Tax1 binding protéine), ect...). Enfin la dernière étape est la maturation qui permet la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et donc la dégradation de son contenu.

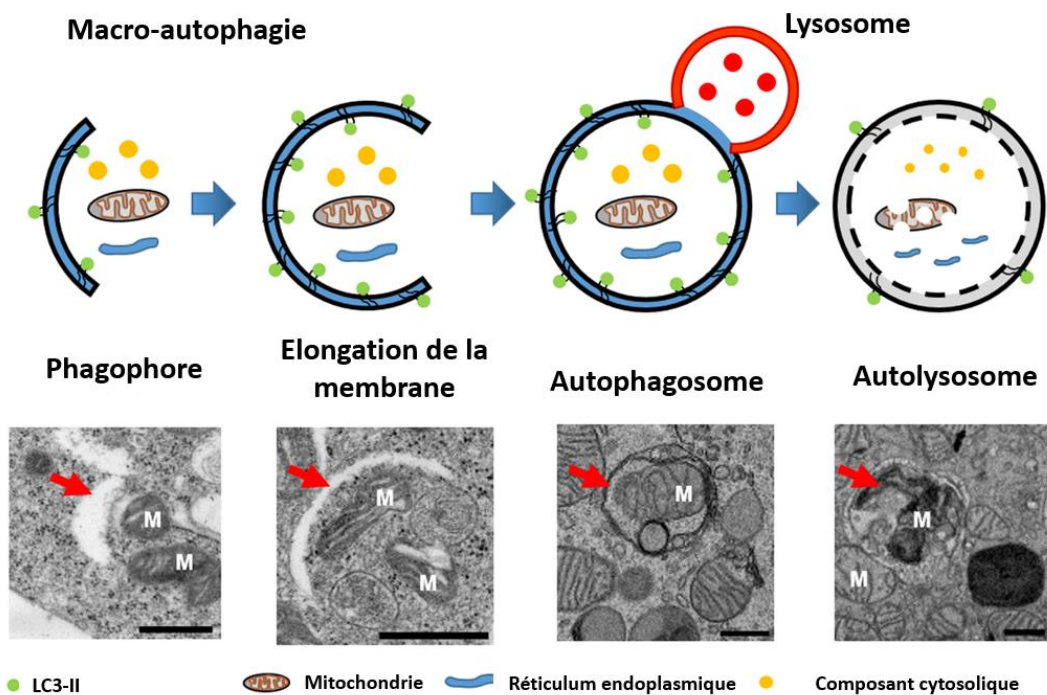


Figure 10 : Schéma simplifié et image par microscope électronique à transmission de processus macroautophagiques. Modifié d'après Jung, Minkyoo, Hyosun Choi, et Ji Young Mun, 2019 [136] . L'autophagie est un processus à multiple étapes. Quatre grandes étapes sont ici décrites : l'isolation membranaire, l'élongation de la membrane du phagophore, la maturation et fusion avec le lysosome et enfin la dégradation du compartiment.

INTRODUCTION : La mitophagie

La mitophagie permet l'élimination d'une section mitochondriale. En amont du processus, des évènements de fission mitochondriale sont observés. Ils permettent de faciliter l'isolement des mitochondries qui seront dégradées. La perte de la protéine DRP1 induit une diminution voire une inhibition de la mitophagie [83,136–138]. Les protéines pro-mitophagies sont capables d'induire cette fission. Par exemple, BNIP3 induit la relocalisation à la mitochondrie de DRP1, ce qui favorise le recrutement de la protéine Parkin à la MME [139]. En condition d'hypoxie, FUNDC1 est nécessaire pour le recrutement mitochondrial de DRP1 qui permet la mitophagie [140].

Pour la suite nous nous intéresserons plus spécifiquement à la mitophagie qui est une des formes de macroautophagie. La mitophagie est un évènement physiologique qui est également associé à de nombreuses pathologies.

b. Le processus de mitophagie

Les voies de régulation de la mitophagie peuvent se classer en deux catégories en fonction des récepteurs utilisés, indépendante ou dépendante de l'ubiquitine. Ces voies fonctionnent seules ou elles peuvent interagir entre elles. Ici nous présentons quelques exemples de protéines identifiées chez les mammifères [141] et leur fonctionnement (Figure 11).

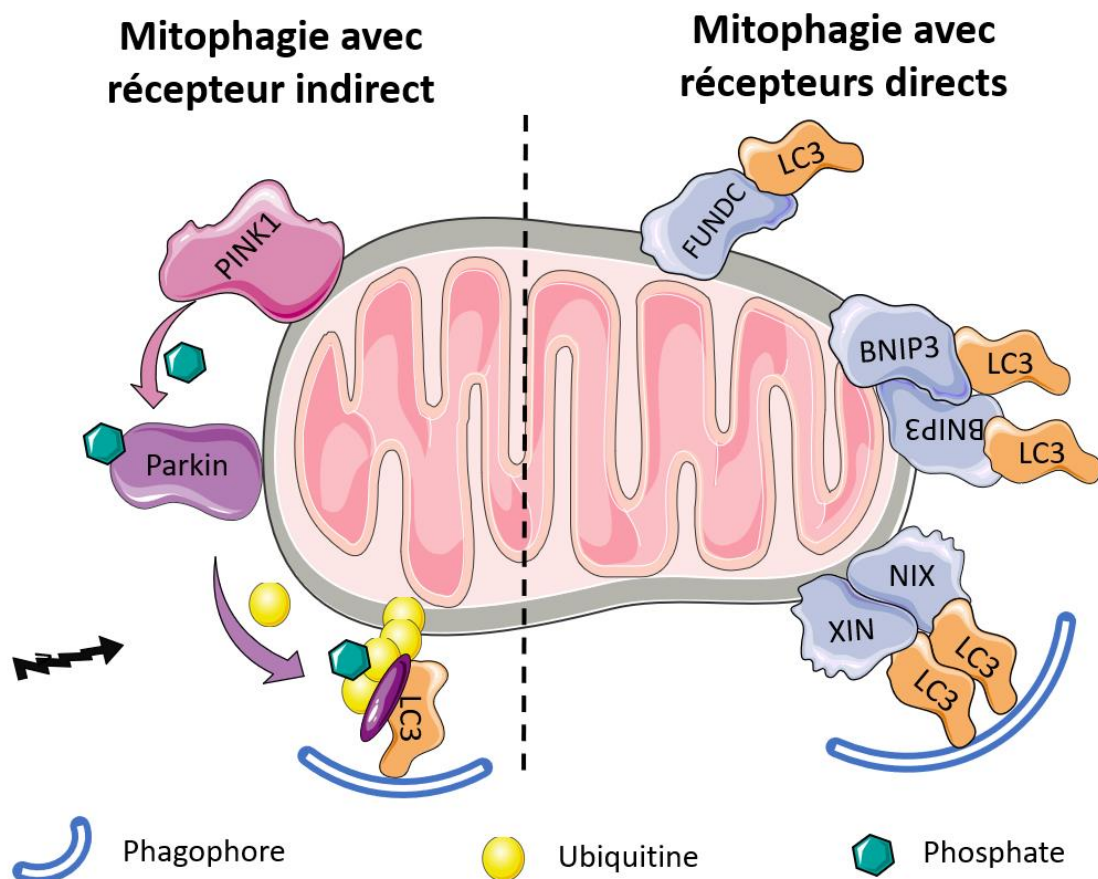


Figure 11 : Les différents inducteurs de mitophagie. La mitophagie indirecte est permise par PINK1 et Parkin. Ce mécanisme induit la formation d'une chaîne d'ubiquitines reconnue par un adaptateur, tel que p62 (ici en violet) et capable de se lier à LC3. Pour la mitophagie directe, on trouve notamment FUNDC, BNIP3 ou encore NIX/BNIP3L, capables de directement lier la protéine LC3 par leur domaine LIR.

s

Récepteur direct/ receptor mediated mitophagy

Les récepteurs directs sont capables de se lier à LC3-II localisé sur la membrane du phagophore sans l'intermédiaire d'une protéine. Ces récepteurs présentent des caractéristiques communes. Ils sont transmembranaires, situés au niveau de la MME et possèdent un domaine AIM (Atg8 interactif domain) ou un motif LIR pour « LC3-interacting region » (Figure 12).

Nix/BNIP3L

NIX (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like) est composée de trois domaines importants pour la mitophagie [142]. Elle possède une séquence transmembranaire, qui permet son insertion dans la MME, un domaine LIR situé en C-terminal, qui permet son interaction avec LC3-II [143]. Des expériences de mutagenèses successives ont montré que la mutation de ce domaine affecte la capacité de NIX à induire de la mitophagie [144]. Les éléments régulateurs de NIX sont encore peu connus, cependant il a été observé que l'hypoxie peut moduler le taux de transcrits de *Nix* par l'intermédiaire du facteur HIF1A (facteur inductible par l'hypoxie) [145]. D'autres facteurs de transcription pourraient être nécessaires pour observer cette variation comme cela a été montré avec p53 (Cellular tumor antigen p53, un suppresseur de tumeur induite par l'hypoxie) ou encore avec E2F1 connu lui aussi pour ses fonctions de régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose [146,147]. Les connaissances actuelles tendent à montrer que la mitophagie induite par NIX nécessite sa présence au niveau de la MME. Néanmoins la protéine semble être ubiquitaire et elle est présente à la surface de la majorité des mitochondries. Il est donc envisagé que la mitophagie induite par NIX soit dépendante de modifications post-traductionnelles (MPT). En effet, NIX possède de nombreux sites ubiquitylés ou phosphorylés. Parmi les kinases phosphorylant NIX, CK2 une kinase très active chez les mammifères, est capable de phosphoryler entre une et trois sérines de la protéine NIX chez l'Homme [148]. CK2 est également capable de phosphoryler une autre protéine inductrice de mitophagie, FUNDC1 [149].

FUNDC1

FUNDC1 est une protéine réceptrice qui nécessite un état de phosphorylation spécifique pour favoriser son interaction avec LC3-II puis induire la mitophagie [150]. Des expériences *in cellulo* ont montré un impact de l'inactivation de la protéine FUNDC1 sur la conversion de LC3-I en sa forme active LC3-II. Elle est induite en condition d'hypoxie alors qu'aucune variation n'est observée en condition de carences en nutriments [151]. De nombreuses études se sont intéressées au rôle de FUNDC1 en situation de stress mitochondriale. Il a ainsi été montré par immunoprécipitation que FUNDC1 interagissait avec les protéines de la dynamique mitochondriale, en particulier DRP1 et OPA1 [152]. Dans la même étude, il a été montré que l'absence de FUNDC1 conduit à une augmentation de la fission mitochondriale. Plus récemment, il a été observé que dans des cellules HeLa en condition d'hypoxie, FUNDC1 est présent au niveau des MAMs et faciliterait la fission *via* le recrutement de DRP1 [140].

INTRODUCTION : La mitophagie

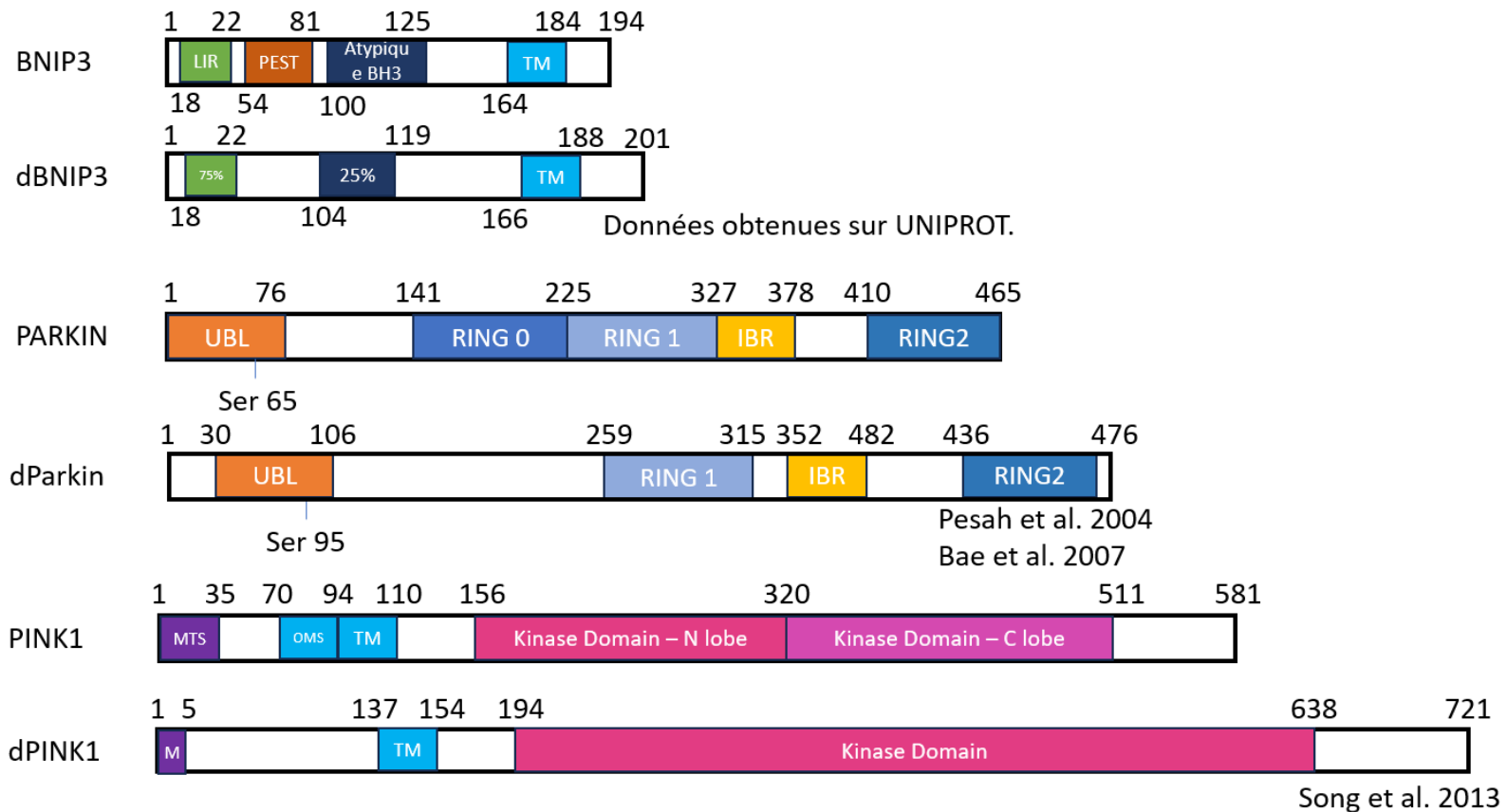


Figure 12 : Comparaison des structures primaires des protéines BNIP3, Parkin et PINK1 humaines et du modèle drosophile. [153–155] Malgré la faible conservation, ces protéines présentent des domaines similaires chez les deux organismes. Pour BNIP3 les domaines LIR et BH3 sont relativement conservés. Il en va de même pour Parkin et PINK1. Parkin est une ubiquitine ligase composée de plusieurs domaines : un domaine UBL, trois domaines RING (Really Interesting New Gene) et un domaine IBR (In Between Ring domain). L'activation de Parkin par PINK1 se fait par phosphorylation de la serine 65 dans le domaine UBL. PINK1 est une protéine composée d'une séquence d'adressage mitochondrial (MTS), d'une séquence de localisation à la MME associée à un domaine transmembranaire (OMS et TM). Son domaine kinase est divisé en deux parties avec un lobe N et un lobe C.

BNIP3

BNIP3 (BCL2/adénovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) présente une structure très proche de celle de NIX/BNIP3L. Comme elle, BNIP3 possède un domaine BH3 (Bcl-2 Homologue) atypique et un domaine LIR. BNIP3 a été initialement identifiée comme une protéine pro-apoptotique atypique en raison de son domaine BH3 et sa capacité à lier les protéines de la famille Bcl-2 [156–158]. De toutes les protéines citées précédemment, la régulation de la mitophagie et de l'apoptose par BNIP3 demeure la mieux caractérisée. Le choix entre les deux voies est le plus souvent déterminé par les modifications post-traductionnelles de BNIP3 [159,160]. De plus, il a été montré que les deux fonctions de BNIP3 peuvent être régulées de manière indépendante, permettant une alternance entre un rôle pro-survie et pro-apoptose [161].

BNIP3 a plus récemment été associée à la mitophagie. En étudiant le rôle de BNIP3 dans des lignées cellulaires cancéreuses (issues de gliomes), une augmentation de l'autophagie a été observée lors d'une surexpression de *BNIP3* [162,163]. Comme NIX son activation est dépendante de son état de phosphorylation. En effet, les extrémités du domaine LIR peuvent présenter des phosphorylations, entraînant une augmentation de la mitophagie [160]. Une fois activée BNIP3 forme un homodimère au niveau de la MME pour permettre à LC3-II de se fixer sur la protéine [164]. En s'intéressant plus spécifiquement au rôle pro-autophagie, une étude montre que la surexpression de *BNIP3* au niveau des cellules musculaires cardiaques augmente l'autophagie et la dégradation mitochondriale [165]. De plus, la mitophagie induite par BNIP3 est diminuée si l'expression de DRP1 est diminuée par des ARN interférents. DRP1 est également transloqué à la mitochondrie par la protéine BNIP3 et l'activation de DRP1 est nécessaire pour observer de la mitophagie. À l'inverse, la surexpression de *Mfn1* prévient la mitophagie BNIP3-dépendante [139]. Enfin, l'interaction entre BNIP3 et OPA1 conduit à une inhibition la fusion mitochondriale [159].

Des études ont également été réalisées chez la drosophile où BNIP3 est aussi appelée BBH1 (BAD/BNIP3 homologie 1, CG5059) [166]. La surexpression de *BNIP3* humaine dans les neurones de drosophile induit une protection neuronale contre les dommages liés au vieillissement et une augmentation de l'espérance de vie des individus. Toujours chez la drosophile, la surexpression de *BNIP3* humaine diminue la quantité de caspases activées et donc de cellules neuronales détruites, alors que la mitophagie augmente [167]. La protéine BNIP3 chez la drosophile présente 25% d'homologie avec la protéine humaine (Figure 12) et un domaine BH3 atypique. Une étude chez la drosophile suggère que BNIP3 joue un rôle dans la mort cellulaire au niveau des cellules musculaires qui serait inhibé par la protéine Achéron/LARP6 en bloquant sa relocalisation à la membrane mitochondriale [166]. Elle présente également un rôle dans la sélection des mitochondries au niveau des cellules germinales pour éviter l'accumulation de dommages [168]. Enfin une augmentation de la transcription de son gène en parallèle d'une augmentation de l'autophagie [169]. BNIP3 apparaît donc comme une protéine aux rôles variés. Elle induit la mort cellulaire chez les mammifères et la drosophile. Son rôle pro-mitophagie validé dans le modèle mammifère doit être confirmé chez la drosophile.

Chez les mammifères, en plus de son action directe, le récepteur BNIP3 aurait aussi la capacité d'induire la mitophagie médiée par les récepteurs indirects activés par les protéines PINK1 et Parkin [139,170]. Il peut également recruter Parkin au cours de la mitophagie [139].

INTRODUCTION : La mitophagie

Récepteur indirect/ubiquitin mediated mitophagy

Ces protéines qui induisent la mitophagie le font par l'intervention de chaînes d'ubiquitines. Elles sont reconnues par des récepteurs cargos tels que p62, OPTN et TAX1BP1. Ces protéines agissent comme des adaptateurs qui font le lien entre les LC3-II des phagophores et les chaînes d'ubiquitines. La formation de la chaîne d'ubiquitine est médiée par les protéines PINK1 et Parkin (Figure 13).

Parkin

En 1997 une mutation au niveau du locus 6q25.2-q27 a été identifiée et retrouvée chez de nombreux patients atteints de la maladie de Parkinson [171]. Le produit du gène incriminé prend le nom de Parkin [172]. La protéine est principalement cytosolique mais a pu être détectée au niveau du RE ou des mitochondries en cas d'activation [173]. Rapidement cette protéine est identifiée comme une ubiquitine ligase E3, une protéine capable d'ubiquitinyler des protéines à proximité [174,175]. Parkin est une protéine appartenant à la famille des RBR (Ring-between-Ring) des E3 ubiquitine ligases. Il s'agit d'une protéine composée d'anneaux de zinc successifs, des domaines en forme d'anneaux avec RING0, RING1 IBR et en N-terminal un domaine similaire à l'ubiquitine (Ubl, ubiquitin like)[176] (Figure 12). À l'état mature Parkin est auto-inhibée. La seule activation clairement identifiée concerne son domaine Ubl qui est également crucial pour les interactions avec les partenaires de Parkin [177]. L'activation de Parkin peut être faite par PINK1 qui phosphoryle la sérine 65 de Parkin située au niveau du domaine Ubl [178]. Contrairement à PINK1, Parkin ne possède pas de séquence d'adressage à la membrane mitochondriale. Des récepteurs localisés au niveau de la MME sont nécessaires à sa localisation mitochondriale. Par exemple, Mfn2 interagit avec Parkin lui servant ainsi de récepteur mitochondrial [179]. Un autre récepteur est la prohibitin 2 (PHB2), une protéine localisée à la membrane interne mitochondriale. Cette interaction nécessite la rupture de la MME induite par la dégradation de protéines sur la membrane [180].

Dans le but d'étudier le rôle de Parkin dans la maladie de Parkinson, de nombreuses études ont été effectuées chez des animaux modèles, en particulier la souris et la drosophile. Pour la souris, les différentes études ont montré que l'inactivation de Parkin seule conduit à un phénotype faible qui ne correspond pas à l'effet observé chez l'Homme. La drosophile quant à elle, présente une altération plus proche de ce qui est retrouvé chez l'Homme avec une altération sévère de la motricité et une forte réduction de la longévité. La drosophile présente une protéine Parkin proche de la séquence humaine avec 44,5% d'identité (Uniprot Align). En utilisant une souche mutée pour le gène *PRKN*, il a été observé une dégradation musculaire et des anomalies mitochondriales au niveau des cellules musculaires. En revanche, la perte de la protéine ne semble pas impacter les neurones en condition physiologique [181].

En s'intéressant plus spécifiquement à la mitochondrie, il a été montré d'une part que Parkin induirait de la fission mitochondriale et d'autre part qu'elle pourrait participer à la mitophagie. L'étude de la surexpression de *PRKN* dans des cellules HEK a montré que le découplage par du carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP) induit une relocalisation de Parkin à la membrane des mitochondries endommagées [173]. Pour confirmer que la relocalisation de Parkin induit de la mitophagie, des cellules HeLa sont utilisées pour étudier la localisation de LC3-II. L'ajout

de découplant conduit à une colocalisation de LC3-II, Parkin et des mitochondries. Ainsi, suite à une chute du potentiel mitochondrial, Parkin est relocalisée à la membrane mitochondriale ce qui conduit à des événements de mitophagie. Par ailleurs, Parkin agit aussi sur la dynamique mitochondriale. En effet, Parkin peut ubiquitinyler la protéine DRP1 pour induire sa dégradation [182]. Chez la drosophile, Mfn1 et Mfn2 sont ubiquitinylées par Parkin au cours du processus de mitophagie [183]. La régulation de Mfn2 par Parkin semble également utile pour médier les contacts RE/mitochondries [184].

Il est à noter que les nombreuses études sur la protéine ont permis d'identifier un effet pléiotropique de l'ubiquitine ligase Parkin. Elle possède un nombre important de cibles cellulaires qui lui permettent de réguler la mitophagie, la dynamique mitochondriale, l'apoptose, la biogenèse mitochondriale (PARIS, parkin interacting substrate), le cycle cellulaire (induit la dégradation de cycline) ou le métabolisme [185,186].

PINK1

PINK1 est une thréonine/sérine kinase cytosolique adressée à la MMI. PINK1 est principalement composée de trois domaines. Une séquence d'adressage mitochondriale en N-terminal (MTS), une courte séquence transmembranaire et enfin un domaine kinase [187] (Figure 12). En condition physiologique, PINK1 traverse les membranes mitochondriales en utilisant la translocase Tom70 pour atteindre la matrice mitochondriale et y être dégradée [188]. La séquence MTS est clivée par une peptidase mitochondriale MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) conduisant à une forme tronquée de 60 kDa. Le reste de la protéine est clivé par PARL au niveau de la MMI pour former une protéine de 52 kDa qui sera adressée au protéasome [189] conduisant à un niveau basal de PINK1 indétectable [187].

La mitophagie induite par Parkin semble en grande partie permise par son interaction avec la protéine PINK1. Dans des cellules HeLa, en absence de PINK1, Parkin n'est pas localisée à la mitochondrie, ce qui empêcherait l'induction de la mitophagie Parkin-dépendante [190]. Une interaction directe a été observée chez la drosophile, et l'inactivation de PINK1 peut être compensée par la surexpression de *PRKN* [191,192]. Les mêmes résultats sont observés dans des cellules humaines [193].

Comme pour Parkin, la protéine PINK1 (codée par le gène *PINK1*) présente un homologue de 69kDa chez la drosophile, Pink1. Les deux protéines présentent jusqu'à 40% d'identité en fonction de l'isomorphe ainsi qu'une structure et une fonction très proches. Le gène a lui aussi été associé à la maladie de Parkinson, indépendamment de *PRKN* [194]. Chez la drosophile, la perte de *PINK1* conduit à une diminution du nombre de neurones sous trente jours [195].

PINK1 présente également des liens forts avec les acteurs de la dynamique mitochondriale et la perte de la protéine peut conduire à une réorganisation du réseau mitochondriale. En particulier *DRP1*, dont la surexpression compense la perte de *PINK1* [196,197]. De plus, l'étude de l'état de phosphorylation de DRP1 en condition de surexpression de *PINK1* humain, par Western Blot chez la drosophile, suggère que PINK1 serait capable de phosphoryler Drp1 et Mfn2 directement [80,198]. Précédemment la phosphorylation était considérée comme indirecte [80,199]. À cela s'ajoute la capacité de PINK1 à phosphoryler Mfn2, soulignant les interconnexions entre PINK1 et la dynamique mitochondriale [200]. À l'inverse, une mutation de *Opa1* ou *Marf*

INTRODUCTION : La mitophagie

(Transmembrane GTPase Marf, homologue de la protéine Mfn2 chez la drosophile) supprime le phénotype induit par la perte de fonction de PINK1 [201]. Enfin PINK1 et Parkin collaborent pour induire la fission mitochondriale notamment en interagissant avec la protéine Marf . Dans ce contexte une mutation de *PINK1* ou *PRKN* conduit à un défaut de fission mitochondriale au niveau de la spermatogenèse. Ce défaut est accentué en cas de double mutation [202]. De plus, l'apparition de mitochondries sphériques observée lors de la perte de la protéine Pink1 peut être supprimée par la déplétion de la protéine pro-fusion Marf.

PINK1 semble également jouer un rôle indépendant de la mitochondrie en phosphorylant des protéines impliquées dans la survie cellulaire telle que Bcl-xl ou encore Miro (Mitochondrial Rho GTPase) [203,204]. De plus, une étude récente montre que dans des cerveaux de primates, la forme majoritaire de PINK1 est sa forme cytosolique (55kDa) qui présente un domaine kinase fonctionnel [205]. De plus, si PINK1 cytosolique ne semble pas induire de mitophagie. Toutefois elle semble tout de même capable de protéger les cellules neuronales de la dégénérescence [206–208].

PINK1 et Parkin dans la mitophagie

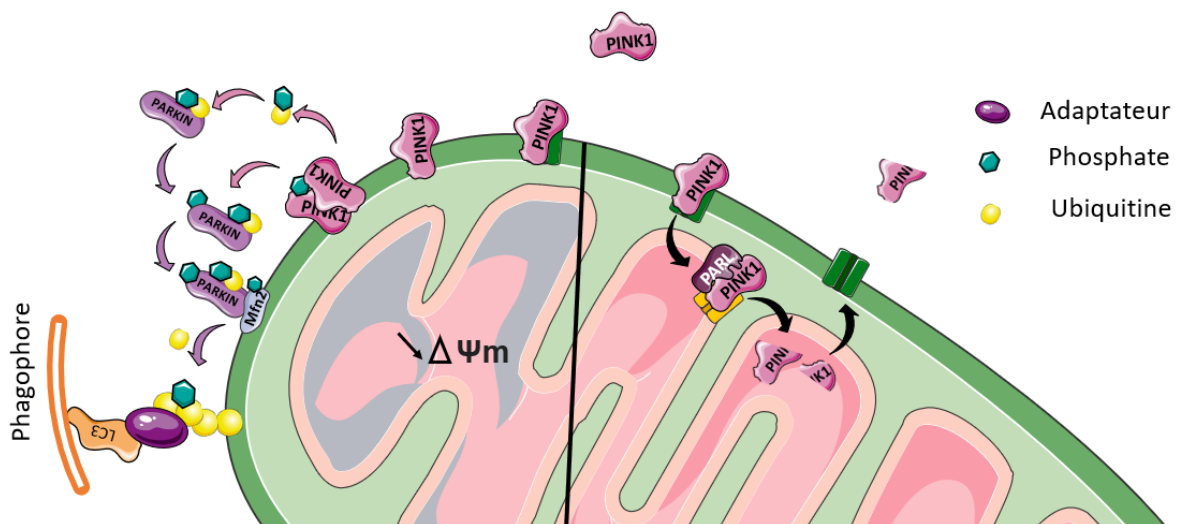


Figure 13 : La mitophagie induite par PINK1 et Parkin. En absence d'une dépolérisation de la membrane mitochondriale, PINK1 entre dans la mitochondrie est clivée par PARL au niveau de la membrane mitochondriale interne et est dégradée dans le cytosol. S'il y a une chute du potentiel membranaire, PINK1 s'insère dans la membrane mitochondriale externe, se dimérise et phosphoryle de nombreuses protéines dont Parkin. Parkin se relocalise à la membrane mitochondriale externe, et ajoute une chaîne d'ubiquitines à certaines protéines mitochondriales. Cette chaîne est reconnue par un adaptateur capable de lier LC3 du phagosome permettant à la mitochondrie d'être internalisée et adressée au lysosome.

Un stress tel qu'une chute de potentiel mitochondrial conduit à la stabilisation de PINK1 au niveau de la MME et à son accumulation [209] (Figure 13). À cette étape, PINK1 s'homodimérise et s'autophosphoryle, ce qui permet l'activation de sa fonction kinase. Cette activation permet également à la protéine de se lier aux ubiquitines et à la protéine Parkin pour l'activer par phosphorylation [210]. PINK1 a deux possibilités d'activation de Parkin, toutes deux *via* la phosphorylation de la sérine 65 située dans le domaine Ubl. La première est la phosphorylation directe de la sérine pour induire un changement de conformation et son activation. L'autre possibilité est la phosphorylation de l'ubiquitine sur la sérine qui permet de stabiliser Parkin sous

forme active [211–213]. Une fois activée, Parkin ubiquitinye de nombreuses cibles, cytosoliques ou au niveau de la MME. Ces ubiquitinations répétitives vont former des chaînes d'ubiquitine reconnues par les adaptateurs aussi appelées protéines cargos. Parmi ces adaptateurs, on peut citer les protéines p62 (*SQSTM1*, sequestrosome 1) (Ref2P chez la drosophile), OPTN ou encore TAX1BP1. Comme les protéines réceptrices citées pour la réception directe, ces protéines possèdent une séquence LIR mais également un domaine de liaison à l'ubiquitine, UBD (Ubiquitin Binding Domain) [214]. Elles vont se lier aux chaînes d'ubiquitine et au phagophore par l'intermédiaire des protéines de la famille ATG8 [215].

Indépendamment de la chaîne l'ubiquitine Parkin peut induire la mitophagie en ubiquitinylant d'autres cibles. On note notamment que p62 est identifiée dans l'ubiquitinylome de Parkin [186]. Or l'ubiquitination de p62 semble capable d'induire la fonction réceptrice de la protéine contrôlant l'autophagie spécifique [216]. Une autre cible ubiquitinylée par Parkin est la porine VDAC. Une étude chez la drosophile s'intéresse au niveau de phosphorylation de VDAC par un mutant ponctuel de Parkin. Cette mutation génère une protéine incapable de mono-ubiquitinyler mais capable de poly-ubiquitinyler VDAC. Dans ces circonstances, on observe une baisse de la mitophagie. La mitophagie semble donc spécifique à certain type d'ubiquitinylation [217].

Comme mentionné plus haut, la perte de *PINK1* peut être compensée par la surexpression d'autres gènes. Cette observation laisse entrevoir la possibilité d'une activation de Parkin indépendante de *PINK1*. Inversement, au cours des études sur les liens entre Parkin et *PINK1* dans l'induction de la mitophagie, il a été observé que *PINK1* peut induire une mitophagie indépendante de Parkin. [218]

Plusieurs études tendent à montrer que l'absence de *PINK1* ou Parkin n'a pas d'impact sur la mitophagie basale dans la majorité des modèles [219]. Cette notion de mitophagie basale est issue d'un classement des différents types de mitophagies physiologiques qui ont été observées dans plusieurs modèles.

PINK1 et Parkin dans le modèle drosophile

Les fonctions de Parkin identifiées dans le modèle drosophile sont proches de celles retrouvées chez les mammifères. La protéine apparaît comme un régulateur positif de la fission mitochondriale et négatif de la fusion mitochondriale [82,202,220]. Elle est activée suite à un stress oxydant [221,222] et exerce sa fonction d'ubiquitine ligase. Une grande partie de ces fonctions est conservée, à l'instar de sa capacité à moduler la biogenèse mitochondriale en interagissant avec des substrats homologues ou de son rôle de modulation de la fusion en induisant la dégradation de la protéine Marf (homologue de Mfn) [82,155,223–226]. Son partenaire *PINK1* est également étudié. Il a d'abord été identifié comme un modulateur de la dynamique mitochondriale et plus particulièrement de la fission mitochondriale [197,202,220,227] puis impliqué dans la régulation du transport axonal des mitochondries [228].

Le mécanisme d'action de ces protéines est très proche du mécanisme décrit chez les mammifères. En absence de chute de potentiel, *PINK1* est partiellement transloquée dans la membrane mitochondriale avant d'être clivée par Rho-7/PARL, (Rhomboid-7/Presenilin-associated rhomboid-like, une protéine mitochondriale) et le segment matriciel est dégradé par la peptidase

INTRODUCTION : La mitophagie

Lon [229]. Rapidement, le lien PINK1/ Parkin est établi. Il est notamment observé une compensation de la perte de PINK1 par la surexpression de *park*, plaçant Parkin en aval de PINK1 [191,195]. Il est également démontré qu'une interaction physique entre les deux protéines conduisant à la phosphorylation de Parkin par PINK1 permet l'initiation de son activation et sa relocalisation mitochondriale [82,227].

En ce qui concerne le processus de mitophagie chez la drosophile, il a été montré l'existence de mitophagie basale. Néanmoins cette mitophagie n'est pas dépendante de PINK1 et Parkin [230]. La surexpression de PINK1 ou Parkin semble permettre d'induire la mitophagie, comme cela a été montré dans une souche modèle de la maladie de Huntington [231]. Un défaut de mitophagie peut être compensé par la surexpression de *pink1* et *park*. De plus, l'induction d'un stress hypoxique ou un blocage de la chaîne respiratoire conduit à une induction de la mitophagie PINK1 et Parkin dépendante [232,233].

Ainsi, les protéines PINK1 et Parkin agissent suivant un mécanisme similaire chez la drosophile et ont un rôle conservé dans la mitophagie induite en cas de stress mitochondriale. Ces observations font de la drosophile un bon modèle pour étudier les fonctions de PINK1 et Parkin. Pour ce faire, outre l'utilisation de RNAi, des mutants pertes de fonctions ont été construits pour mieux comprendre les fonctions de Parkin et PINK1.

La perte de fonction de la protéine Parkin (*park*) conduit à 45% de mort pupale, une durée de vie excessivement courte, une stérilité chez les mâles et des défauts de locomotion. Au niveau cellulaire, ces mutants présentent une augmentation du stress oxydant et une activité métabolique faible comme le montre la diminution du taux d'ATP [234]. Enfin, au niveau tissulaire, une dégénérescence musculaire liée à une augmentation de l'apoptose est induite et au niveau neuronal, une altération structurelle des neurones dopaminergique est observée [181,235].

La perte de fonction de la protéine PINK1 est viable à l'état hémizygote et homozygote mais avec un nombre d'individu faible, stérile et présentant une durée de vie courte. Les mâles adultes portant la mutation à l'état hémizygote sont viables mais stériles. La majorité des individus atteints montrent une rigidité musculaire, un apprentissage et un cycle circadien altérés [191,195,236]. De plus, au niveau musculaire on observe une dégénérescence induite par apoptose, des défauts de morphologie mitochondriale (une augmentation de la fragmentation) et une augmentation de la sensibilité au stress oxydant [191]. La réduction du nombre de neurones moteurs dopaminergiques est associée à des défauts moteurs [192,236]. En plus des défauts moteurs, les mutants présentent une altération des synapses, de la transmission synaptique cérébrale et des jonctions neuromusculaires [237].

Pris ensembles, ces informations montrent que l'utilisation de la drosophile est pertinente pour l'étude des fonctions de PINK1 et Parkin.

c. La mitophagie physiologique et pathologique

Physiologique

Le rôle particulièrement important de la mitophagie souligne le besoin d'une régulation fine. Cette régulation est modulée par les événements cellulaires endogènes ou exogènes, physiologiques ou non. Pour cette raison, la mitophagie est une réponse mais également une conséquence d'un stress, une étape de maturation ou un besoin de la cellule (Figure 14).

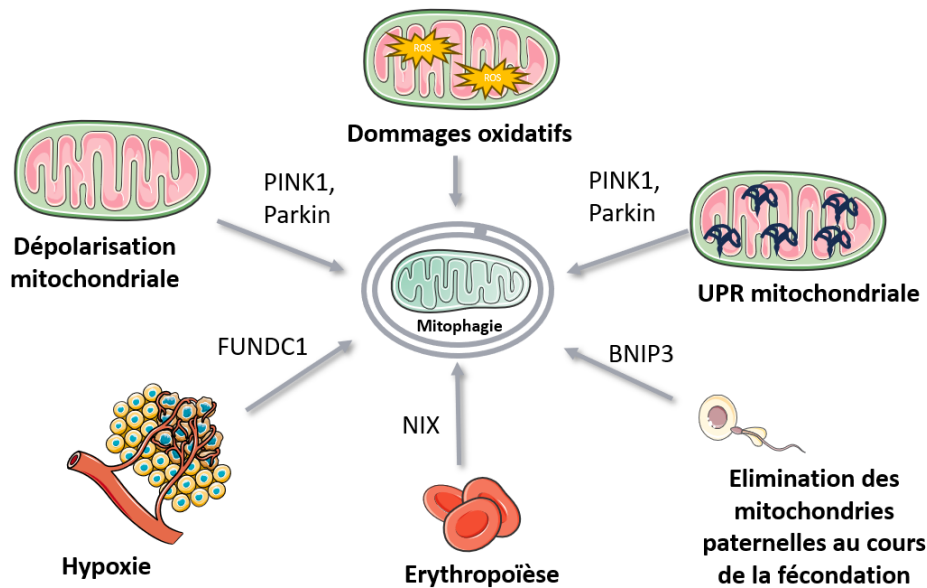


Figure 14 : Les rôles de la mitophagie au sein des cellules. Inspiré de Harper et al. 2018 [215]. La mitophagie est à la fois une réponse aux dommages et aux stress (dépolariastion, hypoxie, voie UPR) mais aussi un événement régulateur du développement (erythropoïèse ou élimination des mitochondries après la fécondation).

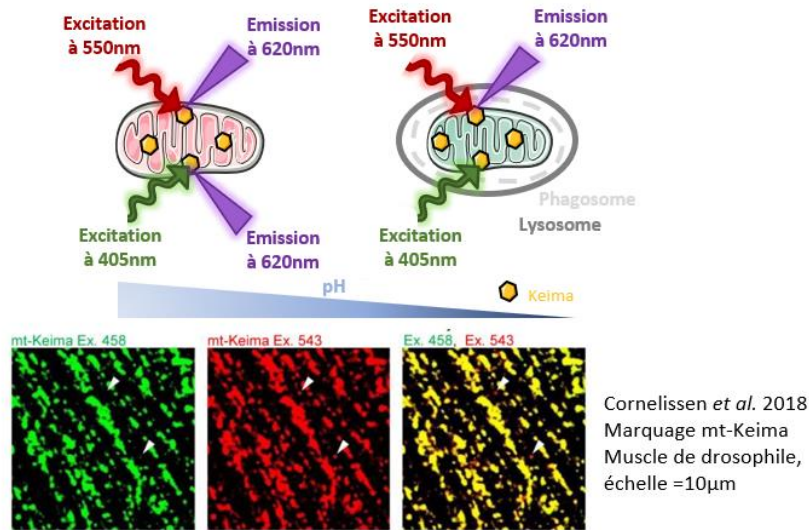
L'étude de la mitophagie en conditions physiologiques a subi un boom ces dernières années [238]. L'étude chez les mammifères est complexe car il n'existe actuellement pas d'inhibiteur spécifique de la mitophagie et il est difficile d'exclure d'autres voies de dégradation (induites par un autre inducteur). De plus, les mitochondries sont physiquement proches des autophagosomes, qu'elles soient internalisées ou non [239]. De nouveaux outils, mtKeima et mtQC, développés au cours de ces dix dernières années ont permis d'aller plus loin dans l'étude de la mitophagie (Figure 15). Depuis, trois classes de mitophagie physiologique ont émergé : la mitophagie basale, programmée et induite par un stress.

INTRODUCTION : La mitophagie

- **Mito-Keima (mt-Keima)**

Keima est une protéine fluorescente dépendante du pH (Katayama *et al.* 2011) et capable de résister à la dégradation par le lysosome. Cette protéine couplée à une séquence d'adressage à la matrice mitochondriale permet d'évaluer les résidus mitochondriaux dans les compartiments acides tel que le lysosome et dans le cytosol. L'excitation de la protéine dépend du pH. A pH neutre la protéine peut être excitée à 440 et 568nm alors que dans un environnement acide elle ne peut être excitée qu'à 568 nm.

Initialement la construction a été utilisée chez des souris transgéniques avant d'être transposée aux drosophiles en 2018 (Cornelissen *et al.* 2018, Sun *et al.* 2015).



- **Mito-QC (mt-QC)**

QC correspond à une construction binaire, un tandem mCherry-GFP. La séquence d'adressage mitochondriale vise la membrane externe mitochondriale. Dans le cytosol les deux fluorochromes sont stables mais à pH faible, la GFP s'éteint. On peut donc distinguer les mitochondries localisées dans le cytosol des mitochondries internalisées dans les lysosomes.

Comme Keima les premières constructions ont été utilisées chez la souris avant d'être transposées chez l'homme (Allen *et al.* 2013, McWilliams *et al.* 2016).

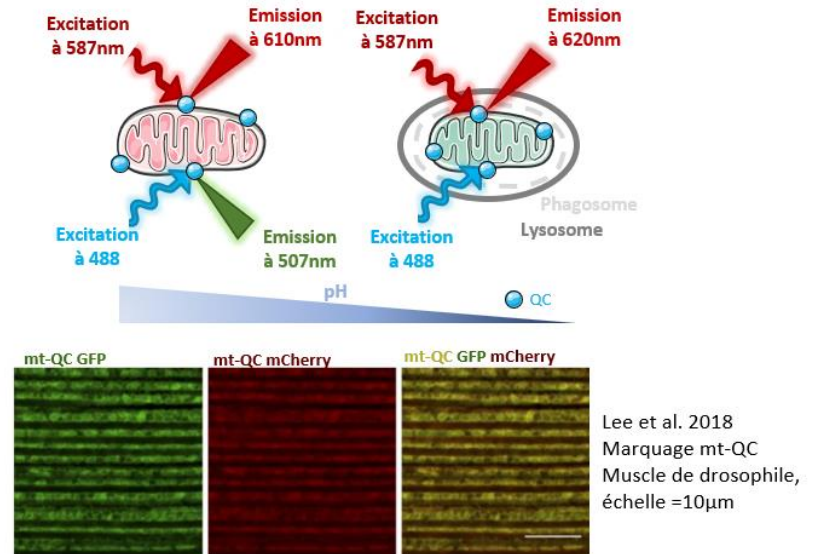


Figure 15 :Technique de détection de la mitophagie [233,240–242]

La mitophagie basale est une élimination régulière et constante des sections mitochondriales endommagées ou inutiles qui permet de garder une cellule saine. Ce processus continu a lieu dans de nombreux tissus [243]. Le taux de mitophagie varie en fonction du tissu étudié. Par exemple, un haut taux de mitophagie est observé dans le foie et le système nerveux. Inversement ce taux est plus faible dans le thymus ou la rate [242]. Pour mieux caractériser la mitophagie, l'équipe de Ganley a étudié de nombreux tissus. Ainsi, un haut taux d'autophagie n'est pas forcément corrélé à un haut taux de mitophagie, comme c'est le cas dans l'œil [244]. Ils ont également démontré qu'au sein d'un même tissu le taux de mitophagie peut fortement varier. Par exemple, au niveau du rein le taux est différent entre le cortex et la médulla [245].

La mitophagie programmée regroupe les événements de mitophagie qui sont observés au cours du développement, de la maturation et de la différenciation cellulaire [243]. En ce qui concerne le développement, peu de données démontrent un réel rôle de la mitophagie. La difficulté réside dans le blocage total de la mitophagie (à cause de la redondance de différentes voies) pour observer si elle est essentielle à certains processus développementaux. Un rare exemple est le développement du muscle cardiaque. Le développement du myocarde nécessite une reprogrammation métabolique en passant d'un métabolisme glucidique à un métabolisme lipidique [246,247]. L'absence de changement conduit au développement de myopathies. Une hypothèse est que cette modification consiste en l'élimination, par mitophagie, d'une partie de la population des mitochondries. Ces mitochondries seraient remplacées par des mitochondries optimisées pour le métabolisme lipidique [248]. En ce qui concerne le processus de différenciation cellulaire, deux événements d'élimination des mitochondries sont particulièrement connus : lors de la maturation des érythrocytes et l'élimination des mitochondries du spermatozoïde de la cellule œuf après la fécondation. L'absence de mitochondries dans les érythrocytes est liée à leur élimination au stade de réticulocytes [249]. Au cours de la fécondation chez les mammifères et *C. elegans*, on observe la disparition des membranes des organites paternels deux heures après la fécondation [250,251]. Ce phénomène est appelé allophagie [252] et inclus le phénomène de mitophagie pour la dégradation des mitochondries [253].

La mitophagie induite par un stress est la plus étudiée car il est facile de l'induire en utilisant un stimulateur adapté. De nombreux inducteurs peuvent conduire à une mitophagie liée à un stress cellulaire ou à un dysfonctionnement mitochondrial. Le plus évident est la carence nutritionnelle. Cet événement induit une autophagie massive de divers organites incluant les mitochondries comme cela a été montré chez la levure [254]. Un cas particulier est lié à la chute de potentiel mitochondrial qui peut être observé suite à une accumulation de ROS mitochondriaux [255]. Si ces ROS sont pris en charge par de nombreuses enzymes antioxydantes, il arrive qu'une défaillance du mécanisme ou un nombre trop important de ROS rendent ce système insuffisant pour permettre leur élimination [255]. Dans ces circonstances, en plus de ce système, une dégradation sélective des mitochondries est effectuée par mitophagie. L'étude de la mitophagie liée à une chute de potentiel mitochondrial souvent permise par l'utilisation d'un agent découplant tel que le CCCP [173]. Un dernier inducteur est HIF, en particulier HIF1 [256]. HIF est un facteur de transcription qui est activé suite à une baisse du taux d'oxygène. Il va induire l'expression de ses gènes cibles parmi lesquels se trouvent plusieurs qui sont impliqués dans l'induction de la mitophagie.

INTRODUCTION : La mitophagie

Dérégulation

Au vu de son importance, la dérégulation de la mitophagie pourrait conduire au développement de nombreuses situations pathologiques. Néanmoins lier le développement d'une pathologie directement à un défaut de mitophagie est complexe. De nombreux événements directs ou indirects peuvent impacter le développement de maladies. Cependant, les mutations de protéines impliquées dans la mitophagie ou une dérégulation du processus de mitophagie sont observées dans de nombreuses maladies. On distingue en particulier des affections neurodégénératives ou musculaires.

Neurodégénératives

La toxicité de certaines protéines produites en excès serait la cause du développement de ces maladies. Les protéines peuvent s'accumuler au niveau mitochondrial conduisant à un défaut de mitophagie, augmentant ainsi le stress déjà induit par ces protéines [257–259].

Pour la maladie de Parkinson on observe une accumulation d' α -synucléine (α -syn). En condition de stress, elle est dégradée au cours de la mitophagie comme cela a été observé dans des cellules modèles de type dopaminergique, les SH-SY5Y. Cette dégradation dépend d'une modulation de la dynamique mitochondriale par DRP1 et OPA1 [260]. De même, la surexpression de l' α -syn chez la souris conduit à une augmentation de la mitophagie induite par Parkin [261]. De très nombreuses mutations des gènes *PRKN* et *PINK1* codant respectivement les protéines Parkin et PINK1 sont retrouvées chez les patients atteints d'une forme héréditaire de la maladie de Parkinson. Pour cette raison, de nombreuses études s'intéressent à la mitophagie médiée par Parkin et PINK1 dans les maladies neurodégénératives [262]. Au cours de ces études, NIX/BNIP3L a été identifiée comme compensant la perte de *PINK1* et *Parkin*. La surexpression par modification génétique *NIX* ou par induction pharmacologique suffit à restaurer la mitophagie dans des cellules présentant une perte de fonction pour PINK1 et Parkin, et restaure les fonctions mitochondriales [263]. Ces cellules présentent des mitochondries avec une amélioration de la production d'ATP. Cette étude souligne que la mitophagie semble essentielle pour bloquer le développement de la maladie de Parkinson.

Pour la maladie d'Alzheimer, la protéine β -Amyloïde (β A) s'accumule sous forme de plaques extracellulaires. Une mutation du gène est couramment utilisée pour induire la maladie. Un autre modèle très utilisé dans les recherches sur la maladie d'Alzheimer est l'hyper phosphorylation de la protéine Tau. Ces deux modèles montrent une baisse significative de la mitophagie [264]. L'induction de la mitophagie diminue la quantité de β A et la phosphorylation de Tau. Par ailleurs, une étude de 2018 montre que la surexpression du gène *Tau*, conduit à une diminution de la mitophagie dans des neuroblastes. Par la suite, l'étude des neurones de *C. elegans* avec un mutant de la protéine Tau montre que son accumulation réduit la mitophagie indépendamment du potentiel membranaire mitochondrial. Enfin, une expérience de co-immunoprécipitation a permis de montrer que Parkin et Tau interagissent et que cela conduit à la séquestration de Parkin au niveau du cytosol, bloquant son action pro-mitophagie [265].

Dans le modèle de la maladie de Huntington chez la drosophile, il a été montré que des autophagosomes s'accumulent dans le cytosol et ne reconnaissent plus les protéines cargos, conduisant à une diminution de l'autophagie globale [266]. La même équipe a prouvé que cette

diminution serait liée à l'interaction de la protéine Htt mutée avec p62 ce qui bloquerait la reconnaissance des cibles de p62 [267]. Il a également été observé une dynamique mitochondriale anormale dans des extraits de cerveau de patients [268]. En lien avec ces deux observations, une équipe a testé le rôle de PINK1 dans une souche de drosophile mimant la maladie. Comme cela a été observé pour la maladie de Parkinson, la surexpression de *PINK1* conduit à une augmentation de la survie et induit un sauvetage de la neurodégénérescence. Cela a permis aux chercheurs de supposer que PINK1 est capable de contrecarrer la toxicité induite de la protéine Htt mutée [231]. Ils ont également montré dans un modèle murin où la dégradation des mitochondries est plus faible que la surexpression de *PINK1* restaure les événements de mitophagie.

Si seulement trois maladies neurodégénératives sont citées ici, elles ne sont pas les seules à être liées aux protéines pro-mitophagie. Actuellement la modulation de la mitophagie apparaît comme une voie thérapeutique pour traiter les neuropathies [269]. Ces traitements pourraient être étendus à d'autres pathologies liées à la mitophagie.

Cancers

Une fonction moins étudiée est le rôle de la mitophagie dans le développement de cancers. La mitophagie semblerait jouer un rôle suppresseur de tumeur [270]. De nombreuses études ont montré une variation de l'expression de gènes pro-mitophagie dans de nombreux cancers [271]. Néanmoins, le rôle précis de la mitophagie dans le processus tumoral reste peu compris [272]. Tout comme l'autophagie, elle semble remplir un rôle double en favorisant ou bloquant le développement des tumeurs en fonction du contexte et du type de cancer [271]. Elle peut promouvoir le développement tumoral. Dans des glioblastomes, Nix induit la mitophagie et favorise la survie des cellules cancéreuses [273]. De même la mitophagie induite par BNIP3 favorise la migration cellulaire des cellules cancéreuses favorisant l'invasion tumorale de lignée cellulaire de mélanome [274]. Comme précisé plus haut les protéines inductrices de mitophagie présentent des fonctions diverses dans la cellule. Une hypothèse, qui expliquerait ces variations, serait que leurs fonctions dans le développement tumoral pourraient être indépendantes de leur rôle pro-mitophagie. Par exemple, PINK1 et Parkin peuvent agir comme des suppresseurs de tumeur en favorisant la dégradation de HIF-1 α , un facteur de transcription impliqué dans la tumorigène [275]. On peut supposer un rôle dans l'apoptose au vu des rôles multiples des protéines de mitophagie telles que BNIP3, impliquée dans la mitophagie mais également dans le processus apoptotique [276].

3 L'apoptose.

Là où la mitophagie est un mécanisme qui élimine spécifiquement les sections mitochondriales endommagées, l'apoptose est un processus bien plus radical qui passe par l'élimination totale de la cellule endommagée au profit de l'organisme. Néanmoins, tout comme la mitophagie, l'apoptose présente également une fonction développementale essentielle.

Issu à l'origine de la fusion de deux gamètes, à l'état adulte on estime que 10^{13} cellules sont organisées pour former un corps humain [277]. Ces cellules ont pour fonction de maintenir l'organisme viable et de veiller à son bon fonctionnement. Pour cela, des morts cellulaires sont inévitables. L'augmentation du nombre de cellules est paradoxalement associée à élimination de cellules au cours de développement mais également tout au long de la vie de l'individu. La mort de ces cellules peut être modulée par de nombreux processus mais au cours du développement, il s'agit d'une mort cellulaire régulé (MCR). Une fois encore plusieurs MCR existent mais la plus étudiée est sans aucun doute l'apoptose.

a. Rôle de l'apoptose

i. Physiologique

L'apoptose est essentielle à la survie cellulaire et intervient dans de nombreuses fonctions en commençant par le développement [278]. L'exemple le plus connu est la dissociation des doigts permise par la mort des cellules interstitielles [279]. Il est également observé que la formation du cerveau passe par une phase d'élimination des cellules en excès ou qui ne présentant pas de jonctions synaptiques [280–282]. Au stade adulte l'apoptose est visible suite à un coup de soleil. Les UVA et UVB sont associés à une augmentation des dommages à l'ADN observé sur les kératinocytes, ce qui chez la souris, entraîne une augmentation de l'activation de l'apoptose dans les cellules touchées [283,284]. L'apoptose est donc également un système de défense de l'organisme. De nombreuses études pointent le rôle de l'apoptose dans la réponse à l'infection. Dans ce cas, l'apoptose conduit à la destruction de la cellule hébergeant le pathogène présumé [285].

ii. Dérégulation

Les rôles physiologiques de l'apoptose laissent entrevoir qu'une dérégulation de ces processus peut conduire à des situations pathologiques variées et à des conséquences dramatiques. Ces situations résultent de deux dérégulations : un excès d'apoptose, conduisant à un excès de destruction de cellules, qui peut conduire à des immunodéficiences et des maladies neurodégénératives ; un défaut d'apoptose conduit à une survie de cellules qui sont inutiles, voir endommagées, créant un défaut qui facilite le développement de cancers ou de maladies auto-immunes.

Dans le cas de la maladie de Parkinson, l'apoptose a été associée à la perte des neurones dopaminergiques [286]. Cela a été observé chez des patients en utilisant divers marqueurs spécifiques du processus apoptotique. De même, le syndrome d'immunodéficiences acquises (SIDA) est lié à une mort massive des lymphocytes TCD4 par apoptose.

Comme cité plus haut, un défaut d'apoptose est directement associé au développement des cellules cancéreuses en leur permettant de survivre [110]. Enfin, le système immunitaire nécessite la spécialisation de cellules pour identifier des potentiels hôtes pathogènes. Au cours de ce développement, des cellules immunitaires peuvent développer une reconnaissance des cellules de l'hôte en lui-même. L'élimination de ces cellules est nécessaire pour éviter de développer une maladie auto-immune. En condition physiologique ces cellules sont éliminées par apoptose. Ainsi le défaut d'apoptose favorise le développement de maladies auto-immunes.

Au vu de ces conséquences, une régulation fine de l'apoptose est essentielle pour protéger l'organisme et, pour cela, de nombreux acteurs sont mis à contribution.

b. Les acteurs de l'apoptose

L'apoptose est comme la dynamique mitochondriale, maintenue par un équilibre entre deux types de facteurs : pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Elle est caractérisée par des événements cytologiques observés dès les années 1970 par John Kerr [287]. L'initiation du processus conduit à la séparation d'une cellule de son tissu d'origine. Ensuite elle subit une étape de condensation à la fois nucléaire et cytoplasmique. La cellule est alors fragmentée avant que les corps apoptotiques produits soient phagocytés par les cellules environnantes.

Sur un aspect plus moléculaire les premières études concrètes sont faites dans le modèle *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Ce modèle présente l'avantage majeur de présenter un devenir cellulaire parfaitement défini. Le développement de *C. elegans* passe par la production de 1090 cellules somatiques mais seulement 959 sont retrouvées chez l'individu adulte soit 131 cellules vouées à être éliminées par apoptose [288]. La génération de mutations conduisant à une variation du nombre de cellules finales de l'individu a permis d'identifier les protéines impliquées dans ce processus de mort cellulaire par apoptose. Parmi les gènes appelés gènes *ced* (cell death), se trouvent notamment *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* [289]. Ces protéines présentent des rôles pro- ou anti-apoptotiques qui ont été déterminés notamment par épistasie. La régulation passe par des interactions entre des protéines pro- et anti-apoptotiques [290]. L'initiateur de cette cascade est le gène *egl-1* (*egg laying-1*, identifié dans un autre crible). Si la cellule doit être conservée, *egl-1* n'est pas transcrit. Dans ces conditions, la protéine Ced-9, un anti apoptotique interagit avec la protéine Ced-4, un facteur pro-apoptotique et la protéine Ced-3 est inactive. À l'inverse, si la cellule est vouée à être détruite, les stimulus apoptotiques conduisent à la synthèse de la protéine *egl-1*. Cette protéine bloque l'interaction Ced-9/Ced-4 en se liant à Ced-9. Ced-4 peut alors activer sa cible, Ced-3 pour induire l'apoptose.

Les études chez les mammifères confirment la conservation du processus mais présente des mécanismes et acteurs plus diversifiés. Dans ce groupe, deux principales voies d'apoptose semblent exister. Une apoptose extrinsèque induite par des signaux extérieurs à la cellule. Inversement et une apoptose intrinsèque (aussi appelé mitochondriale) dépendante de signaux intracellulaires [291]. Nous nous intéressons plus spécifiquement à l'apoptose mitochondriale.

Tout comme il a été observé chez *C. elegans*, chez les mammifères le processus apoptotique se compose d'un ballet protéique finement orchestré. La dernière étape implique les protéases nommées caspases, les exécuteurs finaux, qui sont elles-mêmes soumises à une

INTRODUCTION : L'apoptose

régulation par des inhibiteurs, eux-mêmes régulés. Plus en amont, la régulation du processus fait appel à la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma) qui est essentielle à l'activation ou à la répression du processus apoptotique (Table 2).

i. Les caspases

Si l'on fait un parallèle entre ce qui est observé chez *C. elegans* et ce qui a été découvert chez l'humain, CED 3 est la première caspase pro-apoptotique identifiée. Les caspases sont ainsi nommées car il s'agit de cystéine protéases clivant après un acide aspartique [292]. Elles sont classées en deux groupes, les caspases initiatrices et les caspases effectrices.

Les caspases initiatrices sont les premières activées. L'activation passe par la liaison d'un activateur au niveau d'un domaine appelé pro-domaine contenant une séquence CARD (Caspase Recruitment Domain) ou DED (Death Effector Domain) qui permet une pré-activation de la protéine. Cette pré-activation permet alors à la protéine de former des oligomères et ainsi de s'auto-activer. Chez les mammifères les caspases initiatrices sont au nombre de trois. Seule la caspase-9 participe à la voie mitochondriale de l'apoptose [293].

La cible de la caspase-9 est la caspase-3, une caspase effectrice [294]. Le clivage de cette protéine permet sa dimérisation qui conduit à son activation. Cette activation va permettre d'induire les modifications morphologiques citées plus haut avec notamment condensation du noyau, fragmentation de l'ADN nucléaire et la formation des corps apoptotiques [295]. Outre la caspase-3, les caspase-7 et -6 sont aussi effectrices. La caspase-7 présente le même système d'activation que la caspase-3 alors que la caspase-6 semble être activée par interaction directe avec la caspase-3. Il existe en plus du clivage un autre système pour assurer l'inactivation des caspases. Il s'agit de la présence de protéines inhibitrices de caspases, les IAPs (Inhibitor of apoptotic proteins).

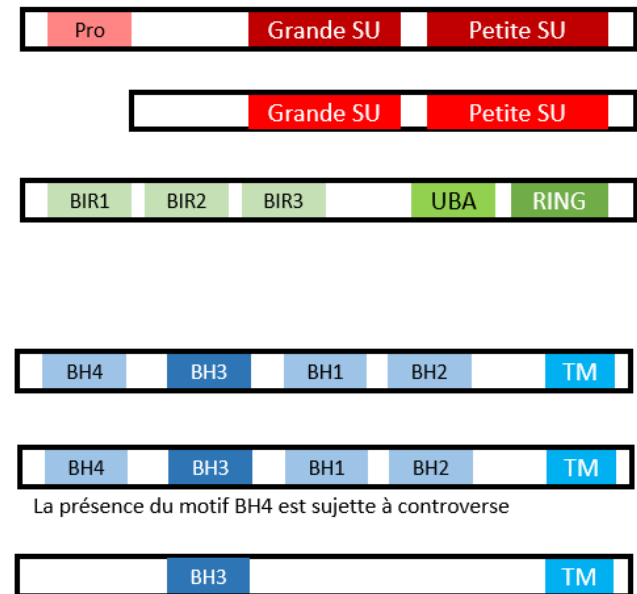
ii. Les IAPs et leurs inhibiteurs

Comme mentionné plus haut la plupart des effecteurs du processus sont présents dans la cellule mais sous des formes inactives grâce aux IAPs. Ils forment une famille de protéines capables de se fixer aux caspases [296]. Chez les mammifères, les neuf protéines de la famille IAP comportent des structures protéiques similaires avec notamment la présence d'un ou plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) nécessaire à leurs interactions avec les caspases. Certaines de ces protéines présentent un domaine RING et/ou un domaine UBC (Ubiquitin-Conjugaison). Ceci leur permettrait d'induire l'ubiquitination et dégradation de leur cible [297]. Au même titre que les caspases, les IAPs sont également régulées par des inhibiteurs, des ilAPs (inhibiteur de IAP) cette fois. Ces antagonistes sont activés grâce aux signaux apoptotiques pour permettre la libération des caspases. On en trouve deux chez les mammifères : SMAC/Diablo et Omi/HtrA2 (HtrA serine peptidase 2) [298–300].

Les ilAPs sont présents dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie [299]. Leur libération est permise par une phase précoce du processus apoptotique qui induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2.

Table 2 :Tableau récapitulatif des acteurs de la voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères et le modèle drosophile			
Catégorie protéique		Mammifère	Drosophile
Caspases	Initiatrice	Caspase -9,...	Dronc,...
	Effectrice	Caspase-3, Caspase-7	DrICE, Dcp-1,...
IAP		IAP	DIAP1, DIAP2
Inhibiteur de IAP (iIAP)		Smac/Diablo, Omi/HtrA2	Reaper, Hid, grim (RHG)
Famille Bcl-2	Anti apoptotique	Bcl-xl, Bcl-2, Mcl-1,...	Buffy
	Pro apoptotique	Multi domaine	BAX, BAK, BOK
		BH3 only	BIM, BAD, BID,...

Structure protéique



INTRODUCTION : L'apoptose

iii. La famille Bcl-2, une grande famille chez les mammifères

Les protéines de la famille Bcl-2 sont considérées comme les régulateurs principaux de l'apoptose mitochondriale à la suite d'un signal apoptotique. À la manière de egl-1 chez *C. elegans*, leur régulation permet de gérer la survie ou la mort de la cellule. Aujourd'hui on compte 25 gènes associés à la famille Bcl-2. La première protéine à avoir été identifiée a été détectée car surproduite dans un lymphome folliculaire [301]. En condition d'induction d'apoptose, cette protéine diminue la mort cellulaire induite par des stimuli variés (choc thermique, privation en interleukine 3, privation de sérum...) démontrant son rôle anti apoptotique [302,303]. Cette protéine est nommée Bcl-2 et caractérisée d'onco-protéine permettant la survie cellulaire.

En se basant sur des similarités de séquences, d'autres protéines ont été identifiées formant ainsi la famille Bcl-2. Un critère de sélection important est la capacité des protéines à lier la protéine Bcl-2. Ces analyses permettent d'identifier des protéines pro- et anti-apoptotiques. Le point commun entre toutes ces protéines est la présence d'un motif BH (Bcl-2 Homology) qui permet l'interaction physique entre les différents membres de la famille. Une classification est alors réalisée en se basant sur leur fonction et leur similitude, en particulier concernant le nombre de motifs BH. Ces motifs sont classés en fonction de leur position et vont de 1 à 4 [304].

La première catégorie concerne les protéines anti-apoptotiques. Elles présentent de multiples motifs BH, avec majoritairement la présence des quatre motifs. Dans cette catégorie on trouve notamment les protéines Bcl-2, Bcl-xL et MCL1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein). En se liant aux protéines pro-apoptotiques, elles permettent de bloquer leur action et ainsi d'inhiber le processus apoptotique [305].

La deuxième catégorie est constituée des protéines pro-apoptotiques contenant plusieurs motifs BH. Elles sont considérées comme les protéines formatrices de pores au niveau de la MME. Il a longtemps été supposé que ces protéines ne possèdent pas de domaine BH4 mais des études plus récentes sont en contradiction avec cette théorie bien qu'aucun consensus ne soit aujourd'hui accepté. Concernant cette catégorie, nous évoquerons en particulier Bax (Bcl-2 associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), deux modulateurs particulièrement bien caractérisés ainsi que la protéine BOK (Bcl-2 Ovarian Killer). Ces protéines interagissent directement au niveau de la MME. Pour Bax et Bak leur activation conduit à une homo-oligomérisation et à la formation des pores cités plus haut [306]. Ces pores permettent le passage des IAPs et du cytochrome c, considéré par de nombreux scientifiques comme le point de non-retour du processus apoptotique [307].

La troisième catégorie est constituée des protéines pro-apoptotiques contenant un seul domaine BH, en l'occurrence BH3. Les protéines les plus connues sont les protéines Puma et NOXA, toutes deux régulées en partie transcriptionnellement suite à des stimuli apoptotiques [308]. Leur action pro-apoptotique peut passer par deux niveaux, soit une interaction directe avec les protéines pro-apoptotiques telle que Bax et Bak pour induire l'apoptose, soit par une interaction avec les protéines anti apoptotiques, bloquant leur interaction avec les protéines pro-apoptotiques. Le blocage des protéines anti-apoptotiques induit une augmentation de la quantité de protéines pro-apoptotiques, la formation de pores et par la suite l'induction du processus apoptotique.

Enfin une dernière catégorie est de plus en plus étudiée, il s'agit des protéines de la famille Bcl-2 à domaine atypique. Elles présentent des similarités de séquences avec les protéines de la famille Bcl-2, certaines peuvent moduler le processus apoptotique mais elles ne remplissent pas toutes les exigences des membres classiques de la famille. On peut notamment citer plusieurs protéines impliquées dans l'autophagie (sélective ou non), telle que la protéine Beclin 1 ou la protéine BNIP3 qui est un modulateur pro-apoptotique. BNIP3 possède un domaine BH3 putatif [291] mais semble incapable d'interagir avec la protéine Bcl-2 par son domaine BH [310,311]. De même, Beclin 1 possède uniquement un domaine BH3 mais elle est capable d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [289]. Cette interaction module l'autophagie induite par Beclin 1 soulignant les liens étroits entre apoptose et mitophagie.

c. L'apoptose, un ballet mortel

Maintenant que tous les acteurs ont été décrits, nous pouvons présenter une vision plus globale du processus apoptotique (Figure 16). Si aucun stimulus n'est détecté, l'apoptose n'est pas déclenchée. Les différents acteurs sont synthétisés et attendent l'initiation du processus. Les caspases, dans le cytosol, sont liées aux IAPs. Dans l'EIM des mitochondries, les iIAPs, comme Smac/Diablo, attendent d'être libérés par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak sont eux-mêmes séquestrés par les membres anti-apoptotiques de cette famille.

Si la cellule devient inutile ou endommagée, des signaux cellulaires vont conduire à l'activation des protéines BH3-only, comme Puma. La protéine va alors d'une part se fixer aux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, la protéine Bcl-2, et d'autre part activer Bax et Bak permettant leurs relocalisation mitochondriale et leur oligomérisation. L'oligomérisation permet la formation des pores mitochondriaux nécessaires à la libération des iIAPs, ici Smac/Diablo. En parallèle la mitochondrie subit des étapes de modulation, notamment par fission grâce à DRP1 [313–315]. Les iIAPs se fixent alors sur les IAPs, libérant les pro-caspases. La caspase initiateur-9 est recrutée pour former une structure appelée apoptosome. L'apoptosome est composé des protéines Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1), du cytochrome c libéré au niveau des pores mitochondriaux et de la procaspase-9. Les caspases 9 ainsi rapprochées sont activées par clivage. Ensuite, la caspase-9 active les caspases initiateur-3 et -7 par clivage, entraînant les modifications morphologiques et moléculaires spécifiques à l'apoptose et la mort de la cellule.

INTRODUCTION : L'apoptose

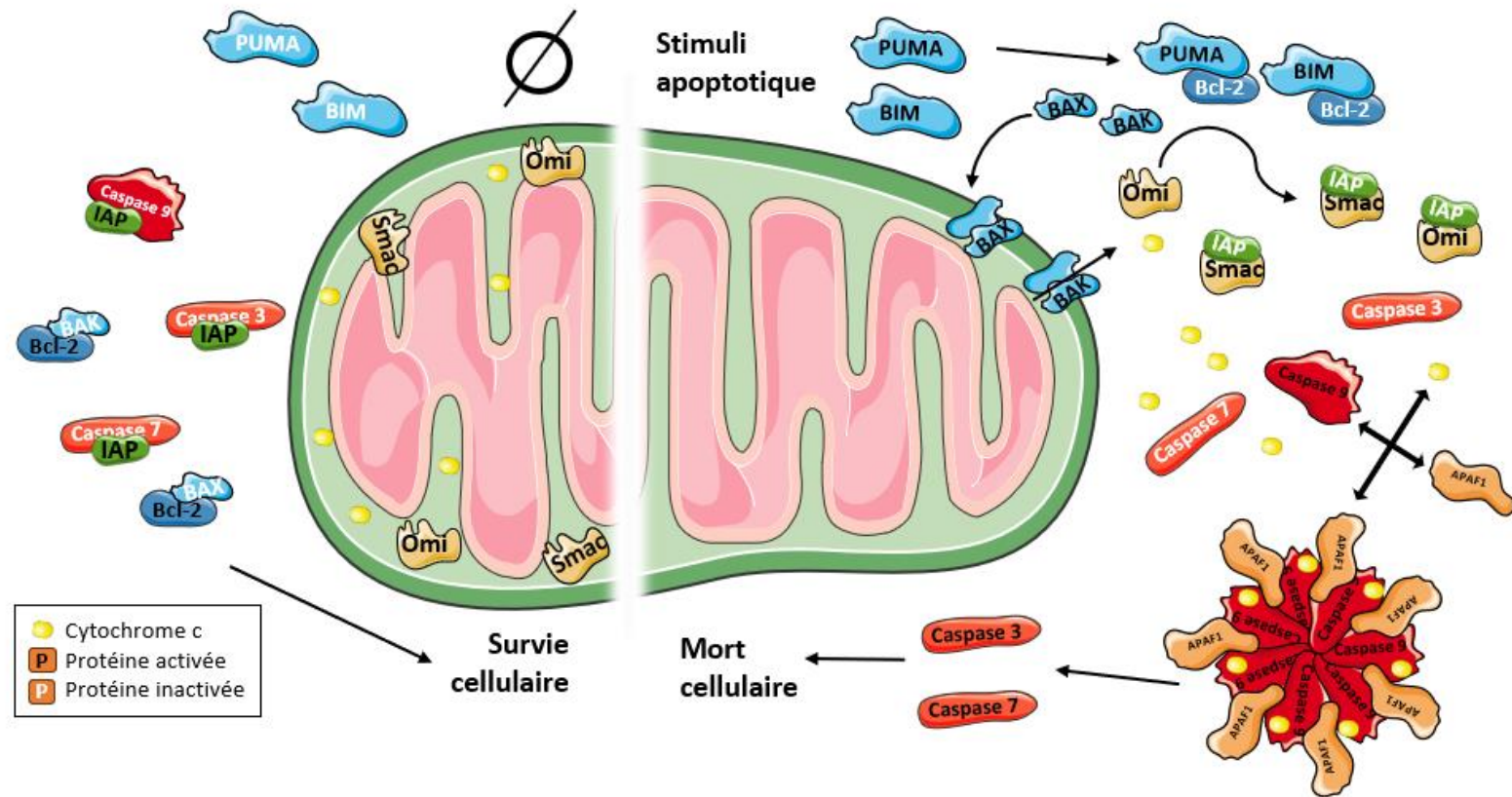


Figure 16 : La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères. En absence de stimuli apoptotiques (à gauche), les protéines pro-apoptotiques sont maintenues inactives par leurs inhibiteurs ou séquestrées dans l'EIM. Suite au stimuli apoptotiques (à droite), les protéines BH3 only de la famille Bcl-2 (PUMA/BIM) inhibent les facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2) pour favoriser la formation de pores au niveau de MME par les facteurs pro apoptotiques contenant plusieurs motifs BH, de la famille Bcl-2 (Bax et Bak). Ces pores permettent la libération des inhibiteurs de IAP (Omi et Smac) et du cytochrome c. Ce dernier avec la caspase 9 et APAF1 forme l'apoptosome qui active les caspases exécutrices (caspases 3 et 7).

d. Quid de la drosophile

Drosophila melanogaster est un modèle courant en génétique et biologie cellulaire car il présente de nombreux avantages. Cette mouche aussi appelée drosophile, mouche à vinaigre ou en anglais « fruit fly » est très répandue de par le monde. Elle se nourrit de fruits bien mûrs. Au cours des 100 dernières années, ce modèle a été utilisé à de nombreuses reprises pour des recherches dans le domaine biomédical. Les sujets des recherches sont nombreux et variés comme le montrent les six prix Nobel décernés à des scientifiques travaillant sur ce modèle. On peut notamment citer T. H Morgan et la découverte du rôle des chromosomes dans l'hérédité en 1933, le contrôle génétique dans les phases précoces du développement par E. B. Lewis, C. N Volhard et E.F Wieschauss en 1995 ou encore plus récemment en 2017 le mécanisme moléculaire du rythme circadien par J.C. Haall, M. Rosbach et M.W. Young. Mais pourquoi travailler sur la drosophile ?

La drosophile présente un cycle développement rapide dépendant de la température, d'une durée de seulement 10 jours à 25°C. Au cours de ce cycle, les embryons vont se développer par différents stades larvaires (L1, L2, L3) pour ensuite passer à l'état de puppe qui permettra à la larve de se métamorphoser en mouche adulte. Outre cette rapidité, la quantité de descendants obtenus est importante : 200 individus produits par femelle.

En plus de cet aspect développemental, l'aspect génétique du modèle est intéressant. La drosophile présente un génome proche de l'humain avec une similarité de 60% entre les deux génomes (avec environ 30 000 gènes codant des protéines chez l'homme pour 14 000 chez la drosophile). Une étude montre une homologie génique de 77% en ce qui concerne les gènes impliqués dans des maladies humaines [316]. Cette homologie en fait un modèle de choix pour étudier des pathologies, comme par exemple la maladie de Parkinson ou Alzheimer citées précédemment [317]. De plus une diminution de redondance fonctionnelle des protéines chez la drosophile par rapport aux mammifères facilite l'étude de voies spécifiques.

INTRODUCTION : L'apoptose

Enfin la drosophile présente un outil génétique puissant. Il est par exemple possible de contrôler spatialement et temporellement l'expression d'un gène d'intérêt, notamment grâce à l'utilisation de la séquence promotrice UAS (upstream activating sequence) reconnue par la protéine GAL4 de la levure [318] (Figure 17). Il s'agit d'un système bipartite composé de ces deux séquences génétiques de levure insérées par transgénèse dans le génome de la drosophile. Cela permettra l'expression d'un gène d'intérêt dans un tissu donné. En effet, la séquence de la protéine GAL4 est placée en aval d'un promoteur de gène de drosophile choisi pour sa temporalité et localisation de son expression. Une seconde séquence d'ADN, composée de la séquence UAS est suivie de la séquence du gène d'intérêt que l'on souhaite exprimer. Une fois les deux constructions présentes dans les mêmes cellules, la synthèse du gène *gal4* conditionné par son promoteur conduira à la production de la protéine GAL4. La protéine GAL4 se liera et activera le promoteur UAS et donc l'expression du gène d'intérêt. La séquence promotrice de drosophile suivie du gène *gal4* est appelée pilote. De nombreux pilotes existent chez la drosophile. Ils peuvent permettre une expression ciblée du gène d'intérêt comme par exemple au niveau de structures larvaires appelées les disques imaginaux. Ces disques retrouvés au niveau larvaire se développent au cours de la pupaison (métamorphose de la pupe en individu adulte) pour donner les organes externes de la drosophile adulte (Figure 19). Ainsi ce système facilite de nombreux travaux en limitant l'expression à une région et à un moment spécifique du développement. Nous utilisons ce système pour limiter l'expression de protéines pro-apoptotiques à une zone non essentielle à la survie de la drosophile et ainsi garder les individus vivants pour les étudier.

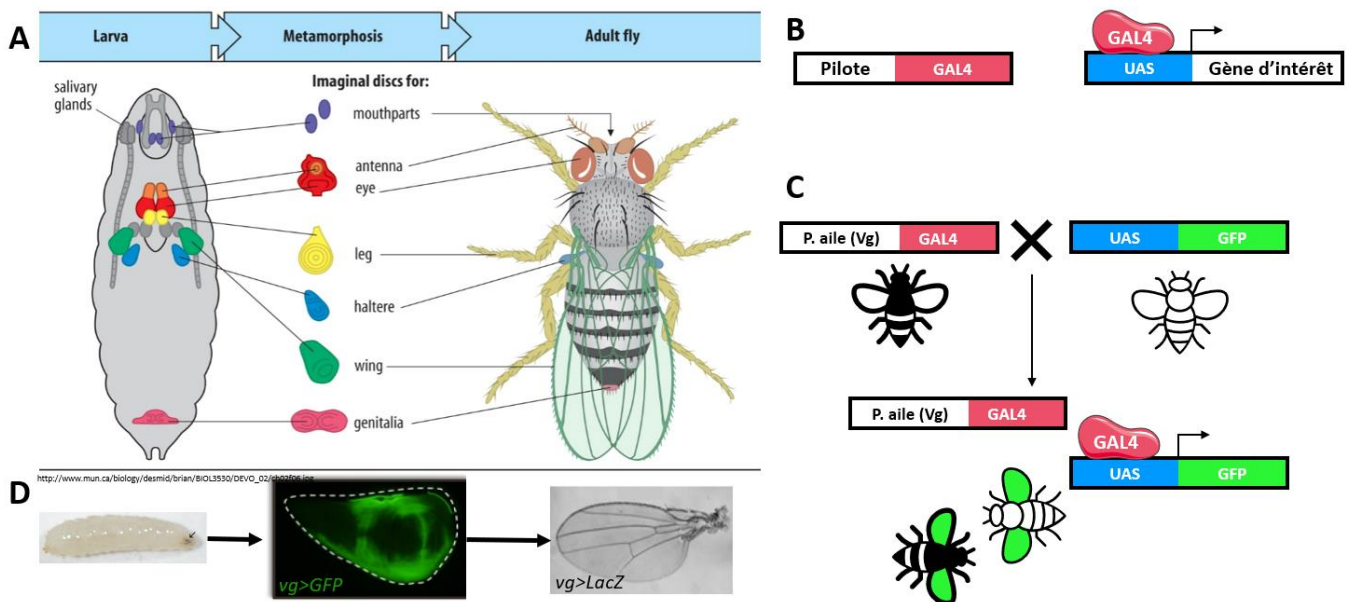


Figure 17 : Induction tissu spécifique de gène chez la drosophile. A. Correspondance des disques imaginaux larvaires et des appendices adultes. B. Le principe du système UAS/GAL4. La protéine GAL4 est un activateur de la transcription des gènes placés en aval de la séquence UAS (Upstream Activating Sequence). C. Exemple d'utilisation du système UAS/GAL4. Un des parents possède une séquence GAL4 sous le contrôle d'un promoteur choisi en fonction de son expression spacio-temporelle (ici le promoteur vestigial, *vg*, spécifique du disque d'aile). Le second parent possède la séquence du gène d'intérêt (ici la GFP) sous le contrôle de la séquence UAS. Les descendants possèdent les deux séquences. L'expression du gène GAL4 est conditionnée au territoire d'expression *vg*, ainsi la GFP est uniquement visible dans le territoire *vg*. D. Photo du modèle proposé en C.

Le processus apoptotique est relativement bien conservé entre les espèces. Chez la drosophile on retrouve les mêmes acteurs mais leurs nombres sont bien plus faibles que chez les mammifères et leurs fonctions peuvent différer. Pour les protéines de la famille Bcl-2 seules trois membres ont actuellement été identifiés, l'anti-apoptotique Buffy et les pro-apoptotiques Debcl et Sayonara [319–322]. Sayonara a récemment été identifié en cherchant un membre « BH3 Only » par homologie. L'étude à valider le rôle pro-apoptotique de ce nouveau membre. Il a la capacité d'interagir avec les protéines Buffy et Debcl et il s'agit d'une protéine à domaine BH3 only. La découverte de Buffy et Debcl remonte aux années 2000 et même s'il est couramment admis que Buffy est anti-apoptotique, et Debcl pro-apoptotique, leurs rôles semblent plus complexes. Certaines études soutiendraient un rôle inverse pour ces protéines dans certaines conditions. En 2003 une étude du rôle de Debcl et Buffy dans des tissus en développement confirme les premières études sur le rôle anti apoptotique de Buffy et pro-apoptotique de Debcl [322]. À l'inverse en 2005 des expériences sont réalisées dans des neurones de drosophiles, un tissu différencié. Dans ce contexte, Buffy favorise la mort neuronale alors que la surexpression de *debcl* participe à la protection neuronale [323]. L'hétérogénéité des études laisse à penser que les fonctions de Buffy et Debcl seraient spécifiques aux tissus ou aux stades de développement.

La différence majeure avec le processus apoptotique du mammifère se situe au niveau mitochondrial [324] (Figure 18). Les études chez les mammifères montrent une libération des facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie où, entre autres, les protéines Bax et Bak permettent la formation de pores au niveau de la membrane externe mitochondriale. À l'inverse chez la drosophile, l'initiation du processus apoptotique passe par une relocalisation des acteurs au niveau mitochondrial [324]. Chez la drosophile la perméabilisation de la MME est toujours débattue. De même dans la majorité des études, le cytochrome C n'est pas essentiel au processus apoptotique même s'il a été observé une libération du cytochrome C dans le cytosol [325,326]. Dans la même idée, les IAPs, ici appelées RHG (Reaper, Hid et Grim) possédant toutes trois un motif RHG leur permettant d'interagir avec les IAPs) [327], ne sont pas localisées dans l'espace intermembranaires. Néanmoins les signaux apoptotiques conduisent à une relocalisation mitochondriale des protéines de la famille Bcl-2 et des protéines RHG ainsi qu'à une modulation de la mitochondrie notamment par fission induite par Drp1 ou une chute du potentiel mitochondriale [324,328]. Comme chez les mammifères, la mitochondrie subit un remodelage par fission induite par les protéines Drp1. La suite du processus est assez proche de ce qui est observé chez les mammifères, les RHG se fixent sur les protéines DIAP1/2 (Death-associated inhibitor of apoptosis 1/2) pour permettre la libération des caspases initiateuses (DRONC, etc.) [329–331]. Les caspases forment un apoptosome avec une protéine similaire à Apaf1, Dark (Apaf-1/CED-4-related caspase activator Dapaf-1S) sans l'intervention du cytochrome C [332]. Les caspases DRONC activées permettent l'activation des caspases effectrices, Dcp-1 (Death caspase 1) et surtout drICE (Death related ICE-like caspase), conduisant à la mort de la cellule [333].

INTRODUCTION : L'apoptose

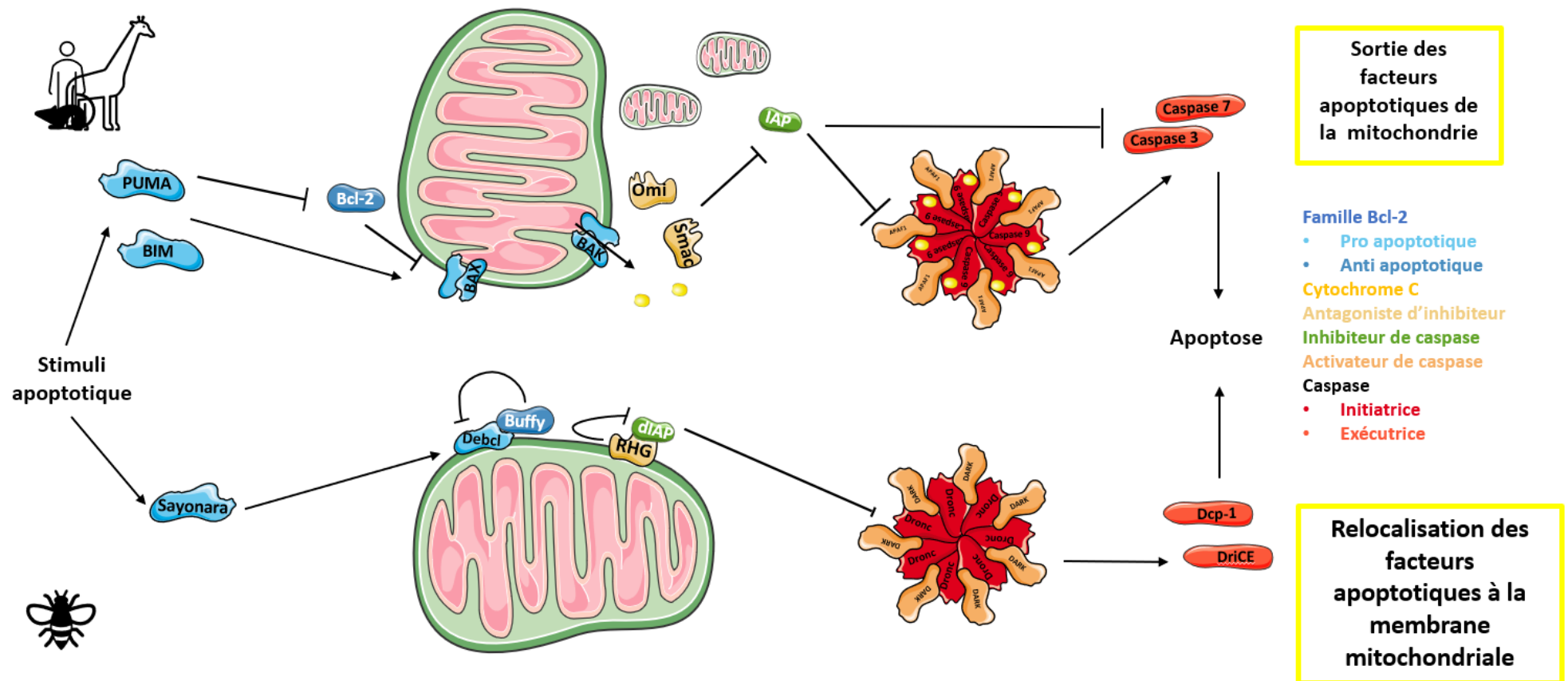


Figure 18 : Schéma comparatif de la mort cellulaire chez la drosophile et chez les mammifères. Les deux processus sont similaires sur la majorité des points. La grande différence réside dans la libération mitochondriale des facteurs pro-apoptotiques chez le mammifère alors que chez la drosophile ils se relocalisent à la mitochondrie.

e. L'utilisation de gènes de susceptibilité au rétinoblastome pour induire l'apoptose

i. pRb, un suppresseur de tumeur humain aux multiples cibles

La protéine pRb, (Retinoblasoma associated protein) a été découverte dans les années 1970 en lien avec la recherche sur le cancer suite à la découverte d'une mutation récurrente sur le chromosome 13 [334]. Son nom provient de son implication dans le rétinoblastome, une tumeur oculaire pédiatrique rare. En 1987, pRb est alors la première protéine qualifiée d'oncosuppresseur [335]. La découverte de cette protéine a ouvert la voie à de nombreuses recherches sur sa fonction et son mécanisme d'action.

Cette protéine appartient à la classe des protéines à poche (pocket protein). Cette famille est composée de trois protéines, les protéines pRb, p107 et p130 [336]. Comme son nom l'indique elle présente une structure qui forme une poche qui est généralement impliquée dans l'interaction protéique de pRb. Ces interactions ont lieu avec des protéines de complexes intervenant dans la régulation transcriptionnelle et majoritairement la répression. Pour ce faire, pRb interagit notamment avec les membres de la famille E2F, une famille de facteur de transcription [337]. Ainsi, pRb est un co-facteur de transcription présentant de multiples cibles.

En plus de son rôle de régulateur du cycle cellulaire, la protéine pRb intervient dans différents processus tels que la différenciation ou la mort cellulaire.

pRb, une protéine clé dans la régulation du cycle cellulaire

La protéine pRb agit comme un régulateur central du cycle cellulaire, contrôlant le passage des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Son fonctionnement repose sur sa capacité à interagir avec des facteurs de transcription, principalement de la famille E2F. Lors de la phase G1, pRb se lie aux facteurs E2F et les maintient inactifs. Cela inhibe la transcription des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Toutefois, lorsque les signaux appropriés sont reçus, pRb subit des modifications transcriptionnelles, en l'occurrence des phosphorylations, ce qui entraîne sa dissociation des facteurs E2F et permet l'expression des gènes nécessaires à la division cellulaire [338].

pRb, un inducteur de l'autophagie

La protéine pRb peut favoriser l'expression de certains gènes impliqués dans l'autophagie (*Atg7* et *Atg4A*) ou diminuer l'expression des régulateurs négatifs de l'autophagie (*Bcl-2*). Dans ces circonstances E2F1 semble inhiber l'autophagie car une perte de la protéine augmente l'autophagie [339]. Cette inhibition conduit à l'induction du processus apoptotique. La fixation de pRb sur E2F1 permet de lever l'inhibition et d'induire l'autophagie limitant ainsi l'apoptose.

pRb, un interrupteur de la mort cellulaire

La protéine pRb est majoritairement considérée comme une protéine anti apoptotique. Par exemple, lors du développement embryonnaire ou de la régénération tissulaire, pRb peut bloquer l'apoptose pour permettre la croissance et la réparation des tissus [340]. Cette inhibition passe en particulier par son interaction avec les facteurs E2F, qui activent la transcription de gènes pro-apoptotiques. En inhibant l'activité de régulateurs de la transcription comme E2F1 pRb bloque l'expression des gènes pro-apoptotiques sous son contrôle. Parmi ces gènes, on trouve ceux codant

INTRODUCTION : L'apoptose

les caspases, les protéines Bax et Bad, qui jouent un rôle crucial dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose [341].

D'autre part, la protéine pRb peut également exercer un rôle pro-apoptotique. Ce rôle, est moins décrit et peu de données sont disponibles. L'activité pro-apoptotique de Rb nécessite sa déphosphorylation. Cette dernière est nécessaire pour observer l'activation des caspases et donc à la mort cellulaire par apoptose [342]. Il a été également décrit que Rb peut physiquement interagir avec Bax pour induire la formation de pores mitochondriaux [343].

En résumé, la protéine pRb est une pièce maîtresse de la régulation cellulaire, exerçant des fonctions variées qui vont de la régulation du cycle cellulaire à la promotion de l'apoptose, en passant par la différenciation cellulaire. Ses rôles pro-apoptotiques semblent essentiels pour maintenir l'homéostasie tissulaire et prévenir la formation de tumeurs, soulignant ainsi l'importance cruciale de cette protéine dans la biologie cellulaire et la compréhension des mécanismes du cancer [344].

ii. Rbf1, une fonction proche de pRB

Chez la drosophile, on trouve deux homologues de pRb : Rbf1 et Rbf2. Tous deux sont des régulateurs transcriptionnelles mais ciblent en partie des gènes différents [345]. Rbf1 présente un plus fort pourcentage d'identité avec pRb [346] et un rôle suppresseur plus important que Rbf2 [347]. Comme pRb, Rbf1 module l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire [348]. Elle est essentielle pour la différenciation cellulaire des organes génitaux mâles durant le stade larvaire et intervient également dans la quiescence des cellules (état d'arrêt de l'état prolifératif réversible) [349,350]. Enfin son rôle dans le processus apoptotique présente, au même titre que pRb, une fonction pro- ou anti-apoptotique en fonction du contexte cellulaire.

La perte de *rbf1* par mutation au niveau du disque d'œil augmente la sensibilité à l'apoptose induite par irradiation [59,351,352]. L'apoptose est également augmentée dans des embryons de drosophile avec perte de fonction de la protéine Rbf1 [353]. À l'inverse, la surexpression de *rbf1* au niveau du disque d'aile induit cette fois une augmentation de l'apoptose. Cette augmentation est limitée aux tissus en prolifération [354]. Cette surexpression ne semble pas affecter les cellules différenciées que sont les cellules des yeux chez l'adulte où aucune augmentation d'apoptose n'est induite quand *rbf1* est surexprimé [354]. Ces observations ont poussé le laboratoire à s'intéresser à l'apoptose modulée par Rbf1.

iii. Rbf1 et l'apoptose, le modèle du laboratoire

Au cours de la dernière décennie, le laboratoire a identifié deux voies pro-apoptotiques induites par la surexpression de *rbf1* au niveau du disque imaginal d'aile [354,355] (Figure 19). La première est l'induction de la transcription du gène codant la protéine How. Cette protéine se lie à certains ARNm (Acide Ribonucléique messenger) pour induire leur dégradation. Ici, elle cible les ARNm codant les IAPs. La dégradation de ces ARNm conduit à une diminution de la protéine DIAP1 et permet la libération des caspases induisant la mort de la cellule par apoptose. Le second implique les protéines de la famille Bcl-2. En absence de la protéine Rbf1, la protéine Buffy, membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 se fixe au membre pro-apoptotique Debcl, bloquant ainsi le processus apoptotique. Dans le cas de la surexpression de *rbf1*, la transcription de *buffy*

diminue. La réduction du niveau protéique de Buffy libère la protéine Debcl, par effet de titration. Cette dernière permet alors la relocalisation de la protéine Drp1 à la membrane mitochondriale et la fission des mitochondries. On observe également une augmentation des ROS dépendantes de Rbf1 et Debcl qui seront libérées et activeront la voie JNK (Jun Kinase). Cela conduira à la mort de la cellule avec activation des caspases initiatrices telles que Dronc et effectrices telles que DrICE et Dcp-1.

Une fois de plus, la dynamique mitochondriale est mise à contribution au cours du processus apoptotique notamment par l'intervention de Drp1. On remarquera que cette protéine est impliquée dans différents processus liés à la mitochondrie, notamment dans l'apoptose et la mitophagie, ce qui est le cas de nombreux acteurs intervenants dans ces deux processus

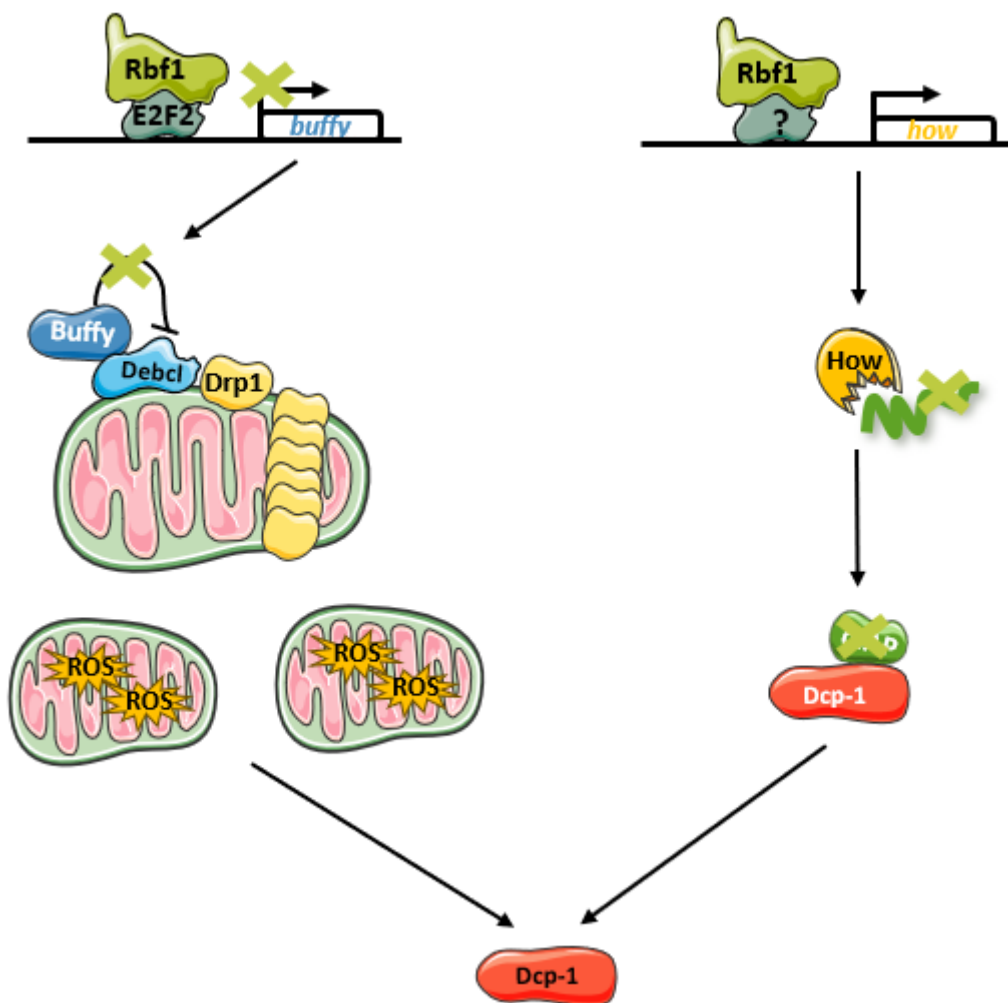


Figure 19 : L'apoptose induite par Rbf1 chez la drosophile. Rbf1 induit l'apoptose par deux mécanismes parallèles. Le premier mécanisme passe par la répression de l'expression de buffy. Cette répression permet la libération du pro-apoptotique Debcl. Debcl peut alors interagir avec Drp1 pour favoriser la fission mitochondriale. Les mitochondries fragmentées présentent une augmentation du taux de ROS conduisant à l'activation des caspases. Dans le second mécanisme Rbf1 est cette fois activateur de l'expression génique, ici le gène how. La protéine How va déstabiliser l'ARNm de dIAP, permettant la libération et l'activation des caspases.

4 Apoptose et mitophagie un destin lié ?

a. Apoptose ou mitophagie, un choix décisif pour la cellule

Avant de parler de mitophagie, l'autophagie en elle-même est très liée au processus apoptotique, en particulier ce qui concerne la protéine Beclin 1. La protéine Beclin 1 présente un fort lien avec les protéines de la famille Bcl-2. Cette protéine possède un domaine BH3 qui lui permet d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en particulier Bcl-2 et Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large) [356,357]. Cette interaction conduit à une diminution de l'autophagie. Néanmoins, contrairement aux autres protéines à domaine BH3-only, elle ne semble pas induire d'apoptose [358]. Enfin, les caspases peuvent cliver Beclin 1 au cours du processus apoptotique inhibant ainsi son rôle autophagique [359]. Cela montre le rôle clé de Beclin 1 dans la balance apoptose/autophagie. Cette interaction apoptose/autophagie souligne les liens étroits entre les protéines actrices de l'autophagie et de l'apoptose. Mais qu'en est-il de la mitophagie ?

Suite à un stress, l'apoptose intrinsèque et la mitophagie partagent leur lieu d'activation, la MME. Le destin de la cellule dépend du processus activé. Les premières hypothèses soutiennent que le processus induit dépend de la force du stress cellulaire. Un faible stress mitochondrial induit la mitophagie, ce qui suffit à éliminer les sections mitochondriales endommagées et permettre la survie de la cellule. Suite à un stress plus important, la mitophagie ne suffit plus et l'apoptose est enclenchée [360]. Au cours de ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées à l'évènement qui permet le passage d'un processus à l'autre et aux évènements décisifs qui feraient pencher la balance d'un côté (Figure 20).

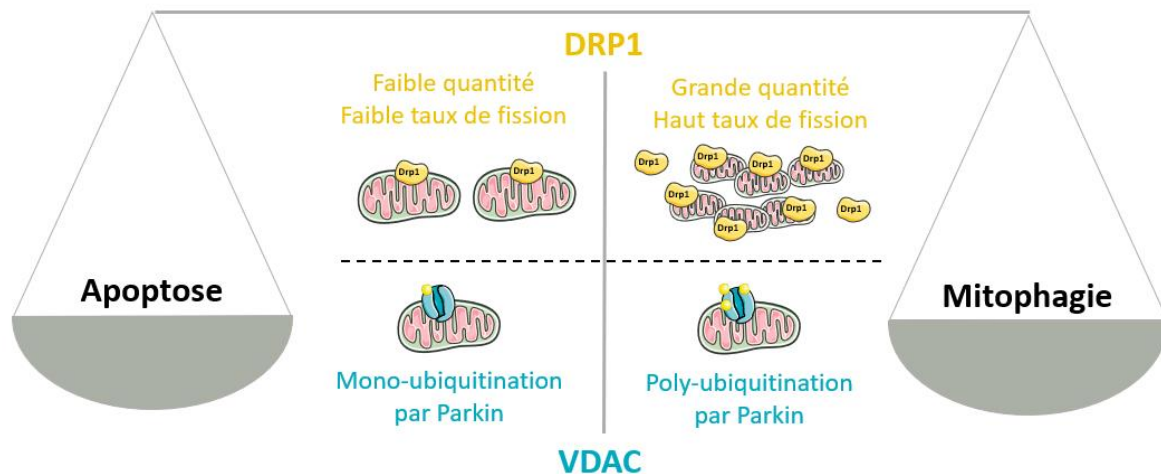


Figure 20 : Balance apoptose/mitophagie. L'équilibre entre l'apoptose et la mitophagie est notamment régulé par deux protéines localisées à la membrane externe mitochondriale, DRP1 et VDAC. Une variation de la quantité de DRP1 induit une variation du taux de fragmentation de la mitochondrie et peut moduler la balance. Pour VDAC son état d'ubiquitination, mono- ou poly-ubiquitinylé module également cette balance.

INTRODUCTION: Apoptose et mitophagie un destin lié ?

En 2022, Pernaute et al. se sont intéressés à l'apoptose au cours du développement embryonnaire [361]. L'observation initiale montre que les cellules peu différenciées présentent un faible taux d'apoptose alors que des cellules différenciées ont un haut taux d'élimination de cellules pour permettre un développement physiologique. Ces cellules présentent une morphologie mitochondriale distincte. Un haut taux de fission chez les cellules non différenciées et au contraire des mitochondries très fusionnées dans le cas de cellules différenciées. Ces morphologies s'expliquent par une différence d'activité de la protéine DRP1. L'hypothèse est que l'induction de la fission par DRP1 permet de faciliter le processus de mitophagie dans les cellules pluripotentes et ainsi de les protéger du processus apoptotique. À l'inverse, les cellules différenciées, présentent un faible taux de mitophagie favorisant la mort des cellules. Ainsi la modulation de l'activation pourrait être l'élément décisif de la survie cellulaire. En 2020, une étude a été faite chez la drosophile en utilisant des mutants *VADC1* et *Parkin* [217]. Elle conclut que le niveau d'ubiquitination de VDAC1 par Parkin détermine le destin de la cellule. La mono-ubiquitination favorise l'apoptose alors que la poly-ubiquitination est en faveur de la mitophagie.

La balance entre apoptose et mitophagie est modulée par les acteurs de ces processus. Les acteurs de l'apoptose modulent la mitophagie et réciproquement les acteurs de la mitophagie modulent le processus apoptotique.

INTRODUCTION : Apoptose et mitophagie un destin lié ?

b. Les acteurs de l'apoptose dans la mitophagie

Beaucoup de protéines inductrices de mitophagie présentent un domaine BH. En particulier un domaine BH3 only. C'est le cas des protéines BNIP3 et NIX citées plus haut dans la partie mitophagie. La présence d'un domaine BH n'implique pas forcément une action dans le processus apoptotique. Ce domaine présente une séquence assez classique. Dans le cas de la protéine BNIP3 sa première fonction identifiée chez les mammifères est un rôle pro-apoptotique et ce n'est que plus tard que son rôle pro-mitophagique a été identifié. Elle possède une activité pro-apoptotique et peut se lier aux protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL [362]. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle de BNIP3 dans le processus apoptotique : une interaction avec les protéines Bax et Bak pour permettre leur relocalisation à la membrane mitochondriale ou une inhibition des fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 ou Bcl-xL qui permet la libération des protéines à domaine BH3 only [276,311,363–365]. Un homologue de BNIP3, identifié chez *C. elegans* est capable lui aussi d'induire la mort cellulaire [366]. Chez la drosophile, une étude confirme le rôle de l'homologue de BNIP3 mammifère dans le processus apoptotique [166].

Dans le cas des protéines classiques de la famille Bcl-2, plusieurs exemples de protéines pouvant moduler le processus mitophagique existent, notamment en interagissant avec PINK1 ou Parkin. La protéine Bcl-xL est connue pour interagir avec Parkin. Elle bloque la translocation de Parkin à la membrane mitochondriale externe diminuant la mitophagie [367–369]. Dans un second article l'équipe de Martin, montre que la protéine anti-apoptotique, Bcl-2 bloque la translocation de Parkin à la membrane et que les protéines BH3 only favorisent la mitophagie. De même, les protéines Bax et Bak augmenteraient la capacité de PINK1 et Parkin à induire de la mitophagie [370]. Ces données laissent supposer que l'inhibition de l'apoptose inhiberait la mitophagie PINK1 et Parkin dépendante alors que l'apoptose l'induirait. Notre hypothèse est qu'un stress initial faible active à la fois la phase précoce de l'apoptose et la mitophagie, qui seront remplacées par l'activation irréversible de l'apoptose à partir d'un certain seuil de stress cellulaire.

c. Les acteurs de la mitophagie dans l'apoptose

Depuis sa découverte, la protéine PINK1 a été majoritairement associée à un rôle anti-apoptotique (Table 3). Cette observation est appuyée par plusieurs études sur les conséquences de la perte de la protéine PINK1 réalisées dans différents modèles. La perte de PINK1 conduit à une augmentation de l'apoptose. Ces expériences sont réalisées avec divers marquages incluant la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) ou un marquage de caspases, notamment la caspase 3 [195,371]. Cette protection face à la mort cellulaire peut-être dépendante du rôle de PINK1 dans la mitophagie [372,373] ou elle peut être indépendante de sa fonction pro-mitophagie comme cela a été montré dans Arena et al. 2013 [203]. La protéine PINK1 est capable de physiquement interagir avec la protéine Bcl-xL, la protégeant ainsi d'un clivage pro-apoptotique. Cette expérience montre que PINK1 est capable d'interagir physiquement avec les protéines de la famille Bcl2. Parmi elles, BNIP3 stabilise PINK1 [170]. PINK1 est également capable d'interagir avec la protéine Bad pour bloquer son action pro-apoptotiques [374]. Enfin, une étude chez la drosophile montre que le phénotype induit au niveau de l'œil par la perte de PINK1 est compensé par la surexpression d'une protéine anti-apoptotique Buffy. De même l'expression au niveau neuronal de Buffy quand PINK1 est déplétée, augmente la durée de vie des drosophiles [375]. L'ensemble de ces données nous montrent que d'une part PINK1 est capable d'interagir physiquement avec les protéines de la famille Bcl-2 pour permettre la survie cellulaire, et d'autre part, la perte de PINK1 peut être compensée par la surexpression de protéines anti-apoptotiques. De plus, il est suggéré que PINK1 possède un rôle indépendant de la mitophagie. Et donc un rôle qui n'implique pas la protéine Parkin.

Table 3 : Les interactions entre PINK1 et les acteurs du processus apoptotique				
Action	Organisme	Protéines	Type cellulaire	Référence
Interaction physique sans modulation de l'apoptose	Humain	Bcl-xl	Cellules HEK et Hela	[368]
		BNIP3	MEF, HEK	[170]
Inhibition apoptose	Humain	Bcl-xl	HEK293	[203]
		/	SH-SY5Y (cellules dopaminergiques)	[376]
		/	Cellules Dendritiques	[372]
		/	Cellules cancéreuses	[371]
		/	hGEC	[373]
		BAD	Cellules cancéreuses	[377]
	Souris	BAD	Neurone	[378]
		PUMA, BIM	MEF (fibroblastes embryonnaires de souris)	Suggéré dans [379]
		/	Neurones	[380]
	Drosophile	/	Neurones et muscles	[196]
/		Thorax	[195]	
/		Chambre ovocytaire/muscles	[381]	
Induction apoptose	Humain	p53	MC38 (ligné cellulaire de cancer colorectal)	[371]
	Drosophila	HtrA2/Omi	Cellule germinale	[382]

INTRODUCTION : Apoptose et mitophagie un destin lié ?

Contrairement à PINK1, Parkin semble remplir un rôle double dans le processus apoptotique, pouvant l'induire ou l'inhiber (Table 4). L'inhibition peut passer par une interaction directe avec les protéines de la famille Bcl-2. Par exemple en bloquant la translocation de la protéine Bax ou l'ubiquitination de la protéine Bak pour induire sa dégradation [383–385]. Pour la protéine Bak, une équipe a montré qu'elle peut être ubiquitinylée par Parkin pour bloquer son activation [383]. Enfin, comme pour PINK1 une étude chez la drosophile montre que le phénotype induit au niveau de l'œil par la perte de Parkin est compensé par la surexpression d'une protéine anti-apoptotique Buffy. De même l'expression au niveau neuronal de Buffy quand Parkin est déplété augmente la durée de vie des drosophiles [375,386]. En ce qui concerne son rôle pro-apoptotique, on peut une fois de plus citer son rôle dans la mono-ubiquitination de VDAC1 qui induit le processus apoptotique [217]. Dans ces circonstances Parkin interagit avec la protéine anti-apoptotique MCL1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein) de la famille Bcl-2. Parkin ubiquitinye MCL1 pour induire sa dégradation [387,388]. Cette dégradation permet la formation de pores mitochondriaux et l'activation des caspases [370]. Cette dualité de fonctions, souligne le rôle potentiellement plus complexe de Parkin dans le processus apoptotique, qui dépend probablement de nombreux facteurs qui sont à la fois des phases du développement, du type cellulaire ou même le type de stress auquel la cellule fait face.

Action	Organisme	Protéine	Type cellulaire	Référence
Inhibition de l'apoptose	Rongeur	BAX	CHO	[385]
	Drosophile	/	Multi tissus	[381]
	Humain	BAK	Cellules HELA	[383]
			Multi cellules	[384]
Souris	BAX	Neurones en cultures	[389]	
Induction de l'apoptose	Humain/Souris	VDAC1	HEK 293T/MEF	[80]
		MCL-1	Hela/MEF	[388]
	Humain	/	Hela	[367]
		MCL-1	Hela	[370]
			U2Os	[387]
Souris	/	MEF	[390]	

d. Quelles sont les conséquences de ces interactions ?

Les interactions montrées ici entre ces deux processus mitochondriaux soulignent les liens étroits mais complexes existant entre eux. On peut imaginer un système de coopération entre les deux processus pour réguler la survie cellulaire mais qu'en est-il en cas de dysfonctionnement cellulaires ? Les fonctions de ces protéines étant centrales dans l'homéostasie cellulaire, on comprend aisément que leur perte ou dysfonctionnement s'accompagnent de développement de pathologies.

L'objectif de ma thèse est donc de mieux caractériser les interactions entre ces différentes voies. Notamment comment des protéines régulant l'homéostasie mitochondriale comme PINK1 ou BNIP3 pourraient intervenir dans le processus apoptotique. Cette étude s'est inscrite dans le modèle d'induction de l'apoptose du laboratoire par production des protéines Rbf1 et Debcl dans les tissus larvaires de la drosophile.

5. Contexte du sujet et objectifs

L'apoptose et la mitophagie sont deux processus mitochondriaux qui présentent de nombreuses interconnexions. Les acteurs du processus mitophagique, considérée comme un mécanisme protecteur pour la cellule, semblent aussi moduler positivement ou négativement l'apoptose. Cette régulation dépend du type de tissu étudié et des stress cellulaires induits. Réciproquement, les acteurs de l'apoptose, notamment par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl-2, altèrent ou induisent le processus de mitophagie en fonction du contexte. Ces interconnexions apparaissent complexes et nécessitent une meilleure caractérisation.

Au cours de ces dernières années le laboratoire a caractérisé une voie apoptotique induite par surexpression de *rbf1* chez la drosophile. La cascade d'apoptose induite par Rbf1 implique pour partie la mitochondrie et les membres de la famille Bcl-2 de drosophile. La régulation et l'activité des protéines de la famille Bcl-2 chez la drosophile sont encore mal comprises. Dans l'apoptose induite par Rbf1, l'activation de Debcl au niveau de la mitochondrie devrait impliquer d'autres régulateurs non identifiés. Dans le but de trouver de nouveaux régulateurs mitochondriaux de ce processus un crible génétique avait été réalisé avant mon arrivée. Ce crible avait notamment permis d'identifier PINK1 comme un potentiel régulateur positif de l'apoptose induite par Rbf1 dans le disque imaginal d'aile. Ces résultats étaient inattendus car PINK1 est connue majoritairement pour son rôle protecteur pro-mitophagique dans de nombreuses études réalisées dans les neurones. Pour approfondir ce résultat, l'objectif de ma thèse était de caractériser les liens existants entre le processus apoptotique et les acteurs de la mitophagie.

Pour cela deux approches avaient été choisies, d'une part d'étudier si des régulateurs de la mitophagie modulaient l'apoptose induite par Rbf1 et Debcl et, d'autre part, de rechercher des partenaires de Debcl afin de mieux comprendre sa régulation et son lien éventuel avec la mitophagie. Pour la première approche, j'ai focalisé mes approches sur trois protéines impliquées dans la mitophagie PINK1, Parkin et BNIP3. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'origine de la diminution de l'apoptose induite par la perte de PINK1. Au cours de ces recherches nous avons identifié un autre modulateur de l'apoptose également impliqué dans la mitophagie, BNIP3 qui à l'inverse de PINK1, est un régulateur négatif du processus apoptotique dans notre modèle. Ces travaux m'ont permis dans un second temps de mettre en évidence que l'apoptose induite par Rbf1 et Debcl s'accompagnait de mitophagie. Nous nous avons alors cherché à caractériser le rôle de BNIP3 et PINK1 sur la mitophagie induite dans le contexte apoptotique. Ces expériences font l'objet d'un manuscrit qui figure dans cette thèse et qui sera déposé dans biorxiv.

Au vu des liens étroits entre PINK1 et Parkin, nous avons cherché à identifier le rôle précis de Parkin dans l'apoptose. Toutefois les résultats sont mitigés et ils ne nous donneront pas la possibilité d'avoir une réponse claire du potentiel rôle de Parkin dans ce processus.

Enfin, le dernier objectif de cette approche visait à comprendre l'interdépendance entre le processus de mitophagie et d'apoptose. Pour ce faire, nous avons étudié l'impact d'une diminution de l'activité des acteurs clés des deux processus sur la mitophagie ou l'apoptose. Les résultats obtenus ne montrent pas de variation significative, laissant penser que les deux processus sont indépendants.

INTRODUCTION : Contexte du sujet et objectifs

Pour la deuxième approche, nous aurions souhaité étudier les modulations de l'interactome de Debcl induites par l'absence ou la présence de PINK1. Malheureusement, aujourd'hui il n'existe pas d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine Debcl. Cela élimine toutes possibilités de réaliser des co-immunoprécipitations pour identifier les protéines interagissant avec Debcl. Nous avons donc entrepris de construire un vecteur permettant l'expression d'une protéine recombinante Debcl couplée à une enzyme capable de biotinyler les protéines à proximité, TurboID, afin de générer des lignées transgéniques. Ce projet, qui a nécessité de faire des constructions biomoléculaires complexes, a été impacté par la crise sanitaire. Au moment de la rédaction de cette thèse les drosophiles transgéniques possédant ces constructions commencent seulement à être caractérisées. Pour cette raison les résultats de la première approche constitueront la majorité des résultats présentés dans la suite de ce manuscrit.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Tables des souches

Souche	Abréviation	Génotype	Origine
Contrôle	W1118	$\left(\frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}\right)$	
Lac Z surexprimé	vg > lacZ	$\left(\frac{+}{+}; \frac{Vg - GAL4}{Cyo GFP}; \frac{UAS LacZ}{TM Tb Sb}\right)$	Bloomington 3956
Rbf1 surexprimé	vg >rbf1	$\left(\frac{+}{+}; \frac{Vg - Gal4; UAS Rbf1}{SM5 (Cyo) ^{TM} (Hu, Tb)}\right)$	Croisement de souche fourni par Joel Silber
Debcl surexprimé	vg >Debcl	$\frac{+}{+}; \frac{Vg, UAS D_2; UAS D_3}{SM5 (Cyo) ^{TM6} (Hu, Tb)}$	Croisement de souche fourni par Helena Richardson
PINK1 mutant 5	PINK1 ⁵	$\frac{PINK1[5]}{FM7}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	Bloomington 51649
PINK1 mutant B9	PINK1 ^{B9}	$\frac{PINK1[B9]}{FM7}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	Bloomington 34749
LacZ Keima	vg >lacZ, Keima	$\frac{+}{+}; \frac{Vg}{CyoGFP}; \frac{UAS Keima UAS LacZ}{TM(Tb, Sb)}$	Croisement de souche fourni par Atsushi Miyawaki
Rbf1 Keima	vg >rbf1, Keima	$\frac{+}{+}; \frac{Vg}{CyoGFP}; \frac{UAS Keima UAS Rbf1}{TM(Tb, Sb)}$	Croisement de souche fourni par Atsushi Miyawaki
RNAi trip BNIP3	RNAi BNIP3	$\left(\frac{+}{+}; \frac{UAS RNAi BNIP3}{UAS RNAi BNIP3}; \frac{+}{+}\right)$	Bloomington 42494
Trip control	UAS Luc	$\left(\frac{+}{+}; \frac{UAS Luciférase}{UAS Luciférase}; \frac{+}{+}\right)$	Bloomington 35788
Debcl mutant	Debcl ^{E26}	$\left(\frac{+}{+}; \frac{Debcl[E26]}{Cyo}; \frac{+}{+}\right)$	Bloomington 21342
p35	p35	$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{UAS p35}{UAS p35}$	Bloomington 5073
Atg7 mutant	Atg7 ^{d77}	$\frac{+}{+}; \frac{Atg7[d77]}{Cyo Tb}; \frac{+}{+}$	Souche fournie par Ármin Sóth
Atg1 mutant dominant négatif	Atg1DN	$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{Atg1}{Atg1}$	Bloomington 60736

Liste des révélateurs pour Immunofluorescence et Western Blot

Nom	Référence/marque	Dilution	Espèce hôte
Dcp-1	9578S, Cell Signaling	IF : 1/100e	Lapin
F1F0 : sous unité b ATPB	Ab14730, ABCAM	WB : 1/1000e	Souris
Drp1	8570S, Cell Signaling	WB : 1/1000e IF : 1 /100 ^e	Lapin
Drp1 phosphorylé	3455S, Cell Signaling	WB : 1/1000e	Lapin
Actine		WB : 1/500e	Souris
HA-tag	37245S, Cell Signaling	WB : 1/1000e IF : 1/500e	Lapin
	16B12, Biolegend	WB : 1/1000e IF : 1/500e	Souris
V5 Tag	R96025, Invitrogen	WB : 1/5000e IF : 1/500e	Souris
Streptavidine conjugué Alexa 488	S11223, Invitrogen	IF : 1/50e	/
Alexa 568	A11011, Invitrogen	IF : 1/200e	Lapin
Alexa 488	A11011, Invitrogen	IF : 1/200e	Souris

Comptage des phénotypes d'ailes

Le comptage des phénotypes d'ailes par observation a été fait comme décrit dans (Milet et al. 2010) pour une surexpression de *rbf1* et pour une surexpression de *debcl* (Fages et al., en préparation). Les résultats statistiques sont analysés par un test de Wilcoxon.

Immunofluorescence

Après dissection dans du Phosphate Buffered Saline (PBS), les carcasses sont fixées avec une solution de formaldéhyde 4% (Thermo Scientific 28908). Les disques imaginaux sont extraits des carcasses et saturés dans une solution de PBS-Tween 0.3%-BSA (Bovin Serum Albumin) 2% pendant 2 h avec agitation. L'anticorps primaire est ajouté et les disques imaginaux en cupule sont placés à 4°C pour la nuit. Le lendemain, les tissus sont rincés 3 fois au PBS Tween 0.3%. L'anticorps secondaire est ajouté à une dilution de 1/200^{ème} dans la solution de saturation. Après deux heures à température ambiante, l'échantillon est rincé au PBS Tween et le dernier lavage se fait avec du Hoechst dilué au 1/1000^{ème} (concentration initiale : 1 µg.µL⁻¹). Les disques sont montés sur lame avec du Prolong Diamond (15372192, Invitrogene)

TUNEL

Le marquage TUNEL est effectué selon les instructions du fabricant du Kit de détection de l'apoptose *in situ* rouge (S7165, Merck-Millipore).

Immunoprecipitation (IP)

Après dissection, les disques sont sédimentés par centrifugation et le surnageant est éliminé. Les tissus sont incubés (ou non) avec du DSP 200µM pendant 30 min à température ambiante. La réaction de cross linking est stoppée avec une solution stop (Tris pH7,5 à 40 mM).

MATERIELS ET METHODES

L'échantillon est ensuite rincé 2 fois au PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec le tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% NP 40) et un anti protéase anti phosphatase EDTA Free (Pierce, 15624189). L'échantillon est broyé au pilon mécanique durant 1 min dans la glace. L'échantillon est ensuite centrifugé à 8200 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est récupéré et le culot est éliminé. Afin de réduire le bruit de fond dû à des interactions aspécifiques l'échantillon est incubé avec 20 µL de billes non couplées (issues du kit « Immunoprecipitation kit (Protein A) » 11719394001) avec agitation à 4°C pendant 3h. Le surnageant est récupéré après centrifugation et mis à incuber avec agitation, 1h à 4°C avec l'anticorps. 20 µL de billes (« Immunoprecipitation kit (Protein A) » 11719394001, Pierce) sont ensuite ajoutés pour la nuit avec agitation. Le lendemain, la solution est centrifugée à 8200g pendant 30s puis le culot est suspendu dans une solution de rinçage et agité sur roue pendant 10 min. L'opération est répétée 3 fois. Les protéines sont dissociées des billes avec la solution de bleu dénaturant et du DTT à 50 mM et chauffées 5 min à 96°C.

Extraction des protéines

40 disques d'ailes par génotype sont disséqués et mis dans 100 µL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% NP 40) avec de l'anti-protéase anti-phosphatase EDTA Free (Pierce, 15624189). Les tubes sont stockés à -20°. Avant la migration du bleu dénaturant (NuPAGE LSD, Invitrogen, NP0007) et du DTT à 50 mM sont ajoutés à l'échantillon et l'ensemble est chauffé à 96°C pendant au moins 5 min.

WB

Pour les électrophorèses, 16 µL de chaque échantillon sont déposés dans un gel de polyacrylamide (4/16%, biorad) et la migration est effectuée dans du Tris-Glycerine-SDS Buffer (TG-SDS) durant 45 min à 175 volt. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PolyVinylidène Fluoride (PVDF) pendant 1h à 100 volts. La quantité de protéines transférées est vérifiée par le système stain free de Bio Rad. La membrane est ensuite saturée avec des protéines de lait (TBS-Tween 0,1%, milk 5%). Après saturation l'anticorps primaire est ajouté pour une nuit à 4°C (voir tableau anticorps pour référence). L'anticorps primaire est rincé avec du TBS-Tween avant d'ajouter l'anticorps secondaire couplé Horseradish Peroxidase (HRP). La révélation est faite par chimiluminescence avec enhanced chemiluminescent (ECL, ADVANTA) et par le système d'acquisition Chemidoc. Les images sont analysées par le logiciel IMAGE LAB.

Extraction ARN

Les disques imaginaires sont récupérés par dissection et mis dans du RINGER le temps de la fin de la dissection. A la fin de la dissection, les disques sont culottés par centrifugation et le RINGER est retiré. 100 µL de TRIzol (15596018, Invitrogen) sont ajoutés par tube. L'échantillon est broyé au pilon mécanique puis congelé à -20°C. Le lendemain, les échantillons sont décongelés et le TRIzol est complété à 500µL. Après centrifugation à 12 000g à 4°C la phase supérieure est récupérée puis incubée 5 min à température ambiante. Ensuite, 100 µL de chloroforme glacé sont ajoutés et une agitation manuelle est effectuée pendant 1min, s'ensuit une incubation à température ambiante de 3 min. Une seconde centrifugation à 12 000g à 4°C est effectuée pour récupérer la phase aqueuse. 1 volume d'isopropanol glacé est ajouté suivi d'une agitation manuelle. Les tubes sont stockés une nuit à -20°C Le lendemain, une centrifugation pendant 1h30

est effectuée à 21 000g à 4°C puis le surnageant est éliminé. Ensuite trois rinçages à l'éthanol 70% glacé sont effectués avec à chaque fois des centrifugations à 7 500g pour récupérer le culot. Après le dernier rinçage, le culot est séché à l'air libre avant de resuspendre les ARN dans 25µL d'eau stérile. Les tubes d'ARN sont stockés à -80°C avant utilisation.

Rétrotranscription (RT) des ARN

Les expériences de RT sont faites selon le protocole du Kit haute capacité de transcription inverse d'ADNc (4368814, Applied Biosystems™).

qPCR

Les expériences de qPCR sont faites selon le protocole du iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (1725125, BioRad).

Gène	Amorce sens	Amorce anti sens
Pink1	GACAGGACCAATTGCCGC	GGATCTCCGGACTGTTGGG
Park	AAGAATGTTCTTGCCTGGC	GGGACAGGGCAAGGTGTAG
Bnip3	TGATAGCCCCAAGAGTCCAC	GCATCCCGACTTGAATCCTC
Drp1	CCGGTCATAAACAAGCTGCA	GTCACAATACCAGTTCACGG
Uba2	ATTCAGTGCATTGTCTGGGC	CCTTGGCCTCCTTTCTCTCT

Clonage

Le clonage a été réalisé à partir du plasmide pUAS-attB et des vecteurs Debcl (NM_176098.3 GenScript) et V5-Turbo-ID (116904, Add Gene).

La séquence amplifiée de Debcl :

```
CGGATCTATGGCTCCCACCACCAGTCCGCCACCCAAGCTGGCCAAGTTCAAGTCTCGTCTGCTGGA
CCACGAGATCTACACGGCCAATCGCCGCGGCACCATTGCCACGGCCTCCAGCGACTGGAAGGCGCTCCGC
GGAGGCGTCCGGTGGAGGAGCAGGAGACCCGGTAGCGTACCCAATCCCTCTAACGGACGCTCCCTTACG
CCGGCGGACCCATGACACGGGCCGCTCCACATCCTCGCTGGCTAGCAGTACGCGCACGATGACTAACTAC
CAGGAGTACAAAATGGATATCATCAACCAGGGGAAATGTCTGTGTGGTCAAGTACATCAGAGCGCGGCTGCG
ACGGGCAGGAGTCTCAACCGGAAGGTGACACAGCGTTTTCGCAACATCCTGGACCCCGGCTCCTCGCAC
GTGGTCTATGAAGTTTTCCCGGCACTGAACAGCATGGGCGAGGAACTGGAGCGGATGCACCCGCGGGTGT
ACACAAACATATCGCGACAGCTGTGAGGGCCCCGTTTGGCGAGCTGGAGGACAGCGACATGGCGCCCAT
GTTGCTCAACCTAGTTGCCAAGGATCTTTTCGCTCCAGCATCACCTGGGGCAAGATAATCTCGATATTTGCC
GTATGCGGCGGCTTTGCCATAGACTGCGTGCAGGACATTTGACTACCTACAGTGCCTGATTGACGGT
CTGGCTGAGATCATAGAGGACGACCTGGTCTACTGGCTGATCGACAACGGCGGATGGTTGGGCTGTCGCG
GCACATCCGACCCCGGTCGGCGAATTTACGTTCTTGGGATGTTGACGCTGTTTCGTGACTATCTCTGCAGG
CGCATATATGGTCTCAAACGTGTGTCGGCGCATTGGAGGTCAACTGTAttcgctgctgttagg
```

MATERIELS ET METHODES

Les différentes enzymes utilisées pour le clonage sont listées dans le tableau suivant. Leur utilisation a été faite en suivant le guide du fabricant.

Enzyme	Fonction	Référence
Kit Polymérase Fusion	Amplification des insert	F-553L thermoscientific
Kit Polymérase Gotaq	PCR control	M890A Promega
EcoRI	Enzyme de restriction	Invitrogen
BamH1	Enzyme de restriction	Invitrogen
BglII	Enzyme de restriction	Invitrogen
Ligase	Ligation des inserts	Thermo Scientific EL0011

RESULTATS

1. Le processus d'apoptose est-il modulé par les protéines pro-mitophagie ?

a. PINK1 et BNIP3

La protéine pRb de mammifère est un oncosuppresseur dont le rôle majeur est son activité inhibitrice sur le cycle cellulaire. Par ailleurs, cette activité oncosuppressive inclut sa capacité à induire l'apoptose. Pour étudier ce rôle sur l'apoptose, le laboratoire utilise le modèle génétique de la Drosophile où l'on retrouve un homologue de pRb, Rbf1. La surexpression de *rbf1*, chez la larve, dans les disques imaginaux d'aile, conduit à une mort cellulaire par apoptose. Elle implique les membres de la famille Bcl-2, Buffy et Debcl. Debcl, en interagissant avec DRP1, permet la fission mitochondriale, la production de ROS et la mort par apoptose. Cette mort au stade larvaire se traduit par des pertes de tissus au niveau de l'aile adulte. Un crible génétique a été mis en place pour identifier des modulateurs d(es) événement(s) cellulaire(s) induit(s) par la surexpression de *rbf1* ou *debcl*. La surexpression de *rbf1* ou de *debcl* dans le domaine vestigial (vg) du disque d'aile induit un phénotype de pertes de tissus appelé encoche au niveau de la marge de l'aile adulte. Ce phénotype d'encoches a permis de mettre en place des tests d'interaction génétique afin d'identifier des modulateurs de l'effet de Rbf1 ou de Debcl. En fonction de la modulation du phénotype, aggravation ou amélioration, il nous est possible de déterminer l'effet sur l'apoptose de ces gènes candidats. Dans ce contexte, le crible génétique a ciblé notamment des acteurs de la dynamique mitochondriale. Parmi les candidats, deux ont retenu notre attention : les protéines PINK1 et BNIP3 qui sont connues pour leur implication dans la régulation de la mitophagie. Ce travail est en cours d'écriture dans un article qui sera sous peu déposé sur bioRxiv.

Dans cet article, nous montrons que PINK1 régule positivement l'apoptose induite par la surexpression de *rbf1* ou *debcl*. À l'aide de mesures du taux de mort cellulaire par apoptose et de tests d'interaction génétique, nous montrons que l'action de PINK1 dans l'apoptose se situe en aval ou au niveau de la protéine Debcl.

Pour comprendre le mode d'action de PINK1, plusieurs hypothèses ont été testées, notamment un effet de PINK1 sur la quantité de protéines Debcl. Ainsi, nous avons observé que la perte de PINK1 ne modifiait pas la stabilité de Debcl.

Pour la protéine BNIP3, nous avons obtenu des résultats différents. En condition d'induction d'apoptose, la diminution de l'expression de *BNIP3* au niveau du domaine vestigial conduit à une augmentation de la perte de tissu adulte. Dans le cas de l'apoptose induite par Rbf1, une diminution du niveau d'apoptose est observée si BNIP3 est déplété. Par contre, pour Debcl, la variation de la force du phénotype n'est pas liée à une variation du taux d'apoptose dans le tissu larvaire. Ces résultats suggèrent une action de BNIP3 sur un autre processus cellulaire que l'apoptose, induisant également une perte de tissu en contexte de surexpression de *debcl*.

Enfin, étant donné l'activité connue de PINK1 et BNIP3 sur la mitophagie, l'impact de l'expression de *rbf1* ou *debcl* sur l'induction de la mitophagie a été mesurée, en utilisant les outils mt-QC et mt-Keima. Nous avons observé une augmentation de la mitophagie associée à la surexpression de *rbf1* ou *debcl*. Les résultats montrent que PINK1 semble impliquée dans la mitophagie induite par Rbf1 alors que ce n'est pas le cas pour la mitophagie induite par Debcl.

BNIP3, pour sa part, ne serait pas impliquée dans la mitophagie induite par Rbf1. Pour Debcl, les résultats ne sont pas encore exploitables. Toutefois un résultat intéressant montre que la mitophagie basale dans le disque d'aile est modulée de façon opposée par la diminution de PINK1 ou de BNIP3. En effet, l'absence de PINK1 conduit à une augmentation de la mitophagie basale alors que la diminution de BNIP3 la réduit.

En conclusion, ces résultats soulignent les liens étroits entre les régulateurs de l'apoptose et ceux de la mitophagie. PINK1 est capable de moduler l'apoptose induite par Rbf1 en aval ou au niveau de protéine Debcl. Concernant BNIP3, elle a une action opposée à celle de PINK1 en protégeant de l'apoptose induite par Rbf1 ou de la perte de tissu induite par Debcl. Enfin, la mitophagie induite par Rbf1 semble dépendre de PINK1 et non de BNIP3, ce qui n'est pas le cas de la mitophagie induite par Debcl. Les résultats sont résumés dans la Figure 21 page 99.

PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*.

Mélanie Fages¹, Vincent Ruby¹, Mégane Brusson^{1, #}, Aurore Arnold-Rincheval¹, Christine Wintz¹, Sylvina Bouleau^{1*} and Isabelle Guéna^{1*}

1 Université Paris-Saclay, UVSQ, LGBC, 78000, Versailles, France

* Correspondence: isabelle.guenal@uvsq.fr ; sylvina.bouleau@uvsq.fr

Present address: Imagine Institute, Université de Paris, INSERM UMR 1163, Paris, France.

Abstract

The structure and function of the mitochondrial network are finely regulated. Among the proteins involved in these regulations, mitochondrial dynamics actors have been reported to regulate the apoptotic process. We show here in the *Drosophila* model that the mitophagy inducers, PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) and BNIP3 (Bcl-2 Interacting Protein 3), modulate mitochondrial apoptosis differently. If close links between the fission-inducing protein DRP1 and Bcl-2 family proteins, regulators of apoptosis, are demonstrated, the connection between mitophagy and apoptosis is still poorly understood. In *Drosophila*, we have shown that Rbf1, a homolog of the oncosuppressive protein pRb, induces cell death in proliferating larval tissues through a mechanism involving the interaction of Drp1 with Debcl, a pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family. This interaction is necessary to induce mitochondrial fission, ROS production, and apoptosis.

To better understand the interactions between the proteins involved in mitochondrial homeostasis and the apoptotic process, we focused on the role of two known players in mitophagy, the proteins PINK1 and BNIP3, during mitochondrial apoptosis induced by Rbf1 and Debcl in a proliferating *Drosophila* larval tissue. We show that Rbf1- or Debcl-induced apoptosis is accompanied by mitophagy. Interestingly, PINK1 and BNIP3 have distinct effects in regulating cell death. PINK1 promotes *rbf1*- or *debcl*-induced apoptosis, whereas BNIP3 protects against Rbf1-induced apoptosis but reduces Debcl-induced tissue loss without inhibiting Debcl-induced cell death. Furthermore, our results indicate that BNIP3 is required to induce basal mitophagy while PINK1 is responsible for mitophagy induced by *rbf1* overexpression. These results highlight the critical role of mitophagy regulators in controlling homeostasis and cell fate.

Keywords: mitophagy, apoptosis, PINK1, BNIP3, Rbf1, Debcl

Introduction

Several processes involved in cell survival and death have been identified at the mitochondrial level. In terms of mechanisms, the factors that determine when a cell leans toward death, and their regulations are essential fields of investigation. Apoptosis and mitophagy, a macroautophagy targeting mitochondria, can involve some familiar actors [1]. Investigating the interplay between apoptosis and mitophagy will help to clarify these regulatory mechanisms. We used the *Drosophila* model to address how these distinct processes are coordinated in an apoptotic context.

In mammals, Bcl-2 family proteins are the central players in mitochondrial apoptosis [2,3], controlling mitochondrial remodeling, outer membrane permeabilization (MOMP), and the resulting release of pro-apoptotic factors from mitochondria. Indeed, mitochondrial network fragmentation is a crucial event [4,5] that occurs concomitantly with MOMP. Bax, a Bcl-2 family pro-apoptotic protein, can interact and be activated by Drp1 (Dynamin-related protein 1), the master protein controlling mitochondrial fission. Both proteins are recruited at mitochondrial foci corresponding to mitochondrial fragmentation sites [6]. The mechanism by which mitochondrial fragmentation is linked to apoptosis machinery is still debatable.

In *Drosophila*, only three members of the Bcl-2 family have been identified. Two are mainly pro-apoptotic, Debcl [7,8] and Sayonara [9], and one is primarily anti-apoptotic, Buffy [10]. We have previously shown that over-expression of *rbf1*, the *Drosophila* pRB homolog, induces mitochondrial apoptosis in epithelial tissues such as wing imaginal discs [11]. During Rbf1-induced apoptosis, Rbf1 transcriptionally represses *buffy*, and Debcl is required downstream of *buffy* repression [12]. Once activated, Debcl can interact with the mitochondrial fission protein Drp1, leading to mitochondrial network fragmentation managed by Drp1, Reactive Oxygen Species accumulation, and caspase activation, which seals cell fate [11]. In this pathway, a loss of function of *Drp1* decreases the apoptosis rate, highlighting the essential role of mitochondrial network fission in apoptosis. Furthermore, Debcl/Drp1 interaction at the mitochondria is necessary for mitochondrial fragmentation and Debcl-induced apoptosis [11].

Mitochondrial dynamics maintains mitochondrial homeostasis and quality control, which are central to cell metabolic adaptation and survival [13]. Mitophagy appears to be essential among other regulatory mechanisms that modulate mitochondrial homeostasis [6]. Mitophagy can be activated in physiological conditions for mitochondrial renewal or as a stress response, and numerous mitophagy inducers have been identified [15]. Among them, two categories of mitophagy-inducing receptors emerge. The first involves direct receptors containing a LIR (LC3-interacting region) motif that allows them to bind to LC3 on the autophagosome. One of them is BNIP3 (Bcl-2 Interacting Protein 3). In

mammals, BNIP3 is associated with developmental mitophagy. It also has a role in metabolic stress and response to hypoxia factors, as reviewed in [16]. The second category involves an indirect receptor, which creates a ubiquitin chain on proteins of the targeted mitochondrial section. Polyubiquitin is recognized by an adaptor that binds LC3 on the autophagosome [17]. PINK1 (PTEN-induced Kinase 1) and Parkin (a ubiquitin ligase E3) proteins are major inducers. Their activation is mainly dependent on mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$). A decrease in $\Delta\Psi_m$ leads to an arrest of PINK1 import, accumulating on the outer mitochondrial membrane [18–20]. PINK1 can then phosphorylate its targets, including Parkin, allowing its mitochondrial relocalization and initiating its activation [21–23]. Therefore, Parkin polyubiquitinates its mitochondrial targets, including regulators of mitochondrial dynamics.

Mitochondrial dynamics appears to be at the center of apoptosis and mitophagy processes. Likewise, the interconnection between apoptosis and mitophagy shows interactions between both protagonists and even a dual role for some proteins [1]. In mammals, BNIP3 has a BH3 domain. It is associated with a pro-apoptotic function [24], whereas, in *Drosophila*, few studies have focused on the role of BNIP3 in mitophagy [25–27], and, to our knowledge, only one explored the role of BNIP3 in apoptosis [28]. Concerning PINK1, Han *et al.* observed increased levels of apoptosis induced by a mutation altering the PINK1 kinase activity in *Drosophila* [29]. Here, we investigated the role of PINK1 and BNIP3 in *rbf1*- and *debcl*-induced apoptosis in *Drosophila*. We showed that mitophagy is associated with both *debcl*- and *rbf1*-induced apoptosis.

Interestingly, we identified PINK1 as a positive regulator of apoptosis and BNIP3 as a pro-survival factor. By downregulating mitophagy inducers, we show that BNIP3 anti-apoptotic activity could be due to its ability to induce basal mitophagy, whereas Rbf-1 induces a PINK1-dependent mitophagy. Together, these results highlight a pro-apoptotic role for PINK1 and a protective role for BNIP3 regardless of their pro-mitophagy function under certain conditions.

Results

PINK1 promotes *rbf1*-induced apoptosis

We have previously shown that *rbf1*-induced apoptosis requires mitochondrial fission mediated by Drp1 [11]. This observation raises the question of how Rbf1 can regulate mitochondrial dynamics.

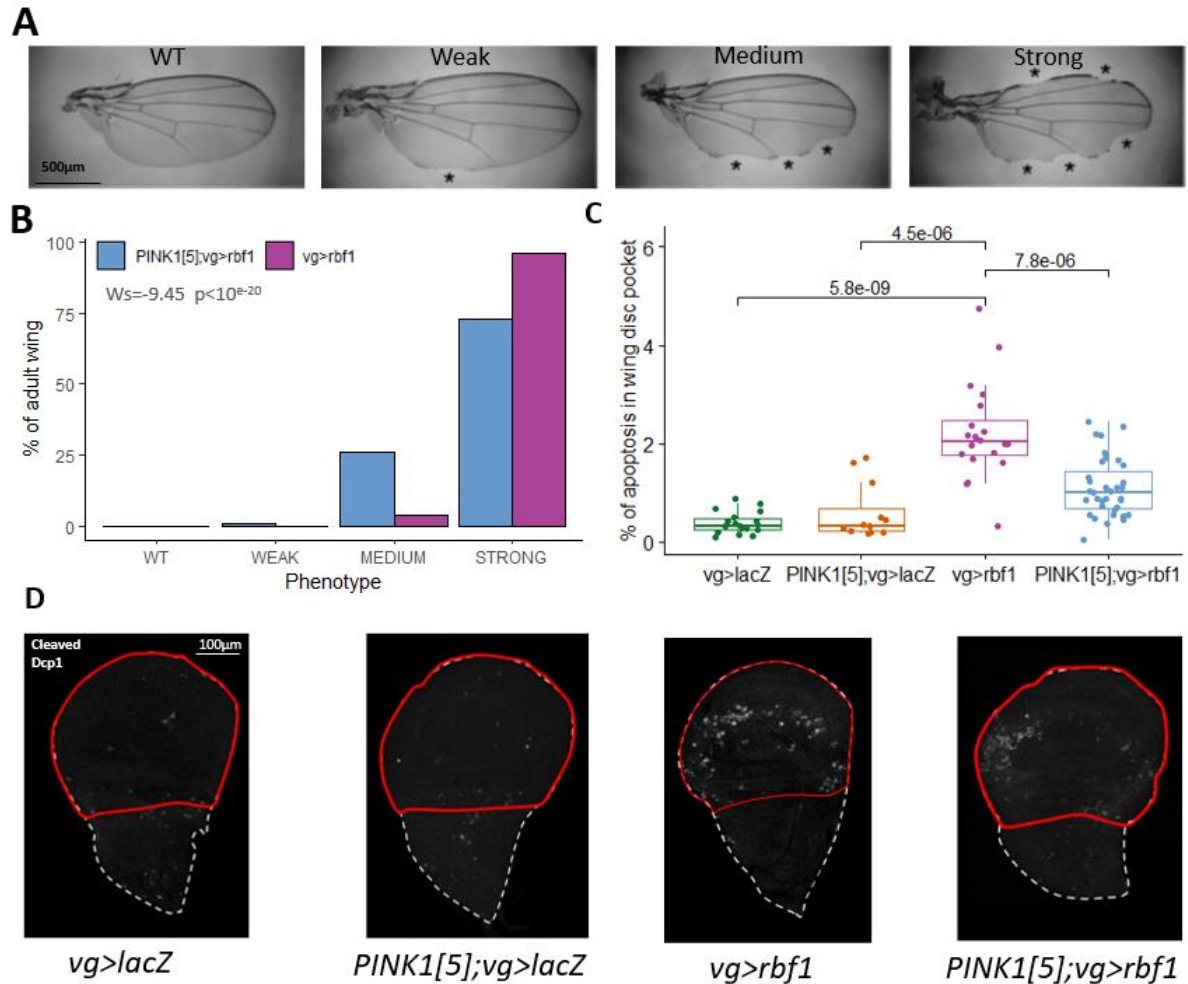


Figure 1: Absence of functional PINK1 decreases the level of apoptosis induced by Rbf1. **A.** Adult wing phenotypes induced by *rbf1*-overexpression in the vestigial wing imaginal disc domain. Phenotypes are classified from Wild Type (WT) to Strong, depending on the number of notches on the wing margin (asterisks) (Milet et al. 2010). **B.** Histogram showing the frequency of different phenotypes. The number of wings observed is n=197 for **vg>rbf1** and n=165 for **PINK1[5]; vg>rbf1**. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. This result is representative of three independent experiments. **C.** Detection of apoptosis in wing imaginal discs using an anti-cleaved Dcp-1 antibody staining. The level of apoptosis is estimated by measuring the area of apoptotic staining compared to the area of the wing pouch (surrounded in red in D). Every point corresponds to the value obtained for one imaginal disc. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and post hoc Wilcoxon test. This result is representative of three independent experiments. **D.** Confocal images of apoptosis detection in wing discs using an anti-cleaved Dcp-1 antibody staining with the same genotype mentioned above. The red line delimits the wing pouch. Genotypes are as follow *W118/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+* (**vg>lacZ**); *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+* (**PINK1[5]; vg>lacZ**); *W118/Y; vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* (**vg>rbf1**); *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+* (**PINK1[5]; vg>rbf1**).

When *rbf1* is overexpressed in the vestigial domain (vg) of the larval wing imaginal disc using the UAS/Gal4 system, an adult wing-notched phenotype is observed [30] (Figure 1A). Using specific RNA interference (RNAi) or hemizygous loss of function mutant background, we investigated whether downregulation of several regulators of the mitochondrial homeostasis affects the *rbf1*-induced wing phenotype. Among the candidates tested, *PINK1* emerged as an exciting candidate, as *PINK1* loss of function mutant context significantly decreases *rbf1*-induced wing phenotype strength (Figure 1B). This experiment, performed using the *PINK1*⁵ mutant [18], which lacks its mitochondrial targeting sequence and more than 70% of its kinase domain, was confirmed in a *PINK1* knockdown background (*PINK1*^{RNAi}) or using another mutant, *PINK1*^{B9} [19] (Sup. table 1). To determine whether the partial suppression of the *rbf1*-induced phenotype is associated with a reduction in the level of apoptosis during wing development, we performed immunostaining using an anti-cleaved Dcp-1 (*Drosophila*-caspase-1) as a marker of apoptosis in the wing imaginal disc (Figure 1D) [31]. As expected, *rbf1* overexpression induces a significant increase in apoptosis. However, this apoptosis is significantly reduced in the context of *PINK1*⁵ hemizygous loss of function (Figure 1C and D, *PINK1*⁵; *vg>rbf1*). These results suggest a pro-apoptotic role for *PINK1* in *rbf1*-induced apoptosis. Since *Rbf1* is a transcriptional cofactor, it was tempting to speculate that the *PINK1* gene might be a target of *Rbf1* involved in the apoptotic process. However, qRTPCR assays clearly showed that this was not the case (see Sup. figure 1).

PINK1* acts at the level or downstream of *Debcl* in the apoptotic process induced by *rbf1

Debcl, a Bcl-2 family pro-apoptotic protein, was previously shown to be required for *rbf1*-induced apoptosis [11]. *debcl* overexpression is sufficient to recapitulate the mitochondrial events induced by *rbf1* overexpression: mitochondria fission mediated by *Drp1* and increased ROS levels. Considering *PINK1*'s role in mitophagy and mitochondrial dynamic modulation, we wanted to know whether *PINK1* acts upstream or downstream of *Debcl* in the *rbf1*-induced apoptotic pathway. Therefore, similar experiments were carried out by overexpressing *debcl* in the vg domain. *debcl* overexpression leads to a specific phenotype, ranging from a loss of bristles (weak) to large notches at the posterior and anterior part of the wing (strong) (Figure 2A). Overexpression of *debcl* in *PINK1* loss of function background (*vg>debcl*; *PINK1*⁵) induces a significant shift of the distribution of the phenotypes towards weaker phenotypes (Figure 2B). In addition, at the molecular level, in the wing imaginal disc, massive caspase activation is detected by anti-Dcp-1 staining in the *debcl* overexpression context (Figures 2C and D). This apoptosis is significantly decreased when *debcl* expression is induced in the *PINK1*⁵ hemizygous background (Figure 2C). Thus, as shown for *Rbf1*, *PINK1* depletion leads to decreased phenotype strength and reduced apoptosis, suggesting that *PINK1* action in *rbf1*-induced apoptosis is

at the level of, or downstream from, *Debcl*. We hypothesized that PINK1 could increase the level of *Debcl*, thereby promoting apoptosis. Western blot experiments (Sup. Figure 2) show that PINK1 action in *rbf1*-induced apoptosis does not involve an increase in *Debcl* levels.

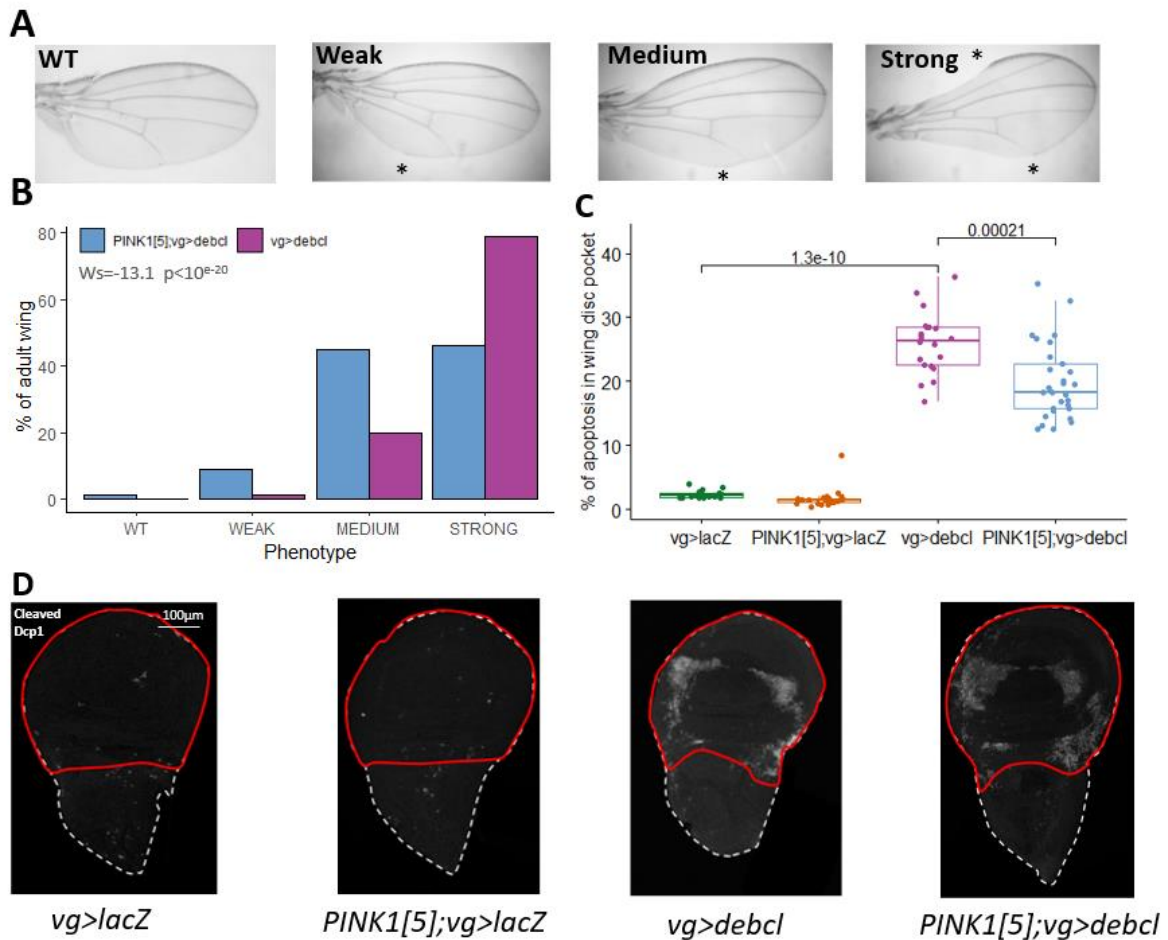


Figure 2: Absence of functional PINK1 decreases *debcl*-induced apoptosis. **A.** Adult wing phenotype induced by *debcl*-overexpression in the vestigial wing imaginal disc domain. Phenotypes are classified from Wild Type (WT) to Strong, depending on the notch size on the posterior and the anterior part of the wing (asterisks). **B.** Histogram showing the frequency of different phenotypes. The number of wings observed is n=173 for *vg>debcl* and n=163 for *PINK1[5]; vg>debcl*. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. This result is representative of three independent biological experiments. **C.** Detection of apoptosis in the wing imaginal disc using an anti-cleaved Dcp-1 antibody. The level of apoptosis is estimated as in Figure 1. Each point corresponds to the value obtained for one imaginal disc. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and post hoc Wilcoxon test. This result is representative of three independent experiments. **D.** Confocal images of apoptosis detection in wing imaginal discs using an anti-cleaved Dcp-1 antibody. The red line delimits the wing pouch. Genotypes are as follow *W118/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+ (vg>lacZ)*; *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+ (PINK1[5]; vg>lacZ)*; *W118/Y; vg-Gal4/UAS-debcl; UAS-debcl/+ (vg>debcl)*; *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-debcl; UAS-debcl/+ (PINK1[5]; vg>debcl)*.

rbf1 overexpression induced a PINK1 dependent mitophagy.

It is widely reported that mitophagy is a pro-survival process that allows the degradation of damaged mitochondria, preventing apoptosis. As the role of PINK1 in mitophagy is well documented, it was unexpected that PINK1 could favor *rbf1*- and *debcl*-induced apoptosis. This led us to question if mitophagy was induced in the *rbf1*- or *debcl*-induced apoptotic context. We used the Mito-Keima protein [32,33], a recombinant protein harboring a mitochondrial targeting sequence, to examine this hypothesis. Keima is a fluorochrome resistant to pH degradation. At a neutral pH (close to intra-mitochondrial pH), Keima is excitable at 405 nm and 550 nm wavelengths, with an emission of 650 nm. Still, only one wavelength can excite the fluorochrome at acidic pH (like in autophagosome), 550 nm. This system distinguishes cytosolic mitochondria and mitochondria undergoing mitophagy (figure 3A).

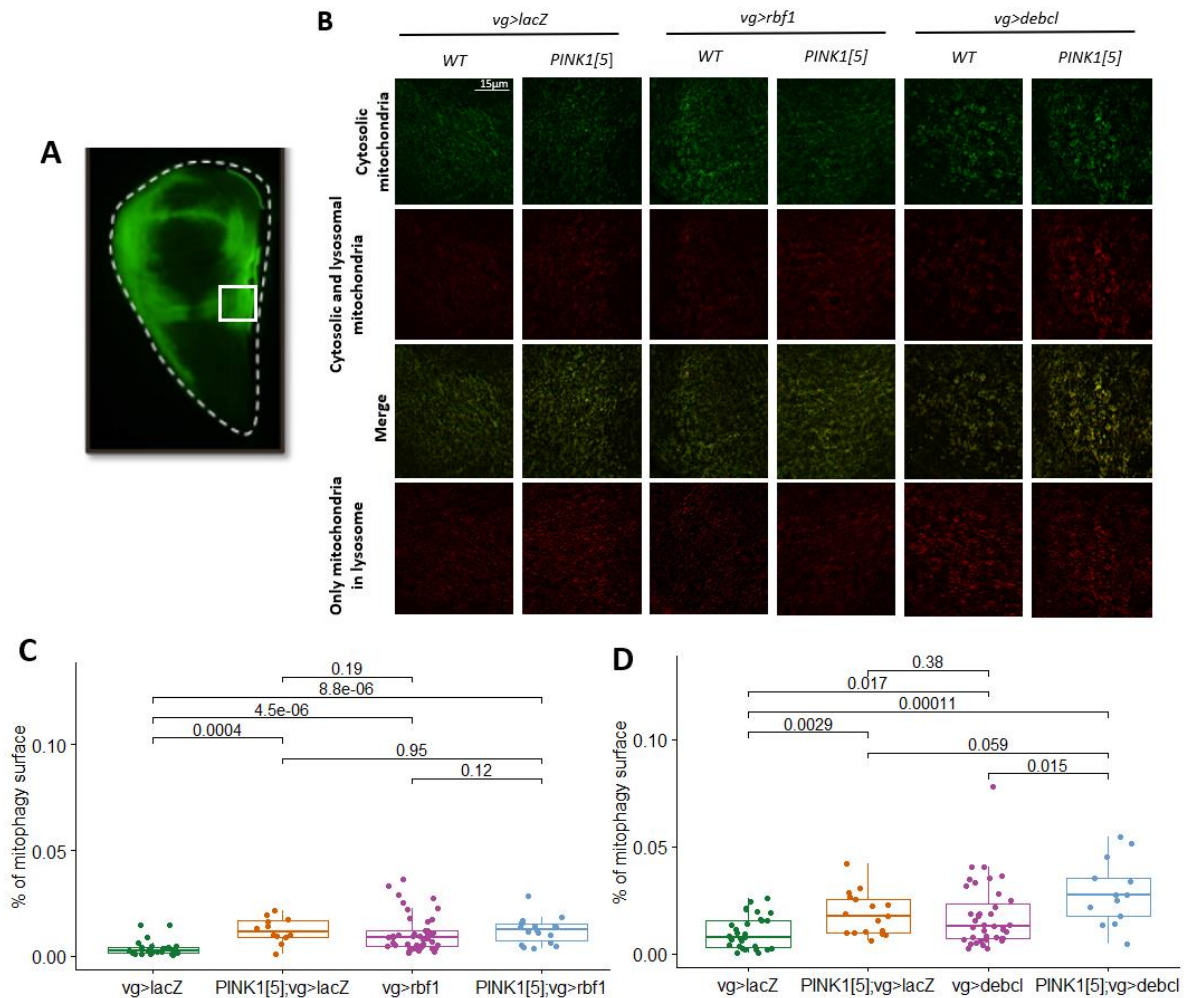


Figure 3: *debcl*-induced mitophagy is independent of PINK1, unlike *rbf1*-induced mitophagy. **A.** Confocal image of wing Imaginal disc expressing GFP in *vg* domain. White square corresponds to the selected zone for mitophagy imaging. **B.** Confocal microscopy images of wing imaginal discs co-expressing *Mito-Keima* gene with an apoptotic inducer (*rbf1* or *debcl*) or a control gene (*lacZ*), in PINK1 mutant (PINK1[5]) or wild type background. The green color corresponds to the emission at 620 nm after excitation at 405 nm, corresponding to mitochondria with a physiological pH. The red color corresponds to the emission at 620 nm after excitation at 550 nm, corresponding to mitochondria in physical and acid pH. In yellow, a merge of those two stainings. In the last line, the specific spots identified as mitophagy after subtracting the green staining (cytosolic mitochondria) from the red staining (cytosolic mitochondria + mitochondria in acid pH). **C-D.** Mitophagy was quantified with *Mito-Keima* fluorescence as described in A (and see material and methods). The histograms represent the pool of three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. Genotypes are as follow *W1118/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ, UAS-Mito-Keima/+ (vg>lacZ)*; *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ, UAS-Mito-Keima/+ (PINK1[5]; vg>lacZ)*; *W1118/Y; vg-Gal4/+; UAS-rbf1, UAS-Mito-Keima /+ (vg>rbf1)*; *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-rbf1, UAS-Mito-Keima/+ (PINK1[5]; vg>rbf1)*; *W1118/Y; vg-Gal4/UAS-debcl; UAS-debcl, UAS-Mito-Keima/+ (vg>debcl)*; *PINK1⁵/Y; vg-Gal4/UAS-debcl; UAS-debcl, UAS-Mito-Keima/+ (PINK1[5]; vg>debcl)*.

Keima staining shows mitophagy induction in the wing disc when *rbf1* or *debcl* are overexpressed compared to *lacZ* expression as control (figure 3B and 3C). We, therefore, investigated the role of PINK1 in *rbf1*- and *debcl*-induced mitophagy. Mitophagy was measured in wild type or PINK1 loss of function background (PINK1[5]; *vg>lacZ*). Surprisingly, PINK1 loss of function alone already induces an increase in mitophagy level, probably due to cell stress caused by the loss of PINK1 compared to a control condition. *rbf1* and *debcl* overexpression also induce an increase in mitophagy. In the case of the expression of *rbf1* in PINK1 loss of function background, there is no increase in the mitophagy level compared to the level observed for PINK1 mutation alone or *rbf1*-overexpression alone. Thus, no additive effect was observed, suggesting *rbf1*-induced mitophagy is dependent on PINK1 activity. For *Debcl*, on the contrary, an increase in mitophagy level is observed in PINK1[5]; *vg>debcl* context compared to PINK1 loss of function alone or *debcl* overexpression alone, suggesting an additive effect and therefore two independent effects on mitophagy. Therefore, *debcl*-induced mitophagy is not dependent on PINK1. Furthermore, this observation indicates that mitophagy machinery induced in PINK1 mutation context is not saturated. Thus, the absence of mitophagy increase in PINK1[5]; *vg>rbf1* context compared to *vg>rbf1* enforces the hypothesis that PINK1 regulates *rbf1*-induced mitophagy.

BNIP3 protects from the *rbf1*-induced apoptosis

We looked at BNIP3, a mitophagy receptor independent of the PINK1/Parkin pathway, to test whether other mitophagy regulators could modulate apoptosis in our models. BNIP3 has an atypical BH3 domain in mammals, and this protein is also described to regulate apoptosis (Ray et al. 2000). Therefore, we decided to test the *Drosophila* BNIP3 implication in apoptosis and mitophagy observed in *rbf1*- and *debcl*-overexpression contexts. We co-expressed in some wing disc cells *rbf1* or *debcl* with an UAS-BNIP3RNAi transgene, which allows us to knock down BNIP3 expression. After verifying that the BNIP3

level is significantly decreased in the presence of this RNAi (Figure 4A), we observed that the strength of the *rbf1*-induced phenotype is strongly increased when the *BNIP3* level is lower (Figure 4B). This effect is associated with increased cleaved Dcp-1 staining in imaginal wing discs (Figure 4C). Overall, those results highlight that BNIP3 can counteract the *rbf1*-induced apoptosis.

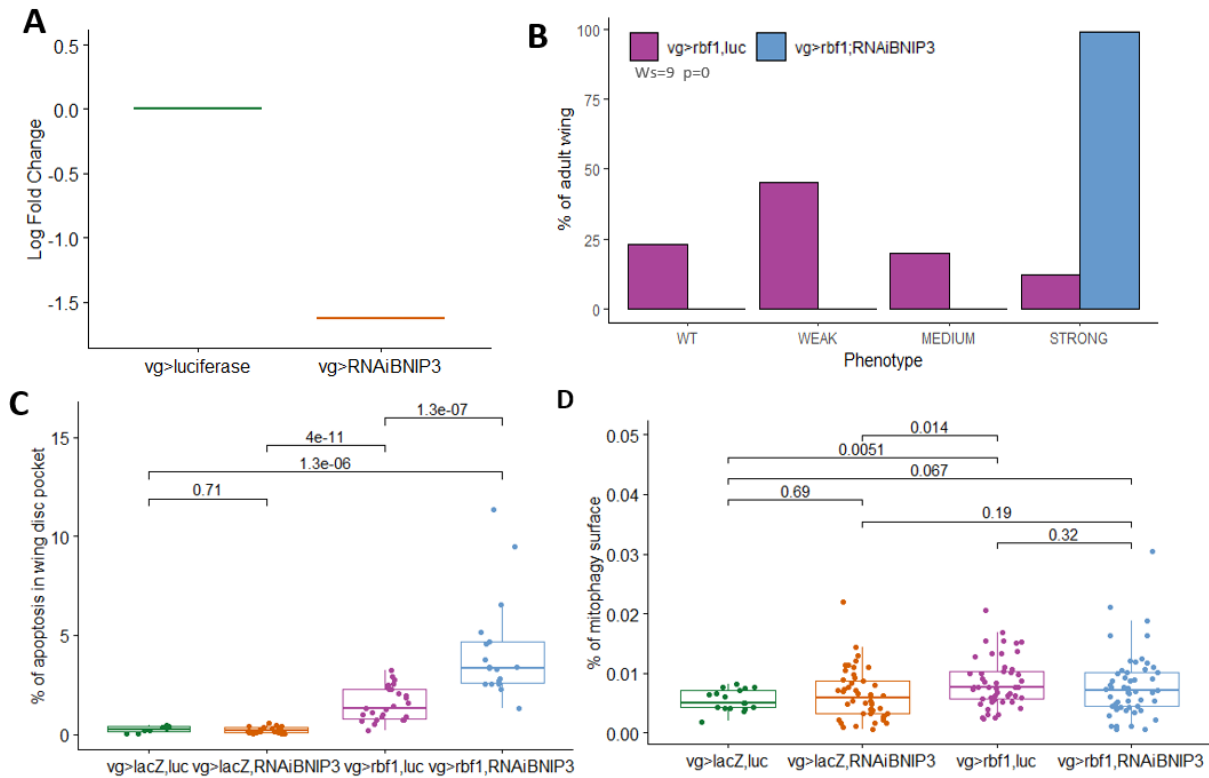


Figure 4: Decreasing BNIP3 level increases *rbf1*-induced apoptosis but has a minor effect on *rbf1*-induced mitophagy. A. Quantification by RT-qPCR of BNIP3 mRNA levels in wing imaginal discs expressing UAS-*BNIP3*^{RNAi} (vg>RNAiBNIP3) or the control UAS-*luciferase* (vg>luciferase). The graph presents fold change of RNAi BNIP3 vs Luciferase control. Gene expression is normalized against *Uba-1*. **B** Histogram showing the frequency of different phenotypes. The number of wings observed is n=113 for **vg>rbf1, luc**, and n=86 for **vg>rbf1, RNAi BNIP3**. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. This result is representative of two independent experiments. **C.** Detection of apoptosis in wing imaginal discs using an anti-cleaved Dcp-1 antibody. The level of apoptosis is detected by measuring the area of apoptotic staining compared to the area of the wing pouch. Every point corresponds to the value of one imaginal disc. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and post hoc Wilcoxon test. This result is representative of two independent experiments. **D.** Mitophagy was quantified with Mito-Keima fluorescence as described in figure 3.A (and see material and methods section). The histograms represent the pool of three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. Genotypes are as follow : +/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase (**vg>luc**); +/Y; vg-Gal4/UAS-*BNIP3*^{RNAi} (**vg>RNAi BNIP3**); +/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-lacZ/+ (**vg>lacZ, luc**); +/Y; vg-Gal4/UAS-*BNIP3*^{RNAi}; UAS-lacZ/+ (**vg>lacZ, RNAi BNIP3**); +/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-*rbf1*/+ (**vg>rbf1, luc**); +/Y; vg-Gal4/UAS-*BNIP3*^{RNAi}; UAS-*rbf1*/+ (**vg>rbf1, RNAi BNIP3**). In D. all flies also have a UAS-Mito-Keima sequence on chromosome III.

Next, we examined the consequences of knocking down BNIP3 on the level of mitophagy induced by overexpressing *rbf1*. First, we used mt-Keima staining and found no significant effect of BNIP3 knockdown (Figure 4D). To confirm this result, we used another similar method, Mito-QC staining. This tool allows us to distinguish mitochondria in the cytosol, excitable with GFP and mCherry length wave, and mitochondria in an acidic medium where only mCherry is detectable. Using Mito-QC, the same results were obtained as using mt-Keima, showing that mitophagy level does not change when cells are depleted in BNIP3 (Sup. figure 3). Those results confirmed that BNIP3 is not the protein responsible for mitophagy in the case of *rbf1* overexpression. Accordingly, RT qPCR experiments allow us to verify that *rbf1* overexpression does not change *BNIP3* level transcripts (Sup. figure 1).

BNIP3 depletion modulates *debcl*-induced phenotype but does not affect *debcl*-induced apoptosis at the larval stage.

BNIP3's role in cellular events induced by *debcl* overexpression was then tested. First, we observed a massive shift in phenotype strengths toward a stronger one (Figure 5A). So, the depletion of BNIP3 aggravates *debcl*-induced phenotypes. Surprisingly, cleaved caspase staining (Figure 5B) shows no significant variation in apoptosis level in the larval wing disc. Regarding the large variance between wing imaginal discs, apoptosis was also quantified using TUNEL staining (Sup. figure 4), and the same results were obtained, confirming that BNIP3 depletion does not alter *debcl*-induced apoptosis at the larval stage. Unfortunately, in the control genetic background used in this experiment (+/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-lacZ/+), we do not see any increase in mitophagy associated with *Debcl* overexpression (Figure 5C), which preclude to study an effect of knocking down BNIP3 on *debcl*-induced mitophagy. Interestingly, BNIP3 RNAi expression in control condition (vg>lacZ, RNAi BNIP3) shows a decrease in mitophagy. Therefore, BNIP3 might be a regulator of basal mitophagy. Together, these results indicate that BNIP3 is implicated in *debcl*-induced phenotype but has no role in *debcl*-induced apoptosis at the larval stage.

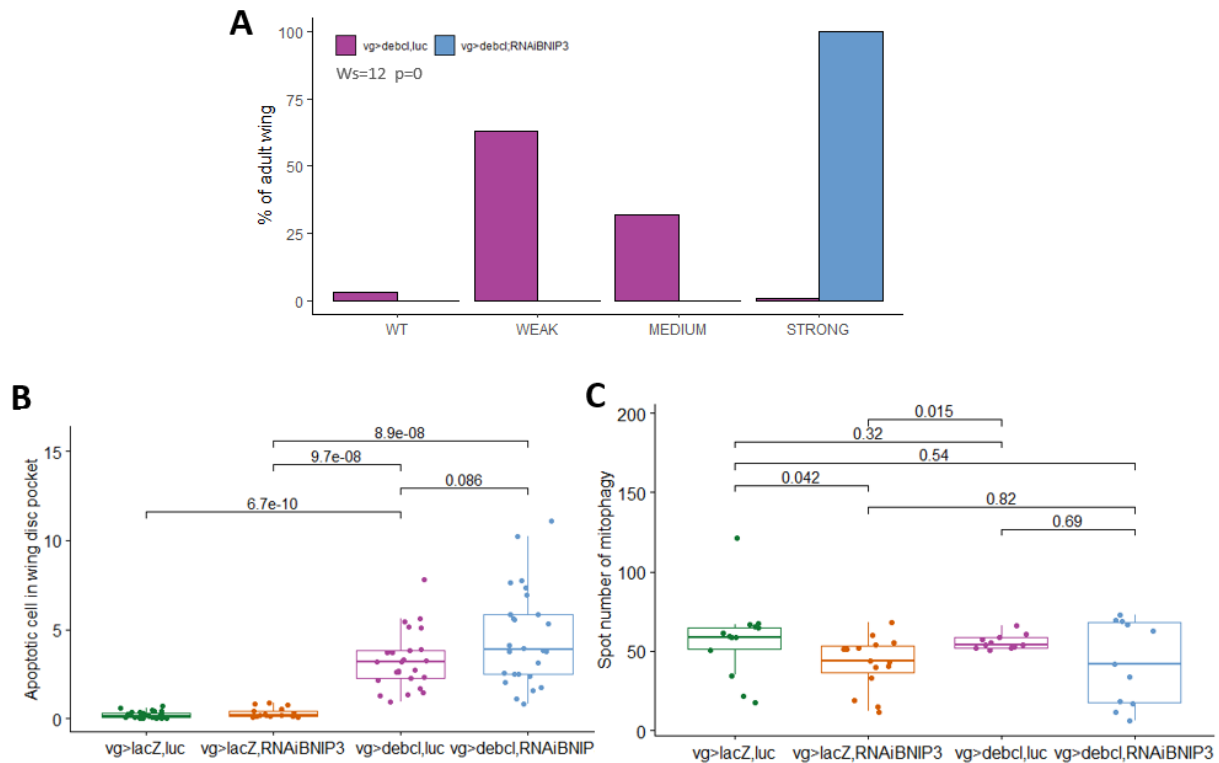


Figure 5: Decreasing BNIP3 level increases *debcl*-induced tissue loss without modulating *debcl*-induced apoptosis in larval stage

A. Histogram showing the frequency of different phenotypes. The number of wings observed is $n=101$ for **vg>debcl, luc** and $n=99$ for **vg>debcl, RNAi BNIP3**. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. This result is representative of two independent experiments. **B.** Detection of apoptosis in wing imaginal discs using an anti-cleaved Dcp-1 antibody. The level of apoptosis is detected by measuring the area of apoptotic staining compared to the area of the wing pouch. Every point corresponds to the value of one imaginal disc. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and post hoc Wilcoxon test. This result is representative of two independent experiments. **C.** Mitophagy was quantified with Mito-QC fluorescence (see material and methods). The histograms represent one experiment. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. Number of mitophagy spots quantified per image. Each point represents the value obtained for independent discs. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. Genotypes are as follow : $+/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-lacZ/+$ (**vg>lacZ, luc**); $+/Y; vg-Gal4/UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-lacZ/+$ (**vg>lacZ, RNAi BNIP3**); $+/Y; vg-Gal4, UAS-debcl/UAS-luciferase; UAS-debcl/+$ (**vg>debcl, luc**); $+/Y; vg-Gal4, UAS-debcl/UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-debcl/+$ (**vg>debcl, RNAi BNIP3**). In C. all flies also have a *UAS-Mito-QC* sequence on chromosome III.

Discussion

PINK1 favors *rbf1*-induced apoptosis and mitophagy.

Unexpectedly, in this article, we demonstrated that PINK1 can be an apoptosis-promoting factor. Indeed, since PINK1 and Parkin are major players in mitochondrial quality control, most of the literature presents PINK1 as a pro-survival factor. Our results show that loss of PINK1 function alone is not sufficient to induce a wing phenotype or modulate developmental apoptosis in the wing imaginal disc. Surprisingly, however, the loss of PINK1 inhibits apoptosis induced by *rbf1* or *debcl*. These results suggest that PINK1 is required for proper apoptosis induced by *rbf1* and *debcl*. Thus, if PINK1 deficiency affects both *rbf1*- and *debcl*-induced apoptosis, PINK1 would act downstream or at the level of Debcl protein during the *rbf1*-induced apoptosis cascade [11].

On the other hand, mitophagy is most often considered as a means for the cell to delay the onset of apoptosis in cells with damaged mitochondria [1]. This is notably the case for PINK1/Parkin-dependent mitophagy, which maintains mitochondrial homeostasis in neurons [18]. Our data, obtained using mitophagy markers, show that an increase in mitophagy accompanies *rbf1*- or *debcl*-induced apoptosis. Data also reveals that PINK1 loss alone increases mitophagy level. *debcl*-induced mitophagy, is increased in PINK1 loss of function context. Considering the decrease of apoptosis caused by PINK1 loss, we could not exclude the possibility that mitophagy partially compensates for apoptosis mediated by *debcl*. No increase was observed in *rbf1*-induced mitophagy in PINK1 null background. This observation leads to two conclusions. First, *rbf1*-induced mitophagy might partially require PINK1. Second, mitophagy cannot compensate for apoptosis, suggesting two distinct functions for PINK1: a pro-apoptotic function and a pro-mitophagy function in *rbf1*-induced apoptosis. Moreover, as *debcl*-induced mitophagy is independent of PINK1, *PINK1*-induced mitophagy observed when overexpressing *rbf1* may be initiated independently or upstream of Debcl by another mitophagy regulator.

Can PINK1 modulate apoptosis independently of mitophagy?

Since PINK1's involvement in apoptosis appears to be independent of its mitophagic activity, it probably has a Parkin-independent role in apoptosis. Indeed, Parkin-independent PINK1 activities have already been described in mammals [34,35]. While some of these activities are associated with the role of PINK1 in mitophagy [36], other studies highlight mitophagy-independent PINK1 functions. Indeed, in pancreatic cancer cells, a PINK1-dependent but Parkin-independent mitophagy process mediates the reprogramming of cells from glycolytic- to oxidative phosphorylation-dependent metabolism [36].

Independently of mitophagy, PINK1 has been shown to modulate ER stress response, mitochondria dynamics, and mitochondrial apoptosis.

Firstly, several studies have reported links between PINK1 and the endoplasmic reticulum, including in *Drosophila*. Notably, PINK1 modulates mitochondria-ER contact sites [37]. In mammals, these contact sites are regions where mitochondrial fragmentation occurs during apoptosis. In PINK1 loss of function mutant, ER-mitochondrial contacts are enhanced, and calcium influx to the mitochondria induces cell death. [38]- In *Drosophila*, PINK1 mutants exhibit sustained Perk activity and ER stress, impairing mitochondrial function [39]. Insofar as these activities are most often associated with a protective role for PINK1, they cannot easily account for PINK1's role in our model.

Secondly, PINK1 can modulate mitochondrial fission. PINK1 was initially identified as an inducer of mitochondrial fission [20]. More recently, DRP1 was identified as a target for PINK1 in several human tissues and in *Drosophila* [29,40]. Drp1 phosphorylation occurs at S616, a phosphorylation site associated with increased mitochondrial fission, resulting in a more fragmented mitochondrial network. These events occur independently of mitophagy. Knowing the essential role of DRP1 in the apoptotic process in mammals and *Drosophila*, it will be interesting to test PINK1's ability to phosphorylate Drp1 in our context.

Finally, PINK1 kinase may regulate the activity or stability of apoptosis regulators by phosphorylation. In mammals, for example, PINK1 has been shown to phosphorylate the Bcl-2 family anti-apoptotic protein, Bcl-xL. This phosphorylation prevents the inactivation by cleavage of Bcl-xL [41]. Besides, PINK1 can activate pro-apoptotic pathways. In human cells, PINK1 overexpression leads to p53 pathway activation and apoptosis increase [42]. In *Drosophila*, apoptotic events triggered by the pro-apoptotic Htr2A/Omi involve PINK1 independently of Parkin [43]. We, therefore, hypothesized that PINK1 could stabilize Debcl. Our results do not support this hypothesis, but it cannot be ruled out that PINK1 may activate Sayonara or Debcl or inhibit Buffy.

Unlike PINK1, BNIP3 regulates basal mitophagy.

In contrast to PINK1, our results show that BNIP3 protects against *rbf1*-induced apoptosis. Most studies on the role of BNIP3 in apoptosis have been carried out in mammals. In *Drosophila*, the BNIP3 homolog has been little studied and is generally presented as a gene required for cell survival. In the *Drosophila* brain, human BNIP3 induces mitophagy, eliminating dysfunctional mitochondria, thus improving muscle and intestinal homeostasis and increasing longevity [25]. In germ cells, it also has a pro-survival role, enabling the elimination of defective mitochondria that have accumulated mutations in their DNA [26]. This process involves BNIP3-dependent but PINK1/Parkin-independent mitophagy [27,44]. Results

in mammals also point a role for BNIP3 in mitophagy. However, some studies present it as a cell death-promoting factor due to its ability to bind anti-apoptotic Bcl-2 family members [45].

Our results also indicate that mitophagy induced by *rbf1* overexpression involves PINK1 but is independent of BNIP3. Furthermore, reduced *BNIP3* levels suppress some basal mitophagy observed in control cells. Thus, the decrease in basal mitophagy, induced by BNIP3 knockdown, could sensitize cells to *rbf1*-induced apoptosis.

We found different results for PINK1, which does not appear involved in basal mitophagy. This result agrees with *in vivo* studies, indicating that PINK1 and PARKIN are not critical for basal mitophagy in various tissues, including the brain [46,47].

Curiously, in contrast to the results obtained for Rbf1, we did not observe any increase in *debcl*-induced apoptosis in the context of the BNIP3 knockdown. This result is even more surprising given that BNIP3 knockdown significantly enhances *debcl*-induced wing phenotypes. These results point to a genetic interaction between Debcl and BNIP3 and suggest another protective function for BNIP3. Indeed, Debcl-induced tissue loss, observed in the adult wing, results from a combination of several cellular processes, on the one hand, apoptosis and, on the other, cell proliferation induced to compensate for apoptotic cell death [11]. This apoptosis-induced proliferation depends on the JNK pathway, and it has been shown in mammals that phosphorylation of BNIP3 by JNK1/2 can promote mitophagy by increasing its stability [24]. A positive role of BNIP3 on compensatory proliferation remaining to be identified could explain the effect of BNIP3 depletion on *debcl*-induced wing phenotype.

Since the BNIP3 specifically decreases *rbf1*-induced apoptosis but does not modulate *debcl*-induced apoptosis, BNIP3 could act upstream of Debcl. Even without a BH3 sequence [9], the anti-apoptotic effect of BNIP3 suggests a possible interaction with Bcl2 family members. For example, an interaction of BNIP3 with Sayonara (the unique BH3-only Bcl-2 family member in *Drosophila*) could block Sayonara's binding to Buffy/Debcl. Inhibiting this interaction would prevent Debcl activation and decrease apoptosis, as observed in our model.

In conclusion, the results presented here show that in *Drosophila*, BNIP3 and PINK1 can have opposite effects on mitochondrial apoptosis and modulate the associated mitophagy differently. This observation suggests that BNIP3 and PINK1 interact with different players in the apoptotic cascade that have yet to be identified.

Materials and Methods

Fly stocks and strains.

Crossed flies were raised at 25°C on a standard medium (yeast, corn flour, and moldex). The UAS-rbf1 and vg-Gal4 strains were generous gifts from Joel Silber (Institut Jacques Monod, Université de Paris, France). UAS-debcl-HA flies were generously provided by Helena Richardson (Research Division, Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Australia) [7]. UAS-mito-Keima was generously gifted by Dr. Wim Vandenberghe and Prof. Patrik Verstreken [32], which used the original Keima material from Atsushi Miyawaki (RIKEN Center for Brain Sciences, Japan, [33]). UAS-Mito-QC was generously gifted by Dr. Whitworth [46], who used the original Mito-QC sequence from I. Ganley (University of Dundee, Dundee, Scotland, UK) obtained from the Medical Research Council Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit Reagents and Services facility (College of Life Sciences, University of Dundee, Scotland). The construction is pBabe.hygromCherry-GFP FIS 101–152(end) [DU40799]; [48]). The following strains were obtained from the Bloomington (IN, USA) Stock Center: PINK1[5] (51649), UAS-LacZ (3956), UAS-Luciferase (35788), UAS-RNAi BNIP3(42494). We used a W1118 fly stock as the reference strain. To compare isogenic strains, PINK1[5] mutant was crossed 10 times with W1118 strain before using it. UAS-Luciferase (35788) was used as RNAi control as recommended by the RNAi strain producer (DRSC/TRiP).

Immunostaining

Immunostaining imaging was made with discs from L3 stage larvae dissected in PBS 1X pH7.5. Returned larvae were fixed in PBS with 4% formaldehyde methanol-free (Thermo Scientific 28908) for 20 min, then washed thrice in PBS. Permeabilization and saturation were made in PBS, 0.3% Tween, and 2% BSA for 2 hours. First antibody incubation was made using the same solution and 1/100e Dcp-1 antibody (Cell Signaling 95785S) overnight. After three washes, a secondary antibody (Alexa Fluor® anti-rabbit 568nm (Thermo Fisher, A11011) was added at a concentration of 1/400e diluted in saturation solution for 2 hours. Finally, after three washes, Hoechst (33342, Biorad) was added with a concentration of 1/1000e (1µg/mL). Discs were mounted in Prolong Diamond (Invitrogen P36961). TUNEL staining was made according to the manufacturer's instructions of the apoptosis detection kit *in situ* red (S7165, Merck-Millipore).

Imaging

Images were taken using Leica Sp8 confocal. For Dcp-1 or TUNEL staining, a magnification of 10 was used with a numeric zoom of 2. For mt-Keima and Mito-QC staining, a zoom of 4 was used with a magnification of 63. Quantifications were made using ImageJ. For TUNEL staining, the number of stained

cells (spot) was counted on each disc. The CASQUITO program was used to quantify DcpCP-1 staining [31]. It allows the identification of the pixels corresponding precisely to the staining. The area of those pixels was measured, divided by the wing pouch area, and multiplied by 100 to get a percentage.

For mt-Keima mitophagy staining quantification, images were pre-treated using ImageJ by masking and decreasing noises. Then, the automatic threshold was applied to isolate specific signals of mitochondria (emission at 620 nm wavelength following a 405 nm excitation wavelength) and mitochondria + mitophagy (emission at 620nm wavelength following a 550 nm excitation wavelength), and a “max intensity” mitophagy staining to eliminate the mitochondria signal. The area of remaining staining was quantified and related to the selected area (referred to as % of mitophagy surface in corresponding figure).

For Mito-QC staining quantification, images were processed as described above. Mask and threshold were made for each slice, and the mitochondrial mask (488 nm excitation; emission between 498 and 781nm) was subtracted from the corresponding mitochondria + mitophagy slice (586 nm excitation; emission between 596-719 nm). A “max intensity” projection of all slices of mitophagy was then performed. Spots were isolated using the “analyze particles” function and classified by area in μm^2 . Spots between 0.08 and $1\mu\text{m}^2$ were numbered and considered as specific mitophagy spots.

Wing count

To test the involvement of candidate genes in *rbf1*-induced apoptosis, the severity of the notched wing phenotype induced by *UAS-rbf1* overexpression from the *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. For each candidate gene, we verified that altering its expression level alone (overexpression or mutation) did not induce any wing phenotype. *vg>rbf1 Drosophila* males were crossed with females bearing a loss-of-function mutation for the different genes, expressing Trip RNAi or allowing their overexpression. The progenies of all crosses were classified according to the number of notches on the wing margin. Wilcoxon tests were performed as described previously [49]. We considered the difference to be significant when $\alpha < 10^{-3}$ for a Wilcoxon test.

To test the implication of protein in *Debcl*-induced apoptosis, the severity of wing tissue loss induced by *UAS-debcl* overexpression led by the *vg-Gal4* driver was assayed in different genetic backgrounds. *vg>debcl Drosophila* males were crossed with wild-type females or females with a loss-of-function mutation or expressing trip RNAi. The severity of loss of bristles or tissue of the posterior and anterior wing margins was classified according to the length of the loss. We considered the difference significant when $\alpha < 10^{-3}$ for a Wilcoxon test.

Western Blot

Proteins were obtained from 30 wing discs lysed in a lysis buffer: (50nM Tris-HCl pH8; 150nM NaCl, 1% NP40 and anti-protease + anti phosphatase INVITROGEN) and frozen at -20°C.

Samples were loaded on Mini-PROTEAN TGX Stain Free precast polyacrylamide 4–20% gels (BIORAD, Hercules, CA, USA) in 1× Tris Glycine-SDS buffer. Proteins were transferred onto Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Darmstadt, Germany) in 1× Tris Glycine with 20% ethanol. Stain-free technology enables the visualization of total proteins absorbed onto the membrane without dye. For immunoblotting, antibodies were diluted in TBS-Tween 0.1%—the primary antibodies used for immunoblotting. HRP-coupled secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch and Diagnostics. Chemiluminescent detection was performed with Clarity Western ECL substrate (BIORAD), and the signal was captured by Chemidoc XRS (BIORAD). Quantification was performed using ImageLab software (BIORAD). Primary antibodies used: anti-HA (Cell Signaling, 3724S), Anti F1F0 (Abcam, ab14730), Anti Actine (Sigma, A2066).

RNA extract

The imaginal discs are recovered by dissection and placed in RINGER until the dissection is completed. The discs are pelted by centrifugation at the end of the dissection, and the RINGER is removed. 100 µL of TRIzol (15596018, Invitrogen) are added per tube. The sample is crushed with a mechanical pestle and then frozen at -20°. The next day, the samples are thawed, and the TRIzol is up to 500µL. After centrifugation at 12,000 g at 4°, the upper phase is recovered and then incubated for 5 min at room temperature. Then 100 µL ice-cold chloroform is added, and manual stirring is carried out for 1 min, followed by incubation at room temperature for 3 min. A second centrifugation at 12,000g at 4°C is carried out to recover the aqueous phase. 1 volume of ice-cold Isopropanol is added, followed by manual stirring. The tubes are stored at -20°C overnight. The next day, centrifugation for 1h30 is carried out at 21,000g at 4°C, and then the supernatant is eliminated. Then, three rinses with ice-cold 70% ethanol were carried out, each time centrifuging at 7,500 g to recover the pellet. After the last rinse, the pellet is air dried before resuspending the RNA in 25µL of sterile water. The RNA tubes are stored at -80° before use.

RNA Retrotranscription (RT)

RT experiment follows the manufacturer's instructions for cDNA high-capacity reverse transcription (4368814, Applied Biosystems™).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

qPCR experiments were made following manufacturer instructions of iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (1725125, BioRad).

Gene	Primer	Amorce anti sens
<i>Pink1</i>	GACAGGACCAATTGCCGC	GGATCTCCGGACTGTTGGG
<i>Bnip3</i>	TGATAGCCCCAAGAGTCCAC	GCATCCCAGACTTGAATCCTC
<i>Uba2</i>	ATTCACTGCATTGTCTGGGC	CCTTGGCCTCCTTTTCCTCT

Statistical analysis

Statistical analyses and graphs were made using R studio and ggplot2. Statistical tests were non-parametric due to the small number of samples (less than 30 wing discs). The tests used were Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test.

Acknowledgments: We thank Florine Adolphe, Bernard Mignotte and Vincent Rincheval for their critical reading of the manuscript. We also wish to thank Florine Adolphe for assistance in the laboratory. We thank Dr. Wim Vandenberghe and Prof. Patrik Verstreken for generous gift of mito-keima fly stock and Dr. Whitworth for generous gift Mito-QC fly stock. Image acquisition, image analysis, and cytometry experiments were performed at the CYMAGES imaging facility, part of UVSQ-Paris Saclay University. The authors also greatly acknowledge Anne-Laure Raveu and Aude Malfait-Jobart from the CYMAGES facility. M.F. received support from the Société de Biologie Cellulaire Française, the Société Française de Génétique and the "Life Sciences and Health" graduate school of the Université Paris-saclay.

References

1. Wanderoy, S.; Hees, J.T.; Klesse, R.; Edlich, F.; Harbauer, A.B. Kill One or Kill the Many: Interplay between Mitophagy and Apoptosis. *Biol Chem* **2020**, doi:10.1515/hsz-2020-0231.
2. Bruckheimer, E.M.; Cho, S.H.; Sarkiss, M.; Herrmann, J.; McDonnell, T.J. The Bcl-2 Gene Family and Apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **1998**, *62*, 75–105, doi:10.1007/BFb0102306.
3. Rolland, S.; Conradt, B. New Role of the BCL2 Family of Proteins in the Regulation of Mitochondrial Dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **2010**, *22*, 852–858, doi:10.1016/j.ceb.2010.07.014.
4. Maes, M.; Grosser, J.; Fehrman, R.; Schlamp, C.; Nickells, R. Completion of BAX Recruitment Correlates with Mitochondrial Fission during Apoptosis. *Scientific Reports* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-53049-w.
5. Sheridan, C.; Martin, S.J. Mitochondrial Fission/Fusion Dynamics and Apoptosis. *Mitochondrion* **2010**, *10*, 640–648, doi:10.1016/j.mito.2010.08.005.

6. Jenner, A.; Peña-Blanco, A.; Salvador-Gallego, R.; Ugarte-Urbe, B.; Zollo, C.; Ganief, T.; Bierlmeier, J.; Mund, M.; Lee, J.E.; Ries, J.; et al. DRP1 Interacts Directly with BAX to Induce Its Activation and Apoptosis. *The EMBO Journal* **2022**, *41*, e108587, doi:10.15252/embj.2021108587.
7. Colussi, P.; Quinn, L.; Huang, D.; Coombe, M.; Read, S.; Richardson, H.; Kumar, S. Debcl, a Proapoptotic Bcl-2 Homologue, Is a Component of the Drosophila Melanogaster Cell Death Machinery. *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 703–714, doi:10.1083/jcb.148.4.703.
8. Igaki, T.; Kanuka, H.; Inohara, N.; Sawamoto, K.; Núñez, G.; Okano, H.; Miura, M. Drob-1, a Drosophila Member of the Bcl-2/CED-9 Family That Promotes Cell Death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 662–667.
9. Ikegawa, Y.; Combet, C.; Groussin, M.; Navratil, V.; Safar-Remali, S.; Shiota, T.; Aouacheria, A.; Yoo, S.K. Evidence for Existence of an Apoptosis-Inducing BH3-Only Protein, Sayonara, in Drosophila. *EMBO J* **2023**, *42*, e110454, doi:10.15252/embj.2021110454.
10. Quinn, L.; Coombe, M.; Mills, K.; Daish, T.; Colussi, P.; Kumar, S.; Richardson, H. Buffy, a Drosophila Bcl-2 Protein, Has Anti-Apoptotic and Cell Cycle Inhibitory Functions. *EMBO J.* **2003**, *22*, 3568–3579, doi:10.1093/emboj/cdg355.
11. Clavier, A.; Ruby, V.; Rincheval-Arnold, A.; Mignotte, B.; Guénel, I. The Drosophila Retinoblastoma Protein, Rbf1, Induces a Debcl- and Drp1-Dependent Mitochondrial Apoptosis. *J. Cell. Sci.* **2015**, *128*, 3239–3249, doi:10.1242/jcs.169896.
12. Clavier, A.; Baillet, A.; Rincheval-Arnold, A.; Coléno-Costes, A.; Lasbleiz, C.; Mignotte, B.; Guénel, I. The Pro-Apoptotic Activity of Drosophila Rbf1 Involves dE2F2-Dependent Downregulation of Diap1 and Buffy mRNA. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1405, doi:10.1038/cddis.2014.372.
13. Boland, M.; Chourasia, A.; Macleod, K. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front Oncol* **2013**, *3*, 292, doi:10.3389/fonc.2013.00292.
14. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosomal Membranes after Processing. *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 5720–5728, doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
15. Zimmermann, M.; Reichert, A.S. How to Get Rid of Mitochondria: Crosstalk and Regulation of Multiple Mitophagy Pathways. *Biological Chemistry* **2018**, *399*, 29–45, doi:10.1515/hsz-2017-0206.
16. Field, J.T.; Gordon, J.W. BNIP3 and Nix: Atypical Regulators of Cell Fate. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2022**, *1869*, 119325, doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119325.
17. Zhang, J.; Ney, P.A. Role of BNIP3 and NIX in Cell Death, Autophagy, and Mitophagy. *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 939–946, doi:10.1038/cdd.2009.16.
18. Clark, I.E.; Dodson, M.W.; Jiang, C.; Cao, J.H.; Huh, J.R.; Seol, J.H.; Yoo, S.J.; Hay, B.A.; Guo, M. Drosophila Pink1 Is Required for Mitochondrial Function and Interacts Genetically with Parkin. *Nature* **2006**, *441*, 1162–1166, doi:10.1038/nature04779.
19. Park, J.; Lee, S.B.; Lee, S.; Kim, Y.; Song, S.; Kim, S.; Bae, E.; Kim, J.; Shong, M.; Kim, J.-M.; et al. Mitochondrial Dysfunction in Drosophila PINK1 Mutants Is Complemented by Parkin. *Nature* **2006**, *441*, 1157–1161, doi:10.1038/nature04788.
20. Yang, Y.; Ouyang, Y.; Yang, L.; Beal, M.F.; McQuibban, A.; Vogel, H.; Lu, B. Pink1 Regulates Mitochondrial Dynamics through Interaction with the Fission/Fusion Machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 7070–7075, doi:10.1073/pnas.0711845105.
21. Kim, Y.; Park, J.; Kim, S.; Song, S.; Kwon, S.-K.; Lee, S.-H.; Kitada, T.; Kim, J.-M.; Chung, J. PINK1 Controls Mitochondrial Localization of Parkin through Direct Phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *377*, 975–980, doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.104.
22. Narendra, D.P.; Jin, S.M.; Tanaka, A.; Suen, D.-F.; Gautier, C.A.; Shen, J.; Cookson, M.R.; Youle, R.J. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLOS Biology* **2010**, *8*, e1000298, doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
23. Vives-Bauza, C.; Zhou, C.; Huang, Y.; Cui, M.; de Vries, R.L.A.; Kim, J.; May, J.; Tocilescu, M.A.; Liu, W.; Ko, H.S.; et al. PINK1-Dependent Recruitment of Parkin to Mitochondria in Mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 378–383, doi:10.1073/pnas.0911187107.

24. Ray, R.; Chen, G.; Vande Velde, C.; Cizeau, J.; Park, J.H.; Reed, J.C.; Gietz, R.D.; Greenberg, A.H. BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 1439–1448, doi:10.1074/jbc.275.2.1439.
25. Schmid, E.T.; Pyo, J.-H.; Walker, D.W. Neuronal Induction of BNIP3-Mediated Mitophagy Slows Systemic Aging in *Drosophila*. *Nat Aging* **2022**, *2*, 494–507, doi:10.1038/s43587-022-00214-y.
26. Lőw, P.; Varga, Á.; Piracs, K.; Nagy, P.; Szatmári, Z.; Sass, M.; Juhász, G. Impaired Proteasomal Degradation Enhances Autophagy via Hypoxia Signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biology* **2013**, *14*, 29, doi:10.1186/1471-2121-14-29.
27. Lieber, T.; Jeedigunta, S.P.; Palozzi, J.M.; Lehmann, R.; Hurd, T.R. Mitochondrial Fragmentation Drives Selective Removal of Deleterious mtDNA in the Germline. *Nature* **2019**, *570*, 380–384, doi:10.1038/s41586-019-1213-4.
28. Sheel, A.; Shao, R.; Brown, C.; Johnson, J.; Hamilton, A.; Sun, D.; Oppenheimer, J.; Smith, W.; Visconti, P.E.; Markstein, M.; et al. Acheron/Larp6 Is a Survival Protein That Protects Skeletal Muscle From Programmed Cell Death During Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*.
29. Han, H.; Tan, J.; Wang, R.; Wan, H.; He, Y.; Yan, X.; Guo, J.; Gao, Q.; Li, J.; Shang, S.; et al. PINK1 Phosphorylates Drp1S616 to Regulate Mitophagy-Independent Mitochondrial Dynamics. *EMBO Rep* **2020**, e48686, doi:10.15252/embr.201948686.
30. Milet, C.; Rincheval-Arnold, A.; Mignotte, B.; Guénel, I. The *Drosophila* Retinoblastoma Protein Induces Apoptosis in Proliferating but Not in Post-Mitotic Cells. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 97–103, doi:10.4161/cc.9.1.10251.
31. de Noiron, J.; Hoareau, M.; Colin, J.; Guénel, I. Apoptosis Quantification in Tissue: Development of a Semiautomatic Protocol and Assessment of Critical Steps of Image Processing. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1523, doi:10.3390/biom11101523.
32. Cornelissen, T.; Vilain, S.; Vints, K.; Gounko, N.; Verstreken, P.; Vandenberghe, W. Deficiency of Parkin and PINK1 Impairs Age-Dependent Mitophagy in *Drosophila*. *eLife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.35878.
33. Katayama, H.; Kogure, T.; Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Miyawaki, A. A Sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery. *Chemistry & Biology* **2011**, *18*, 1042–1052, doi:10.1016/j.chembiol.2011.05.013.
34. Han, R.; Liu, Y.; Li, S.; Li, X.-J.; Yang, W. PINK1-PRKN Mediated Mitophagy: Differences between in Vitro and in Vivo Models. *Autophagy* **2023**, *19*, 1396–1405, doi:10.1080/15548627.2022.2139080.
35. Yang, W.; Guo, X.; Tu, Z.; Chen, X.; Han, R.; Liu, Y.; Yan, S.; Wang, Q.; Wang, Z.; Zhao, X.; et al. PINK1 Kinase Dysfunction Triggers Neurodegeneration in the Primate Brain without Impacting Mitochondrial Homeostasis. *Protein Cell* **2022**, *13*, 26–46, doi:10.1007/s13238-021-00888-x.
36. Miyazaki, N.; Shiratori, R.; Oshima, T.; Zhang, Z.; Valencia, R.; Kranrod, J.; Fang, L.; Seubert, J.M.; Ito, K.; Aoki, S. PINK1-Dependent and Parkin-Independent Mitophagy Is Involved in Reprogramming of Glycometabolism in Pancreatic Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2022**, *625*, 167–173, doi:10.1016/j.bbrc.2022.08.004.
37. Lee, K.-S.; Huh, Lee; Wu; Kim; Kang; Lu Altered ER–Mitochondria Contact Impacts Mitochondria Calcium Homeostasis and Contributes to Neurodegeneration in Vivo in Disease Models. *PNAS* **2018**, doi:10.1073/pnas.1721136115.
38. Wang, R.; Fortier, T.M.; Chai, F.; Miao, G.; Shen, J.L.; Restrepo, L.J.; DiGiacomo, J.J.; Velentzas, P.D.; Baehrecke, E.H. PINK1, Keap1, and Rtnl1 Regulate Selective Clearance of Endoplasmic Reticulum during Development. *Cell* **2023**, *186*, 4172–4188.e18, doi:10.1016/j.cell.2023.08.008.
39. Popovic, R.; Mukherjee, A.; Leal, N.S.; Morris, L.; Yu, Y.; Loh, S.H.Y.; Miguel Martins, L. Blocking dPerk in the Intestine Suppresses Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of Parkinson’s Disease. *Cell Death Dis* **2023**, *14*, 1–9, doi:10.1038/s41419-023-05729-9.
40. Gao, Q.; Tian, R.; Han, H.; Slone, J.; Wang, C.; Ke, X.; Zhang, T.; Li, X.; He, Y.; Liao, P.; et al. PINK1-Mediated Drp1S616 Phosphorylation Modulates Synaptic Development and Plasticity via

- Promoting Mitochondrial Fission. *Signal Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 103, doi:10.1038/s41392-022-00933-z.
41. Arena, G.; Gelmetti, V.; Torosantucci, L.; Vignone, D.; Lamorte, G.; De Rosa, P.; Cilia, E.; Jonas, E.A.; Valente, E.M. PINK1 Protects against Cell Death Induced by Mitochondrial Depolarization, by Phosphorylating Bcl-xL and Impairing Its pro-Apoptotic Cleavage. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 920–930, doi:10.1038/cdd.2013.19.
 42. Yin, K.; Lee, J.; Liu, Z.; Kim, H.; Martin, D.R.; Wu, D.; Liu, M.; Xue, X. Mitophagy Protein PINK1 Suppresses Colon Tumor Growth by Metabolic Reprogramming via P53 Activation and Reducing Acetyl-CoA Production. *Cell Death Differ* **2021**, *28*, 2421–2435, doi:10.1038/s41418-021-00760-9.
 43. Tain, L.; Chowdhury, C.; Tao; Plun-Favreau, P.-F.; N; Lm, M.; J, D.; Aj, W.; N, T. Drosophila HtrA2 Is Dispensable for Apoptosis but Acts Downstream of PINK1 Independently from Parkin Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19282869/> (accessed on 2 December 2020).
 44. Palozzi, J.M.; Hurd, T.R. The Role of Programmed Mitophagy in Germline Mitochondrial DNA Quality Control. *Autophagy* **2023**, *19*, 2817–2818, doi:10.1080/15548627.2023.2182595.
 45. Zhang, L.; Li, L.; Leavesley, H.W.; Zhang, X.; Borowitz, J.L.; Isom, G.E. Cyanide-Induced Apoptosis of Dopaminergic Cells Is Promoted by BNIP3 and Bax Modulation of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Ca²⁺ Levels. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, *332*, 97–105, doi:10.1124/jpet.109.159103.
 46. Lee, J.J.; Sanchez-Martinez, A.; Zarate, A.M.; Benincá, C.; Mayor, U.; Clague, M.J.; Whitworth, A.J. Basal Mitophagy Is Widespread in Drosophila but Minimally Affected by Loss of Pink1 or Parkin. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1613–1622, doi:10.1083/jcb.201801044.
 47. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Montava-Garriga, L.; Ball, G.; Singh, F.; Barini, E.; Muqit, M.M.K.; Brooks, S.P.; Ganley, I.G. Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 439-449.e5, doi:10.1016/j.cmet.2017.12.008.
 48. Allen, G.F.G.; Toth, R.; James, J.; Ganley, I.G. Loss of Iron Triggers PINK1/Parkin-Independent Mitophagy. *EMBO Rep* **2013**, *14*, 1127–1135, doi:10.1038/embor.2013.168.
 49. Brun, S.; Rincheval, V.; Gaumer, S.; Mignotte, B.; Guenal, I. Reaper and Bax Initiate Two Different Apoptotic Pathways Affecting Mitochondria and Antagonized by Bcl-2 in Drosophila. *Oncogene* **2002**, *21*, 6458–6470, doi:10.1038/sj.onc.1205839.

Supplementary data

Melanie FAGES et al. "PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in Drosophila."

Supplementary Table 1: Interaction between PINK1 and Rbf1 induced apoptosis

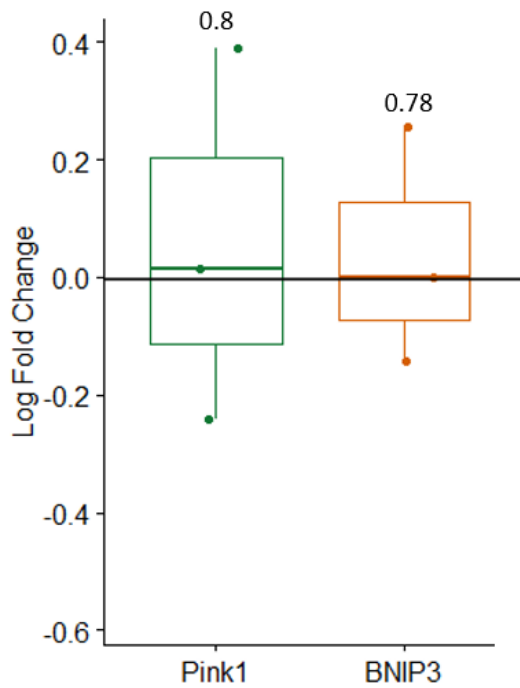
N° strain	Mutation/ RNAi	Genotype	phenotypes distribution				WS	P value	Notch phenotype
			WT	Weak	Medium	Strong			
51649*	PINK1 ^{B9}	Males : <i>W118; vg-Gal4; UAS-rbf1</i>	0	0	11	119	-5.66	2.53E-08	rescue
		Males : <i>PINK1^{B9}; vg-Gal4; UAS-rbf1</i>	0	1	36	55			
31170**	UAS-PINK1 ^{RNAi}	Males : <i>vg-Gal4 , UAS-Luciferase; UAS-rbf1</i>	77	58	72	13	-12.24	0.0E+0	rescue
		Males : <i>vg-Gal4; UAS-rbf1, UAS-PINK1^{RNAi}</i>	194	11	4	1			

* Experiment done 2 times ** Experiment done 1 time. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test.

Supplementary data

Melanie FAGES et al. "PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*."

Rbf1 does not regulate PINK1 and BNIP3 expression

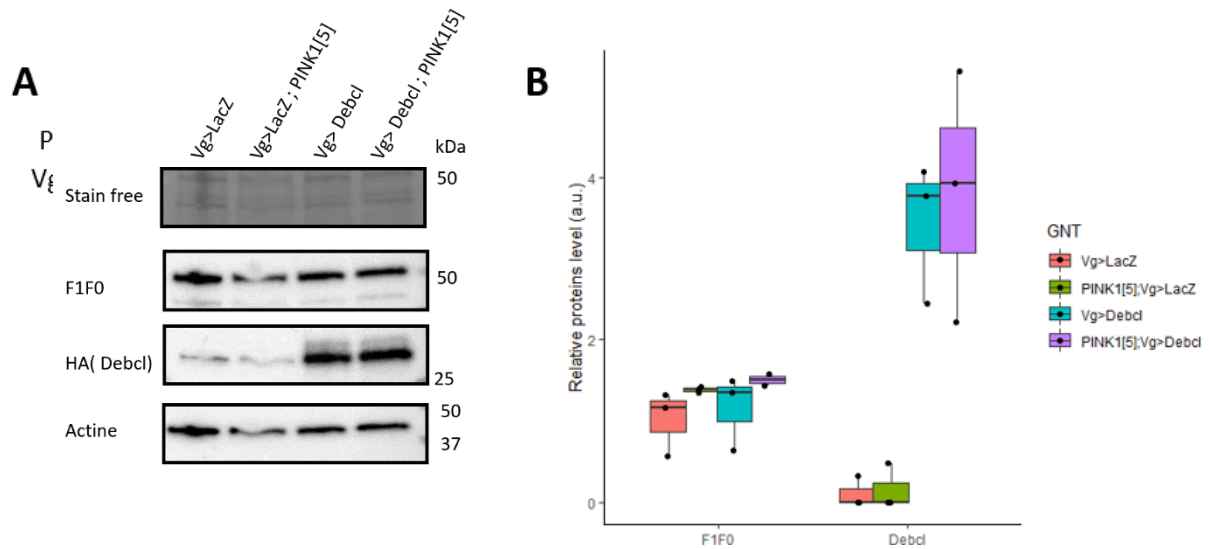


Supplementary figure 1: relative mRNA level of genes encoding PINK1 and BNIP3 protein in wing imaginal disc cells overexpressing *rbf1*. The log of the ratios was obtained from the relative mRNA levels of each gene after normalization on the housekeeping gene *uba1* and reported to the control over expressing *lacZ*. Statistical differences were determined by comparing values from 3 independent experiments using the Student test.

Supplementary data

Melanie FAGES et al. "PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*."

PINK1 does not increase Debcl stability

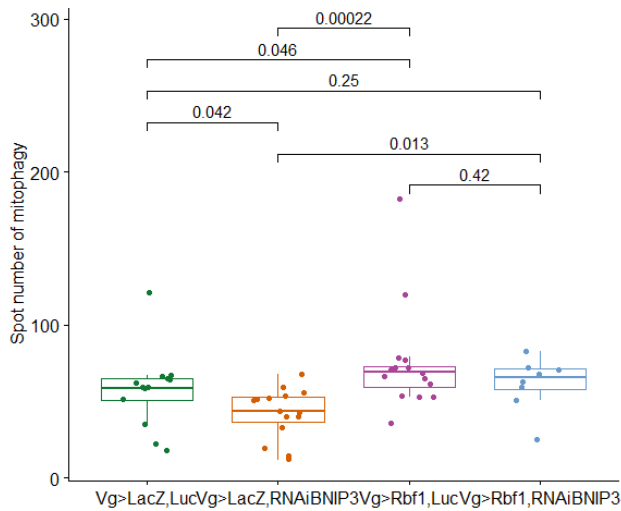


Supplementary figure 2: PINK1 mutation does not affect Debcl protein level. **A.** Western Blot revealed an antibody directed against Actin (control), F1F0 (mitochondrial marker), and HA to detect HA-Debcl tagged protein. Experiments are done in wild type or PINK1[5] hemizygous background in Debcl overexpression (*Vg>Debcl*) context or not. On the right, molecular weights are indicated. The experiment was repeated three times. **B.** Quantification of protein level from the Western Blot presented in A and two other experiments. Each point corresponds to one experiment normalized on the Actin level. The name of the quantified protein level is indicated in the abscissa. The genotypes used are: **Vg>LacZ** (*W118/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+*); **PINK1[5]; Vg>LacZ** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+*); **Vg>Debcl** (*W118/Y; vg-Gal4, UAS-debcl /+; UAS-debcl/+*); **PINK1[5]; Vg>Debcl** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4, UAS-debcl /+; UAS-debcl/+*).

Supplementary data

Melanie FAGES et al. "PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*."

BNIP3 does not modulate Rbf1-induced mitophagy.

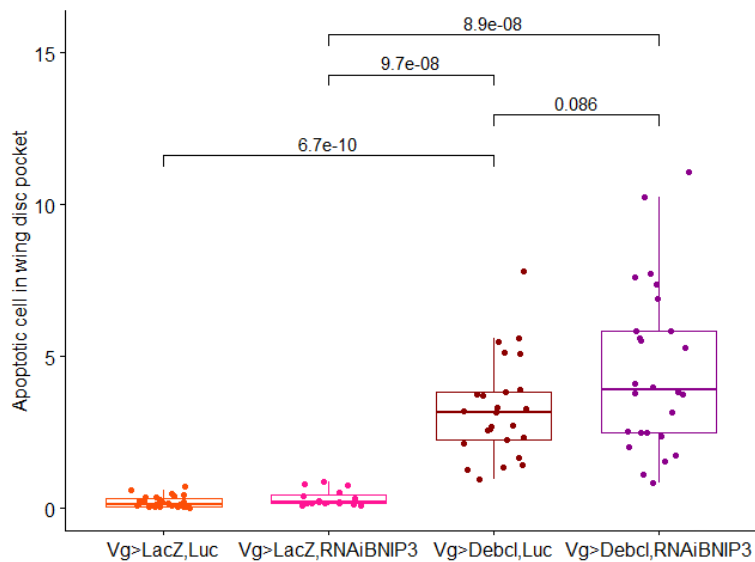


Supplementary figure 3: BNIP3 depletion does not affect *rbf1*-induced mitophagy. Mitophagy was quantified with Mito-QC fluorescence (see material and methods). The histograms represent one experiment. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. It quantifies the mitophagy using Mito-QC and measures the area of identified mitophagy compared to the area of the selected zone. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. The genotypes used are : **Vg>LacZ, Luc** (*W118/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-lacZ/+*); **Vg>LacZ, RNAi BNIP3** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4/UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-lacZ/+*) ; **Vg>Rbf1, Luc** (*W118/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-rbf1/+*); **Vg>Rbf1, RNAi BINP3** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4/UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-rbf1/+*). All flies also have a *UAS-Mito-QC* sequence on chromosome III.

Supplementary data

Melanie FAGES et al. "PINK1 and BNIP3 mitophagy inducers have an antagonistic effect on Rbf1-induced apoptosis in *Drosophila*."

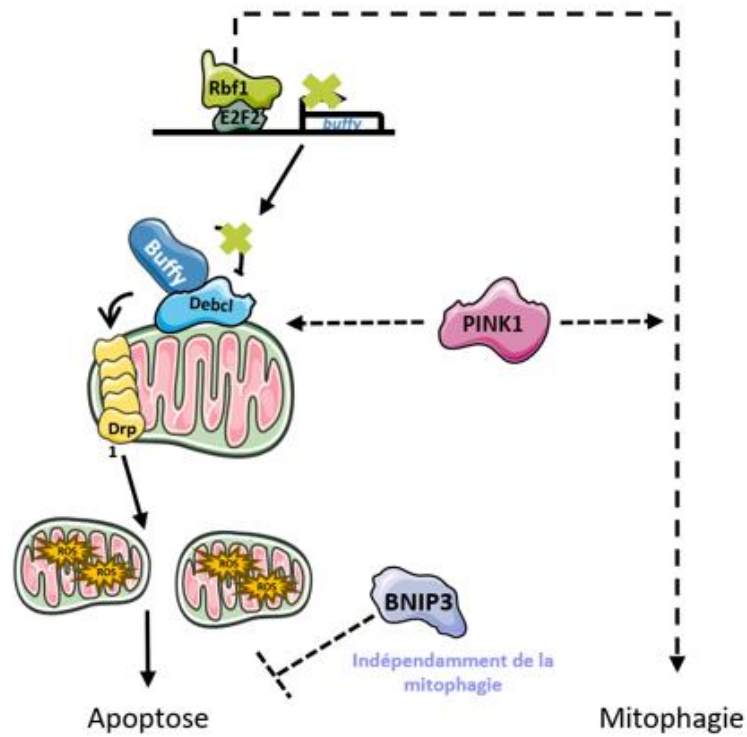
BNIP3 does not modulate *debcl*-induced apoptosis.



Supplementary figure 4: BNIP3 depletion does not affect *debcl*-induced apoptosis. It quantifies the apoptosis using TUNEL staining and measures apoptotic levels compared to the selected zone. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis and the post hoc Wilcoxon test. The genotypes used are: **Vg>LacZ, Luc** (*W118/Y; vg-Gal4/UAS-luciferase; UAS-lacZ/+*); **Vg>LacZ,RNAi BNIP3** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4/UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-lacZ/+*); **Vg>Debcl, Luc** (*W118/Y; vg-Gal4,UAS-debcl /UAS-luciferase; UAS-debcl/+*); **Vg>Debcl, RNAi BNIP3** (*PINK1⁵/Y; vg-Gal4, UAS-debcl /UAS-BNIP3^{RNAi}; UAS-debcl/+*).

RESULTATS

PINK1 et BNIP3 dans l'apoptose induite par la surexpression de *rbf1*



PINK1 et BNIP3 dans l'apoptose induite par la surexpression de *debcl*

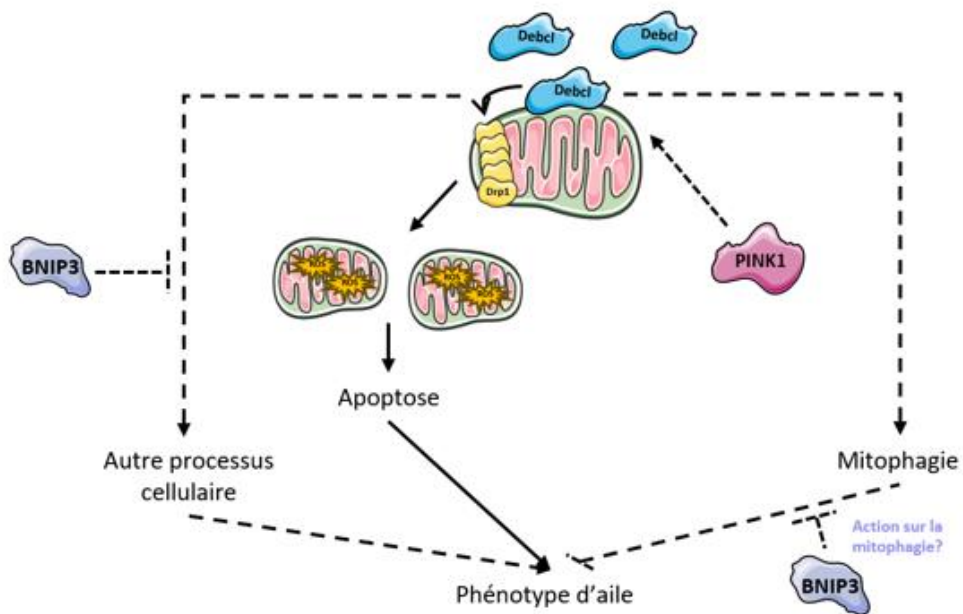


Figure 21 : Schéma des hypothèses concernant les rôles des protéines PINK1 et BNIP3 dans le processus cellulaire induit par *rbf1* ou *debcl*.

b. Parkin

Au cours du crible génétique qui a permis d'identifier PINK1 en tant que modulateur de l'apoptose induite par Rbf1, son partenaire Parkin a également été identifié comme un candidat potentiel. Les régulations induites par Parkin au sein de la cellule sont très variées et incluent notamment la mort cellulaire, la mitose et la différenciation cellulaire. Nous avons commencé notre étude en utilisant le phénotype d'aile induit par la surexpression de Rbf1, puis nous nous sommes intéressés au cas de Debcl.

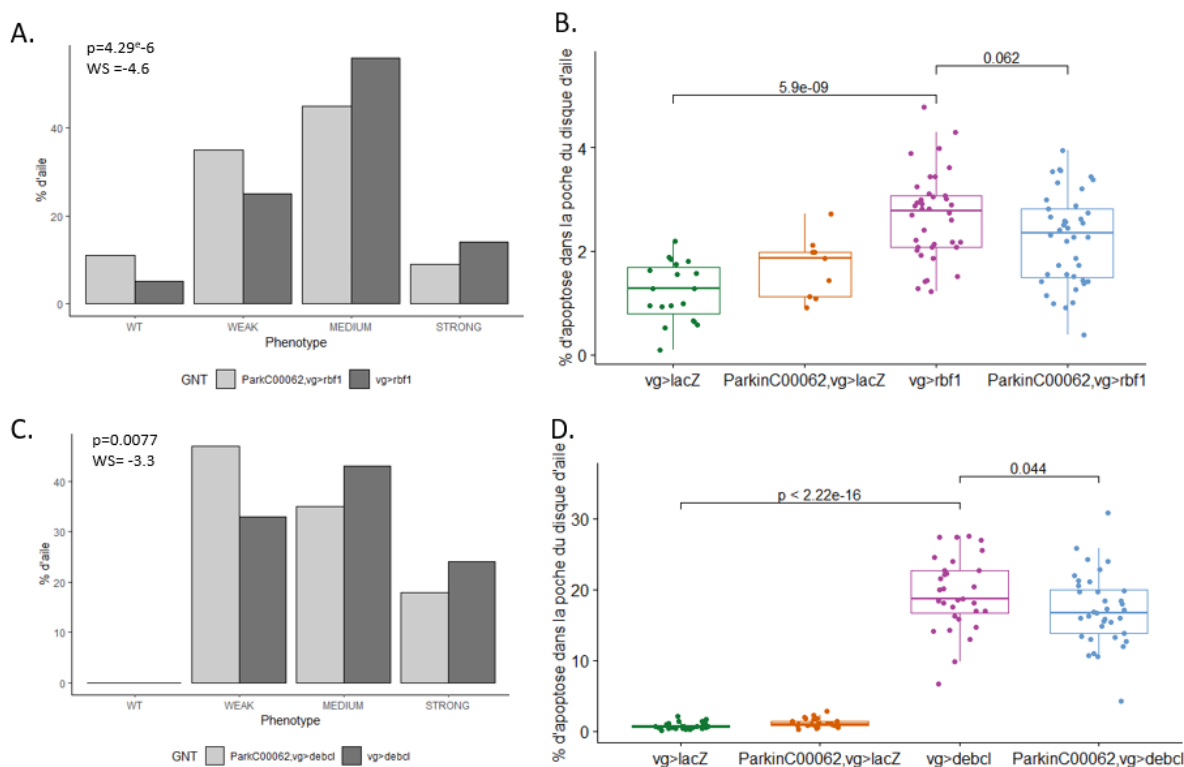


Figure 22: Effet d'une diminution de Parkin sur les phénotypes d'ailes et l'apoptose au niveau larvaire induits par Rbf1 et Debcl (résultats à confirmer). *vg>lacZ* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+*); *ParkinC00062*; *Vg>lacZ* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/ParkinC00062*); *vg>rbf1* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+*); *ParkinC00062*; *vg>rbf1* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/ParkinC00062*); *vg>debcl* (*vg-Gal4/UAS-debcl; UAS-debcl/+*); *ParkinC00062*; *vg>debcl* (*vg-Gal4/UAS-debcl; UAS-debcl/ParkinC00062*) A. et C. Histogramme de la fréquence des phénotypes d'ailes. Le nombre d'ailes observées est pour A. $n=725$ et pour C. $n=375$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon. Ce résultat est représentatif de trois expériences biologiques indépendantes. C. et D. Détection de l'apoptose dans le disque imaginal d'aile larvaire à l'aide d'un anticorps anti-Dcp-1 clivé. Chaque point correspond à l'apoptose mesurée au niveau d'un disque imaginal d'aile. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Kruskal Wallis et du test post hoc de Wilcoxon. Ce résultat est représentatif de deux expériences biologiques indépendantes.

Comme pour PINK1, la surexpression de *rbf1* chez une souche hétérozygote mutée pour Parkin (*Park^{C00062}*, un mutant perte de fonction) conduit à une diminution de la perte de tissu au niveau de l'aile adulte (Figure 22A). De manière surprenante, la quantification de l'apoptose au stade larvaire ne présente pas de diminution statistiquement significative (Figure 22B).

En ce qui concerne la surexpression de *debcl* (Figure 22 C et D) en condition hétérozygote mutant pour Parkin, comme pour *rbf1*, on observe une réduction du phénotype d'aile. Parkin serait donc impliquée dans le phénotype d'aile induit par Debcl. La quantification de l'apoptose

RESULTATS

chez les individus *Parkin*^{C00062}; *vg>debcl* dans le domaine *vg* montre une diminution de la quantité de caspase clivée comparé aux individus *vg>debcl*, validant ainsi le rôle de Parkin dans l'apoptose induite par *debcl*. Néanmoins, ce rôle est à nuancer car j'ai réalisé quatre expériences dont seules deux se sont révélées significatives, bien que toutes allaient dans le sens d'une diminution en contexte *Parkin*^{C00062}.

Pour compléter ces résultats nous nous sommes intéressés à la possibilité pour Rbf1 de réguler transcriptionnellement le gène codant la protéine Parkin. La fonction principale de Rbf1 est celle de co-facteur de transcription. Rbf1 induit la répression ou l'activation de la transcription de ses cibles qui sont particulièrement nombreuses. Parmi elles, se trouvent des gènes codant des protéines régulatrices d'autophagie [339]. En lien avec ce fait, je me suis interrogée sur les différences de niveau d'ARNm du gène codant la protéine Parkin. Pour cela, des expériences de RTqPCR ont été effectuées sur des ARNs extraits de cellules de disques imaginaux d'aile. Les taux d'ARNm ont été quantifiés en condition témoin *lacZ* (cellules de disques imaginaux surexprimant le gène *lacZ*, *vg>lacZ*) et dans notre condition d'intérêt (cellules de disques imaginaux surexprimant *rbf1*, *vg>Rbf1*). Pour valider la relevance de l'expérience, des gènes cibles de Rbf1 ont été choisis comme témoin positif, *how*, et négatif, *buffy*. La surexpression de *rbf1* induit une diminution du taux d'ARNm de *buffy* et une augmentation de celui d'*how*. Ces conditions étant réunies, elles confirment l'induction d'apoptose par Rbf1. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de variation significative de la quantité d'ARNm *park* codant la protéine Parkin (Figure 23). Il semblerait donc que Rbf1 ne module pas l'expression de *park* dans notre contexte.

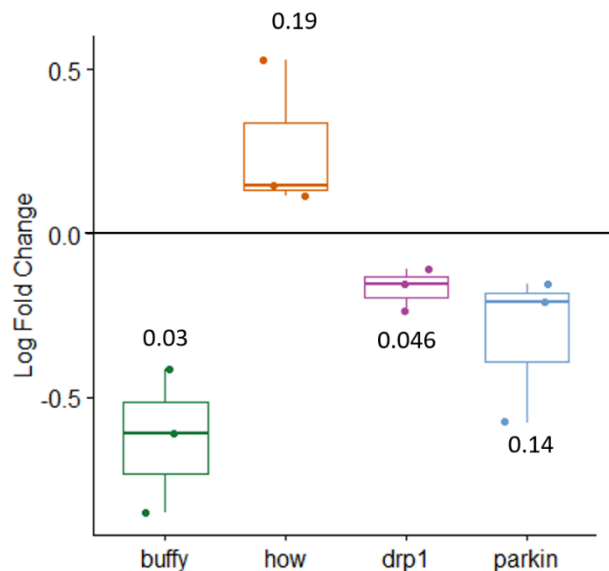


Figure 23 : Taux relatifs d'ARNm des gènes codant Parkin, Drp1, How et Buffy en condition de surexpression de *rbf1* au niveau du disque imaginal d'aile. Log10 des taux relatifs d'ARNm des gènes. Ces résultats sont obtenus après normalisation avec le gène de ménage *uba1* et rapportés au contrôle *LacZ*. Les différences statistiques ont été déterminées en comparant les valeurs issues de 3 expériences indépendantes à l'aide du test Student.

Même si l'ensemble de ces résultats reste pour le moment à confirmer et ne permettent pas d'impliquer Parkin dans l'apoptose induite par Rbf1, on peut envisager que Parkin agisse plutôt comme un régulateur positif de l'apoptose induite par Rbf1 et Debcl, dans la mesure où toutes les

expériences allaient dans le sens d'une diminution en contexte *Parkin*^{C00062}. Cette observation irait dans le même sens que les résultats observés en contexte mutant pour PINK1 qui est connue pour activer Parkin au niveau de la mitochondrie. De plus, si cette régulation existe réellement elle ne passerait pas par une régulation transcriptionnelle de *park* induite par Rbf1.

En parallèle, nous avons également étudié l'expression de *drp1*. Ce gène a été choisi au vu du rôle clé de Drp1 dans la modulation de la balance apoptose/mitophagie. Ainsi, contrairement à ce qui est observé pour *park*, nous avons observé une diminution significative du taux d'ARNm *drp1*.

La diminution de l'expression de *drp1* est inattendue car la protéine Drp1 est nécessaire pour l'apoptose induite par *rbf1*. Néanmoins une étude réalisée sur des embryons précoces montre que des niveaux élevés de *drp1* favorisent la mitophagie au détriment de l'apoptose alors qu'un changement d'expression de *drp1* conduisant à un faible taux de protéine Drp1 augmente la sensibilité de la cellule à l'apoptose [361]. On peut envisager qu'en régulant négativement l'expression de *drp1*, Rbf1 favorise l'apoptose

En conclusion, dans le disque imaginal d'aile, la surexpression de *rbf1* ne module pas l'expression de *Park* mais diminue la quantité d'ARNm de *drp1*.

2. Qui de la mitophagie ou de l'apoptose est induit en premier ?

Les nombreux liens entre apoptose et mitophagie soulèvent la question du partage des acteurs, des inducteurs, des décisionnaires mais également de la chronologie des événements qui suivent un stress mitochondrial. Plusieurs possibilités ont été proposées vis-à-vis de l'autophagie générale par Denton et Jumar, 2019 (Figure 24). Dans ce schéma l'autophagie a été remplacé par la mitophagie, pour présenter cinq hypothèses qui peuvent être envisagées. La première possibilité est une mitophagie concomitante à l'apoptose. Ensuite, nous avons une mort induite par la mitophagie différente de l'apoptose. La troisième possibilité est une apoptose dépendante de la mitophagie. La quatrième proposition montre une activation de l'apoptose qui induit de la mitophagie ou bien la mort de la cellule. Enfin, la cinquième proposition où une apoptose et une mitophagie peuvent être induites et conduire toutes deux à la mort de la cellule.

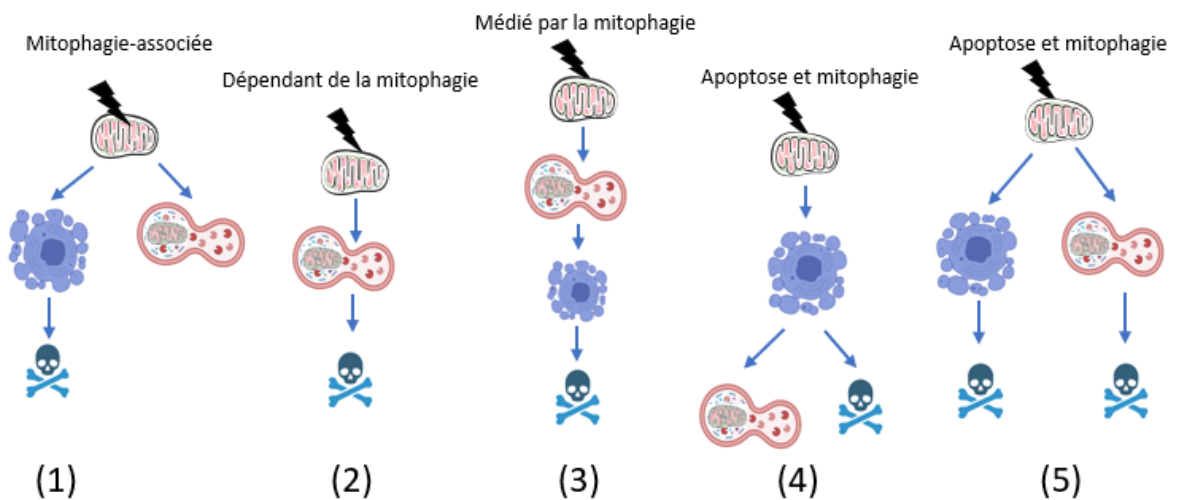


Figure 24: Schéma des hypothèses des chronologies des événements cellulaires induit par un stress mitochondrial. Adapté de Denton et Kumar 2019 [379].

Pour mieux comprendre la cinétique de notre système, nous avons effectué des mesures de l'apoptose en bloquant, à défaut de la mitophagie, le processus autophagique. Inversement nous avons mesuré la mitophagie en bloquant le processus apoptotique (Figure 25). Avec ces expériences, nous avons pu observer si l'altération d'un processus affecte le second ou si au contraire, aucune variation n'est observée.

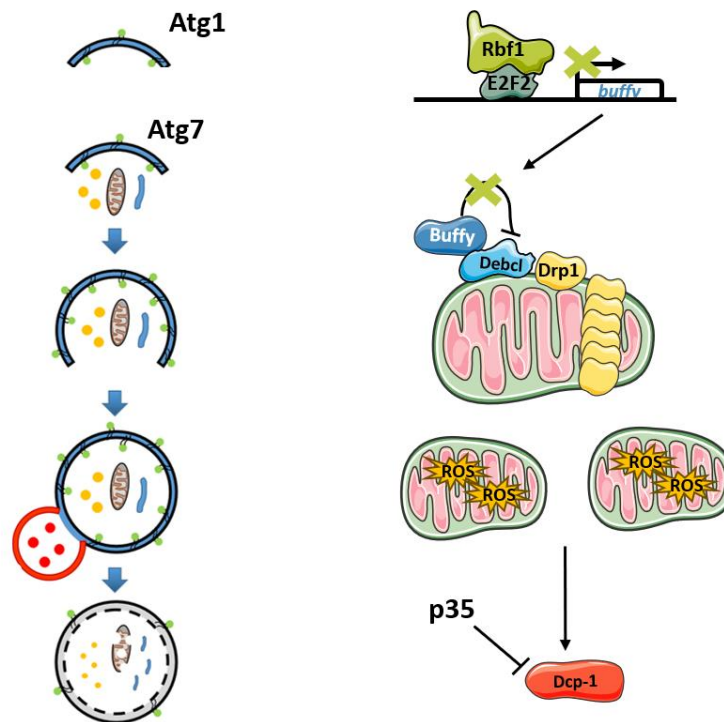


Figure 25: Schéma des cibles utilisées pour bloquer l'apoptose ou l'autophagie. A gauche, schéma simplifié de l'autophagie issue de la Figure 9. Les gènes mutés au cours des expériences codent les protéines Atg1 et Atg7. A droite, schéma de l'apoptose induite par Rbf1. Le blocage de l'apoptose est réalisé par un inhibiteur de caspase, p35, ou une mutation du gène debcl.

a. L'apoptose dépendante de la mitophagie

Pour le blocage de l'autophagie, nous avons utilisé des mutants pour les gènes *Atg7* (perte de fonction) et *Atg1* (mutant dominant négatif) respectivement impliqués dans l'élongation du phagophore et dans les phases précoces d'induction de l'autophagie. Nous avons recherché si, en contexte mutant hétérozygote, les phénotypes d'aile ou l'apoptose induite par *rbf1* étaient modulés (Figure 26). Dans le cas d'*Atg7* (mutant *Atg7^{d77}*) nous n'avons observé aucun effet sur le phénotype d'aile, ce qui est en accord avec la quantification de l'apoptose qui ne varie pas. Afin de confirmer ces résultats, nous avons bloqué l'autophagie plus en amont en utilisant un mutant d'*atg1*. La seule expérience réalisée, en contexte hétérozygote mutant, n'a pas montré de variation dans la répartition du phénotype d'aile.

Ainsi, il semblerait qu'une diminution partielle des effecteurs du processus autophagique n'affecte pas l'apoptose induite par *rbf1*. Ces résultats sont inattendus car la perte de PINK1 conduit à une diminution de l'apoptose. Si l'autophagie générale n'altère pas le processus apoptotique alors que la protéine pro-mitophagie PINK1 le diminue, il est possible que le rôle de PINK1 dans ce processus soit indépendant de la mitophagie. Il reste toutefois à confirmer ces expériences avec plus de données et de vérifier qu'en contexte mutant hétérozygote pour *Atg1* et *Atg7* la mitophagie est bien diminuée.

RESULTATS

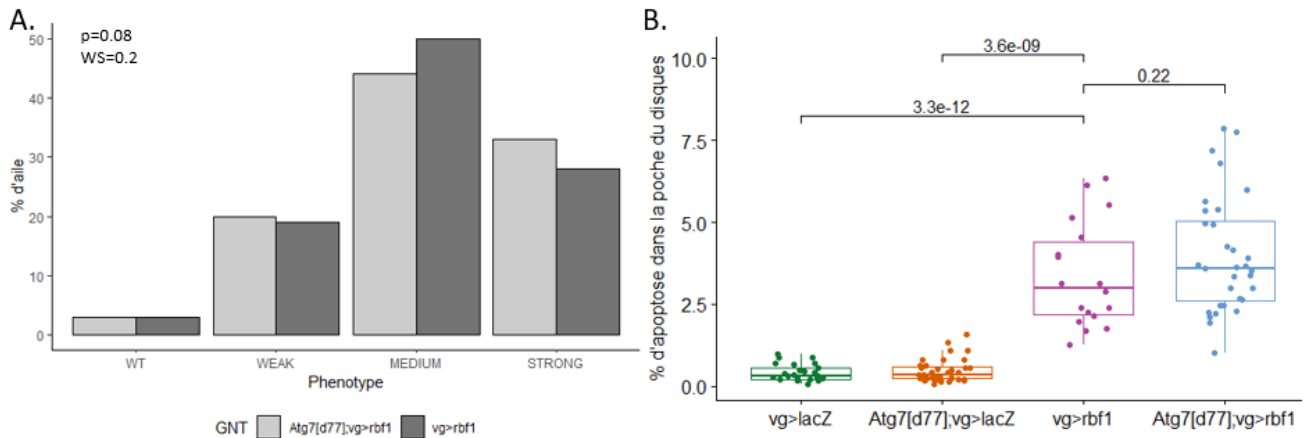


Figure 26: Observation des phénotypes d'ailes et mesure du taux d'apoptose induits par Rbf1 en condition mutant ou non du gène atg7. *vg>lacZ* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+*); *Atg7[d77]; vg>lacZ* (*vg-Gal4/Atg7[d77]; UAS-lacZ/+*); *vg>rbf1* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+*); *Atg7[d77]; vg>rbf1* (*vg-Gal4/Atg7[d77]; UAS-rbf1/+*) A. Histogramme de la fréquence des phénotypes d'aile. Le nombre d'ailes observées est $n=408$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon. Ce résultat est représentatif de trois expériences biologiques indépendantes. B. Détection de l'apoptose dans le disque imaginal d'aile à l'aide d'un anticorps anti-Dcp-1 clivé. Chaque point correspond à la quantité d'apoptose mesurée au niveau d'un disque imaginal d'aile. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Kruskal Wallis et du test post hoc de Wilcoxon. Ce résultat représente l'ensemble de deux expériences biologiques indépendantes.

b. La mitophagie dépendante de l'apoptose

Pour déterminer si la mitophagie est consécutive à l'apoptose, deux tests ont été réalisés pour bloquer le processus apoptotique. Nous avons utilisé la surexpression du gène codant la protéine p35, un inhibiteur des caspases capable d'empêcher leur activation, et un mutant perte de fonction de *Debcl*, *Debcl*^{E26}. Les résultats présentés ici sont préliminaires car réalisés une seule fois. Les différences observées quand la protéine p35 est surexprimée ou en condition *Debcl*^{E26} ne sont pas significatives. Néanmoins nous observons dans les deux cas une tendance à l'augmentation de la mitophagie quand l'apoptose est inhibée (Figure 27).

En conclusion, la mitophagie n'est pas significativement affectée par un blocage de l'apoptose mais cela reste à confirmer par des expériences supplémentaires au vu de la tendance des résultats.

D'après ces observations, trois des mécanismes présentés en Figure 24 peuvent être éliminés. L'apoptose induite par *Rbf1* ne semble donc pas être affectée par une diminution du récepteur BNIP3, bien que cela diminue la mitophagie, tout comme une baisse du niveau d'*Atg1* ou d'*Atg7*. Ces résultats suggèrent que la mitophagie n'est pas nécessaire pour induire l'apoptose dans ce système, et invalide les hypothèses 2, 3 et 5 de la Figure 24. Enfin, l'inhibition du processus apoptotique n'affecte pas significativement la mitophagie et le niveau de mitophagie tend à augmenter. Donc l'apoptose n'est pas nécessaire pour induire de la mitophagie ce qui n'est pas en accord avec l'hypothèse 4. L'ensemble de ces résultats est donc plutôt en faveur d'une mitophagie parallèle à l'apoptose qui pourrait limiter l'entrée en apoptose, l'hypothèse 1.

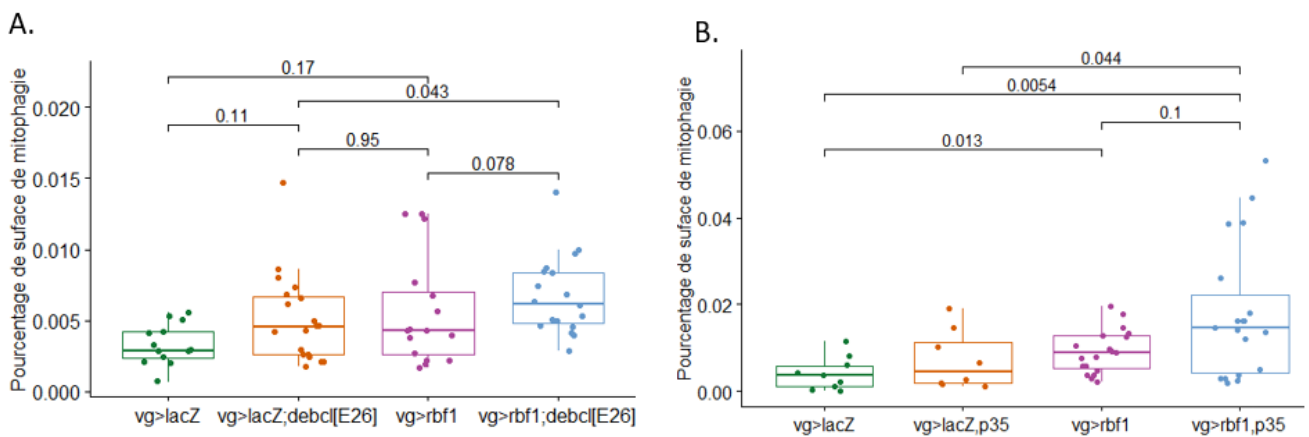


Figure 27: Mesure de la mitophagie induite par *rbf1* en contexte mutant hétérozygote pour *debcl* ou en présence d'une surexpression de l'inhibiteur d'apoptose *p35*. *vg>lacZ* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/+*); *vg>lacZ; debcl[E26]* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/debcl[E26]*); *vg>rbf1* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/+*); *vg>rbf1; debcl[E26]* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/debcl[E26]*); *vg>lacZ; p35* (*vg-Gal4/+; UAS-lacZ/p35*); *vg>rbf1;p35* (*vg-Gal4/+; UAS-rbf1/p35*). A. et B. Quantification de la mitophagie en utilisant *mt-Keima* en rapportant le niveau de mitophagie à l'aire à la zone sélectionnée. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Kruskal Wallis et du test post hoc de Wilcoxon. Ces résultats correspondent l'ensemble de deux expériences biologiques indépendantes.

3 Turbo Debcl, un outil de détection des partenaires de Debcl

a. Le système Turbo ID

Depuis plusieurs années, le laboratoire travaille sur le processus apoptotique chez la drosophile dont un des acteurs majeurs est la protéine Debcl. Bien que caractérisée depuis les années 2000, aucun anticorps commercial n'est capable de détecter cette protéine. Ce manque d'anticorps rend notamment difficile l'identification de partenaires de Debcl.

Pour remédier à ce problème, nous avons choisi de développer une protéine recombinante Debcl couplée à une enzyme biotinyllante du nom de Turbo BioID, ici appelé Turbo. Cet outil, initialement développé pour les modèles cellulaires, a été adapté au modèle drosophile. Ainsi, la fonction enzymatique de Turbo biotinyllera ses potentiels partenaires de la protéine Debcl. Ces protéines seront récupérées en utilisant des billes d'agarose couplées à la streptavidine avant d'être analysées par spectrométrie de masse. L'objectif à terme sera de comparer les interactions protéiques de Debcl en présence et absence de la protéine PINK1.

b. La construction et la validation de l'outil

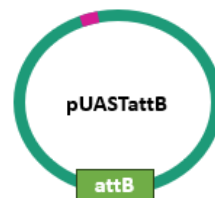
La réalisation de la construction a nécessité des mises au point et des changements de stratégies tout au long du projet. Au final nous sommes partis de deux vecteurs, l'un contenant le gène *debcl* et un second codant la séquence Turbo ID V5 (V5 est une étiquette qui permet de détecter et suivre les protéines d'intérêt). Le vecteur final choisi est le plasmide pUASTattB. Ce plasmide, en plus de posséder une séquence UAS, possède une séquence attB. Cette séquence a la capacité de recombiner avec des séquences attP grâce à la protéine PhiC31 qui est une intégrase. La séquence attP a été insérée dans le génome de nombreuses lignées de drosophiles au niveau de sites spécifiques et connus. Ainsi, la séquence attB nous permet d'insérer notre séquence d'intérêt au niveau d'un site spécifiquement choisi dans le génome de la drosophile.

Nous avons décidé dans un premier temps de construire deux vecteurs : l'un codant la protéine TurboS, ne contenant que la séquence *turbo* comme témoin, et l'autre, codant la protéine TurboD-Debcl, contenant la séquence de *turbo* en amont de la séquence de *debcl* (Figure 28). Cette position permet de laisser libre le domaine C terminal de la protéine Debcl. Ce domaine contient sa séquence transmembranaire qui est nécessaire à son insertion au niveau de la membrane mitochondriale externe.

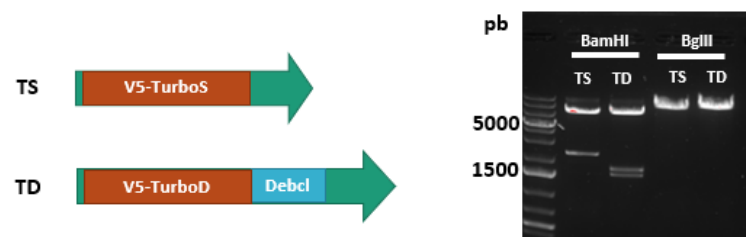
Synthèse d'amorce présentant des sites de restriction en amont et en aval des séquences Turbo et Debcl



Les séquences sont insérées dans le plasmide pUASTattB



Vérification de l'insert par séquençage et digestion.



Intégration du plasmide dans le génome de la drosophile par recombinaison homologue par la société Best Gene

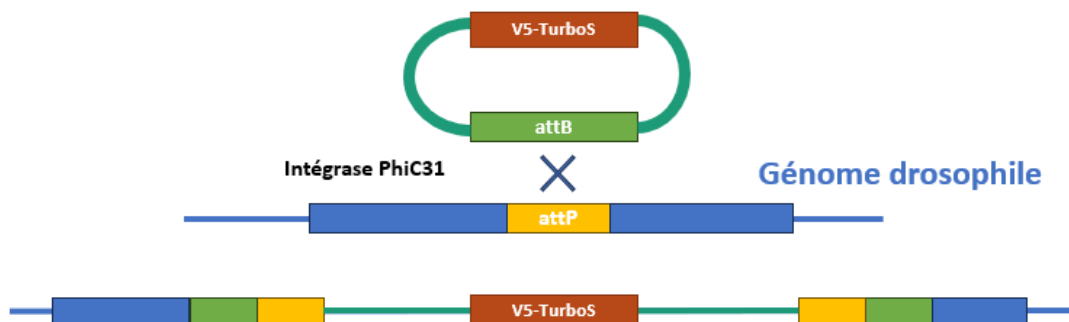


Figure 28: Construction des souches transgéniques TurboS et TurboD-Debcl. Les séquences turboS, turboD et debcl sont obtenues par PCR avec des amorces contenant les séquences des enzymes de restriction EcoRI ou BamHI. Après digestion les séquences d'intérêt sont insérées dans le vecteur pUASattB, vérifiées par séquençage. Deux digestions ont été effectuées afin de vérifier la taille et la présence des inserts. une digestion témoin BglIII ne contenant qu'un seul site de restriction et permettant d'obtenir des fragments de 9Kbp pour turboS (TS) et 10Kbp pour turboD-debcl (TD) respectivement. En parallèle, après une digestion par BamHI, deux séquences sont présentes dans le plasmide pUASTattB et une seule entre les segments turboD-debcl. Les plasmides validés ont été envoyés à l'entreprise Best Gene pour effectuer une transgénèse. L'insertion dans le génome de la Drosophile est faite grâce à l'intégrase PhiC31 au niveau des attP40 sur le chromosome II et attP2 au niveau du chromosome III.

RESULTATS

Pour construire notre insert final, nous avons synthétisé les séquences de *turboS*, *turboD* et *debcl* par PCR. Les séquences des amorces de restriction présentes aux abords des séquences de *turbo* et *debcl* ne correspondent pas aux séquences des sites d'enzymes présents dans la séquence du plasmide de destination pour réaliser les lignées transgéniques. Nous avons donc construit des amorces présentant des sites de restrictions ajoutés aux extrémités du segment correspondant aux séquences d'intérêt (Figure 28). Pour TurboS, nous avons utilisé la séquence EcoRI pour les régions codantes les extrémités 5' et 3'. Pour TurboD-Debcl, nous avons utilisé EcoRI pour la partie codant l'extrémité 5' de *turboD* et pour l'extrémité 3' de *debcl*. De plus, entre les séquences *turboD* et *debcl*, des nucléotides correspondant à une alternance de six glycines et sérines ont été ajoutées pour permettre aux deux protéines d'exercer leurs fonctions sans se bloquer mutuellement. Les séquences obtenues ont été insérées dans le vecteur puis validées par digestion enzymatique et par séquençage. Les plasmides finaux ont été envoyés à l'entreprise Best Gene pour insertion dans le génome de la drosophile et obtention de drosophile transgéniques.

Une fois reçues, dans le but de vérifier la conservation des fonctions de la biotinyllase et de Debcl, les souches obtenues ont été croisées avec une souche contenant le pilote Vg et la synthèse de la protéine TurboS ou TurboD-Debcl vérifiée par western-blot en utilisant un anticorps dirigé contre le tag V5 présent sur les deux constructions (Figure 29). La quantité de protéine n'est pas comparable car la dissection des génotypes a été faite à l'aveugle. La quantité de cellule est identique mais l'absence de balancier n'a pas permis de sélectionner uniquement les larves exprimant une construction turbo. Ainsi les extraits sont composés de disques d'ailes exprimant ou non le transgène dans des proportions inconnues. Pour valider le maintien de la fonction pro-apoptotique de V5-TurboD-Debcl, une expérience d'immunofluorescence sur disque imaginaux d'aile a été réalisée, en utilisant l'anticorps anti-Dcp-1 clivé afin de visualiser les cellules en apoptose. En parallèle, la localisation de la protéine a été vérifiée grâce à l'anticorps anti V5 et, enfin, à l'aide de streptavidine fluorescente, nous avons pu observer une augmentation de la quantité de molécules biotinylées dans le domaine Vg des disques imaginaux possédant la construction Turbo-ID ou TurboD-Debcl. Une augmentation du marquage V5 est également visible à ce niveau. Le marquage révèle la présence de la protéine Turbo-S ou TurboD-Debcl. Il semblerait que les protéines TurboD-Debcl s'accumulent, conduisant à l'apparition de spots qui doivent encore être étudiés pour savoir s'ils colocalisent avec la membrane mitochondriale. Par contre nous n'observons pas d'augmentation de l'apoptose. Cette observation est cohérente avec les résultats précédemment obtenus qui montrent que la surexpression d'une copie unique de *debcl* n'est pas suffisante pour observer une augmentation significative de l'apoptose et un phénotype au niveau des ailes.

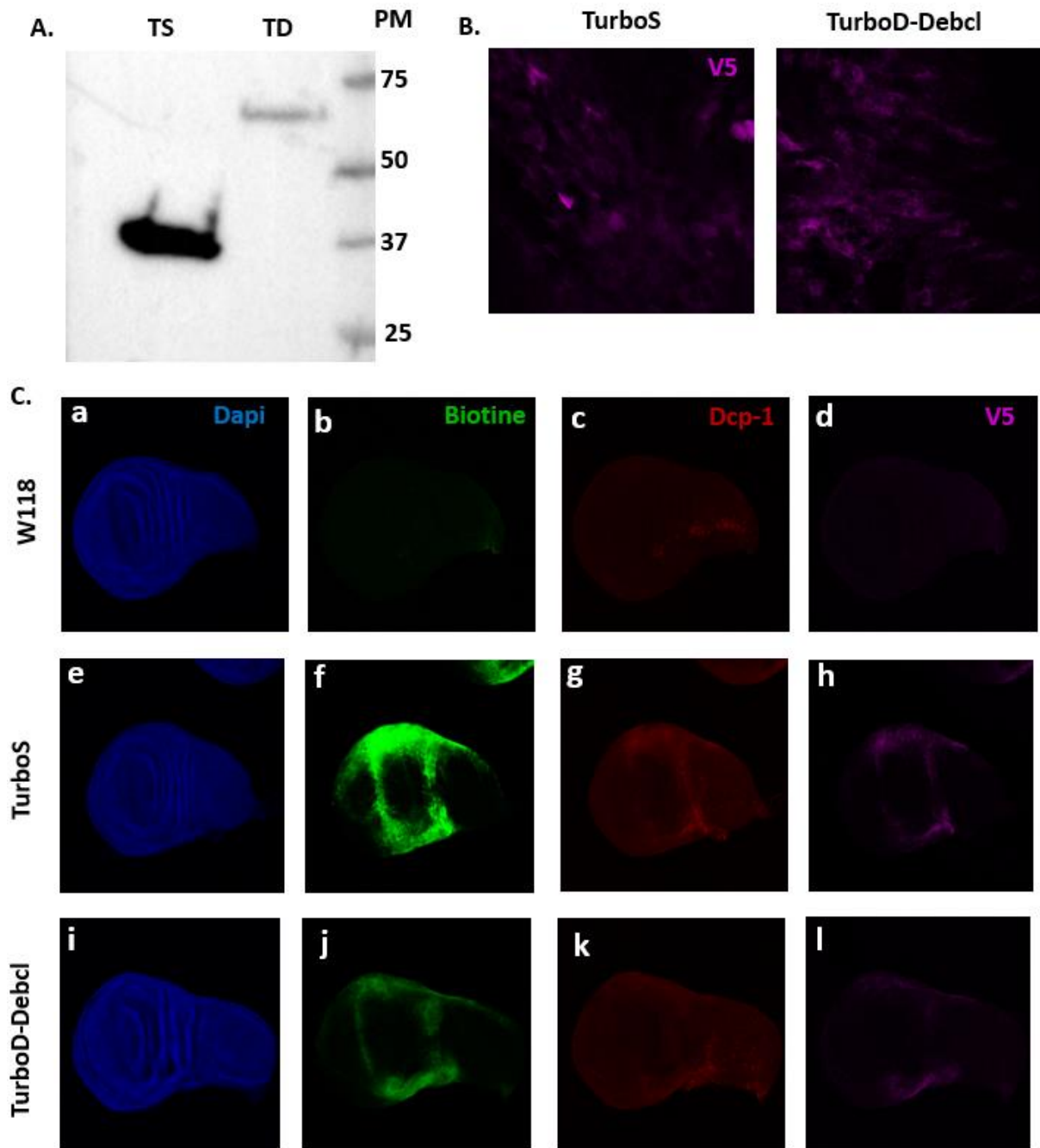


Figure 29: Validation de l'outil Turbo. A. Western blot des protéines issues des disques imaginaux d'aile des drosophiles de génotypes TurboD-Debcl et Turbo. La bande correspond au marquage anticorps dirigé contre le Tag-V5. La bande TurboS (TS) est de 37kDa et TurboD-Debcl (TD) est de 71 kDa. PM (poids moléculaire en kDa). B. Disque imaginaux observé au zoom 63 avec un marquage V5 pour les souches TurboD-Debcl et TurboS C. Disques imaginaux d'aile marqués au Dapi (a, e, i), à la Streptavidine (révélant la biotine ; b, f, j), avec l'anticorps anti-Dcp-1 clivé (c, g, k) et avec l'anticorps anti-Tag-V5 (d, h, l). TurboD-Debcl (vg-Gal4/+; turboD-debcl/+), TurboS (vg-Gal4/+; turboS/+) et W1118 (+/+; +/+).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

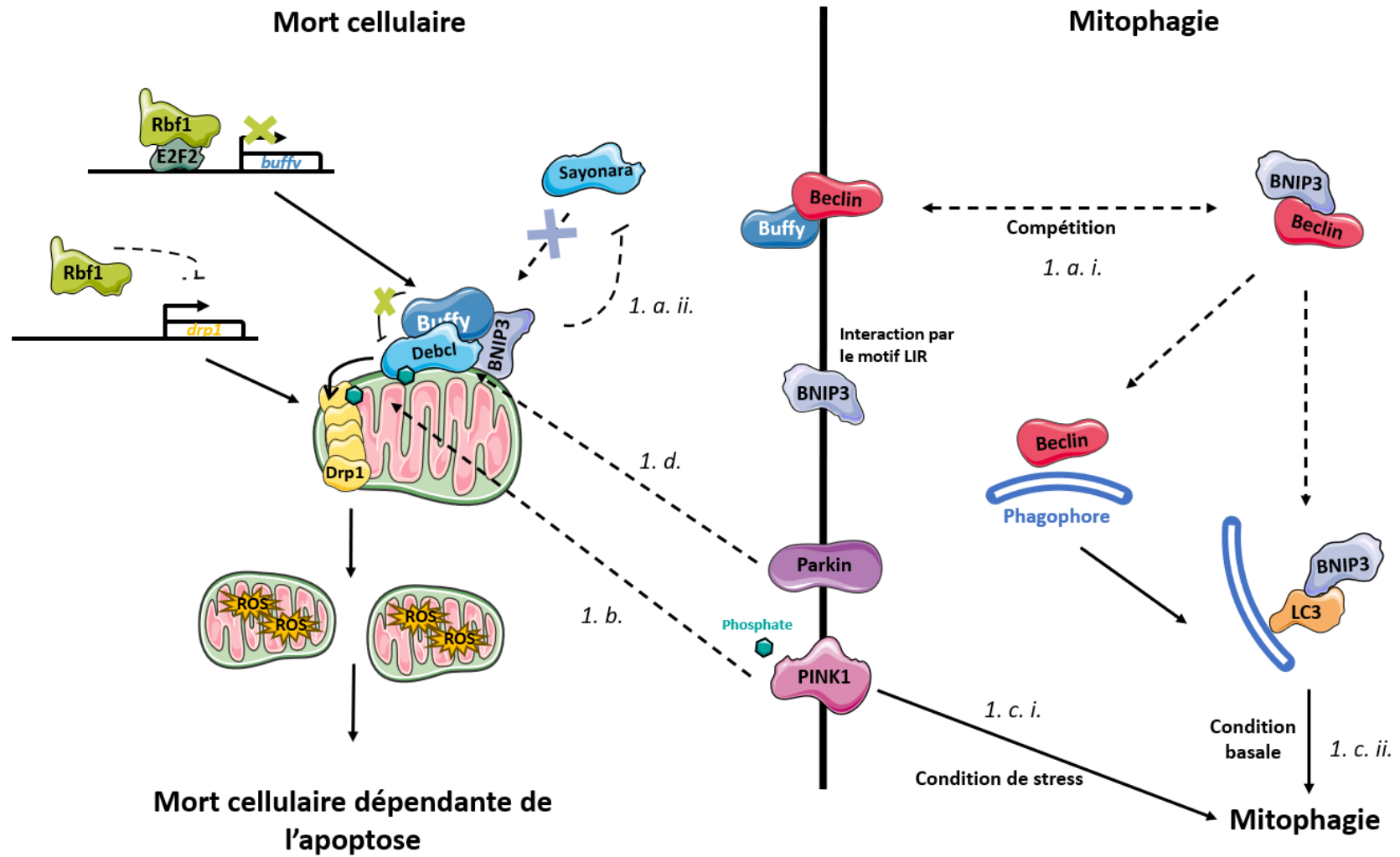


Figure 30: Schéma bilan des résultats et hypothèses. Les flèches pleines correspondent aux données de la littérature. Les flèches en pointiller correspondent à nos observations et hypothèses

1. Les protéines de la mitophagie dans l'apoptose induite par Rbf1 et Debcl

a. BNIP3 dans le processus apoptotique

La majorité des études sur le rôle de BNIP3 dans l'apoptose ont été réalisées chez les mammifères. Chez la drosophile, l'homologue de BNIP3 a été peu étudié. Dans ce modèle BNIP3 est largement présenté comme un gène nécessaire à la survie cellulaire. Au niveau de cerveaux de drosophile il induit la mitophagie afin d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles. Cela favorise l'homéostasie des muscles, de l'intestin et la longévité des drosophiles [167]. Dans les cellules germinales, BNIP3 joue également un rôle pro-survie et permet l'élimination de mitochondries défectueuses ayant accumulées des mutations dans leur ADN, ce processus implique une mitophagie dépendante de BNIP3, mais indépendante de PINK1/Parkin [168,391]. Les travaux réalisés chez les mammifères soulignent un rôle de BNIP3 dans la mitophagie, toutefois plusieurs travaux le présentent comme un facteur favorisant la mort cellulaire en raison de sa capacité à lier des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Le rôle de BNIP3 est donc complexe et les travaux effectués chez la drosophile n'ont pas étudié son activité dans un épithélium en prolifération comme le disque d'aile ou son rôle dans un contexte apoptotique. Les résultats que j'ai obtenus permettent donc d'investiguer ces questions.

i. Rbf1 ne semble pas moduler l'expression de BNIP3 dans notre système

Comme il a été déjà mentionné, Rb présente de nombreuses cibles transcriptionnelles. La protéine pRb module l'expression de gènes de l'autophagie. Plus spécifiquement, en condition d'hypoxie le complexe pRb/E2F1 peut réprimer l'expression de BNIP3 pour inhiber la mitophagie [392]. Une large part des cibles transcriptionnelles de pRB sont également des cibles transcriptionnelles de Rbf1. La surexpression de *rbf1* s'accompagne d'une augmentation de mitophagie, ainsi Rbf1 pourrait moduler l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le processus de mitophagie. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré le niveau des ARNm codant les protéines modulatrices de l'apoptose (BNIP3, PINK1, Parkin) en contexte de surexpression de *rbf1*. Au vu des résultats chez le mammifère, nous nous attendions à une répression transcriptionnelle de *BNIP3*. Les résultats montrent que l'expression de *BNIP3* n'est pas modulée par la surexpression de *rbf1*. Contrairement à l'étude chez le mammifère, BNIP3 ne semble pas être une cible transcriptionnelle de Rbf1 dans notre modèle. De plus, dans notre modèle d'apoptose, les cibles transcriptionnelles responsables de l'induction de l'apoptose sont régulées par le complexe Rbf1/E2F2 [355] et non pas par E2F1 comme dans l'étude de Tracy *et al.* . Par ailleurs, dans le modèle mammifère, l'expérience est réalisée sur des organes d'embryon de souris en condition d'hypoxie. Notre mesure de l'expression, quant à elle, est faite au niveau du disque imaginal d'aile, un tissu épithélial qui se développe différemment du tissu murin. Il est donc possible que les conditions nécessaires pour observer une répression transcriptionnelle de *BNIP3* par Rbf1 ne soient pas réunies. Il est également possible que, chez la drosophile, BNIP3 ne soit pas une cible transcriptionnelle de Rbf1.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

ii. La possibilité pour BNIP3 de réguler les protéines de la famille Bcl-2

Si l'expression de *BNIP3* n'est pas régulée par *Rbf1*, cette protéine reste un modulateur de l'apoptose induite par *Rbf1*. Un mécanisme possible pour expliquer l'effet protecteur de *BNIP3* sur l'apoptose induite par *Rbf1* reposerait sur une interaction de *BNIP3* avec les protéines de la famille *Bcl-2*, *Sayonara*, *Debcl* et/ou *Buffy*.

Les premières études chez le mammifère décrivent un rôle pro-apoptotique de *BNIP3*, en interagissant avec les protéines *Bak* et *Bax* [363,365]. De même chez la drosophile, une étude décrit une fonction pro-apoptotique pour *BNIP3* au cours du développement musculaire [166]. Néanmoins plus récemment *BNIP3* a été identifié comme régulateur de mitophagie, capable d'éliminer les mitochondries endommagées et de favoriser la survie cellulaire [160,167]. Au cours de notre étude, *BNIP3* est également apparue comme un facteur de survie cellulaire. La diminution de *BNIP3* aggrave le phénotype et augmente l'apoptose induite par *Rbf1*. Ainsi *BNIP3* serait un régulateur négatif du processus apoptotique induit par *Rbf1*.

Chez les mammifères *BNIP3* a la capacité d'interagir avec les protéines de la famille *Bcl-2*, notamment avec *Bcl-xL* et *Bcl-2* (tous deux anti-apoptotiques) [276,364,365,393]. La conservation partielle de la protéine *BNIP3* chez la drosophile permet de supposer que cette interaction serait conservée chez la drosophile. En effet, même si *BNIP3* de drosophile ne possède pas de motif BH3 évident [321], on ne peut exclure une telle interaction dans la mesure où, chez les mammifères, *BNIP3* peut se lier à *Bcl-2/Bcl-xL* indépendamment de son BH3 [309]. Nous avons observé que *BNIP3* régule négativement l'apoptose en amont de *Debcl*. Dans ces conditions, *BNIP3* pourrait interagir avec *Buffy* et favoriser son activité anti-apoptotique. Le mécanisme proposé par Ikegawa et al. 2023 serait une interaction entre les trois membres connus de la famille *bcl-2* chez la drosophile : *Sayonara*, *Buffy* et *Debcl*. Cette interaction favoriserait l'activation des caspases. Or dans les modèles du laboratoire, *Buffy* inhibe *Debcl*. Les deux modèles mis en commun on peut supposer que l'inhibition de *Debcl* est bloquée par son interaction avec *Sayonara*. Dans ce contexte, *BNIP3* pourrait entrer en compétition avec *Sayonara* pour maintenir *Buffy* actif et ainsi maintenir *Debcl* inhibé.

On ne peut également pas exclure une interaction entre les protéines *Sayonara* ou *Debcl*, où *BNIP3* jouerait le rôle d'inhibiteur. L'outil Turbo-*Debcl* que nous avons développé devrait nous permettre de répondre à la question d'une possible interaction avec *Debcl*. Les études avec *Buffy* et *Sayonara* seront plus compliquées à mettre en œuvre au vu du manque d'anticorps disponibles mais reste une piste à envisager.

Enfin un dernier membre sur lequel la protéine *BNIP3* pourrait se fixer est la protéine *Beclin 1* (*Atg6* chez la drosophile) une régulation de la balance mitophagie apoptose impliquant une compétition entre un régulateur de l'autophagie et un membre de la famille *Bcl-2* a déjà été observée, chez les mammifères, avec la protéine *Beclin 1* [356,357]. La fixation de *Bcl-2* à *Beclin 1* inhibe l'autophagie [312]. La libération de *Beclin 1* peut se faire par l'intermédiaire des protéines à BH3 only et permet d'induire l'autophagie, ce qui compenserait la mort cellulaire. Néanmoins, en condition de surexpression de *rbf1*, il n'a pas été observé d'augmentation de mitophagie dépendante de *BNIP3* (Figure 30).

iii. L'activité protectrice de BNIP3 sur les phénotypes induits par *Debcl*

En parallèle nous avons observé que la déplétion en BNIP3 augmente le phénotype de perte de tissu de l'aile adulte induit par *Debcl*. Cette perte de tissu adulte supplémentaire est indépendante de l'apoptose car les marquages TUNEL et de la caspase Dcp-1 clivée dans le disque d'aile au stade larvaire ne sont pas affectés en contexte *vg>debcl* versus *vg>debcl, BNIP3 RNAi*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, le laboratoire a observé récemment une induction du stress du réticulum endoplasmique (RE) en cas de surexpression de *debcl*. Dans des cellules de mammifères, BNIP3 a été détectée au niveau de la membrane du RE et une augmentation de l'expression de *BNIP3* est observée chez des cellules soumises à un stress du RE. De plus, cette augmentation de BNIP3 est un élément critique, dans la mesure où un knock-down de BNIP3 par siRNA atténue le dysfonctionnement des cardiomyocytes induits par le stress ER, en rétablissant le contenu en Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique. [394–397]. Une étude chez la drosophile montre que la diminution de BNIP3 conduit à une augmentation de la RE-phagie [398]. Ces observations ouvrent la possibilité d'un rôle éventuel de BNIP3 dans le contrôle du stress du RE chez la drosophile. L'intensité de ce stress, induit par *debcl*, pourrait être dépendant de BNIP3. La perte de BNIP3 devrait dans ce cas conduire à une diminution du stress du RE induite par *Debcl*. Le stress du RE pourrait altérer le développement de l'aile ou induire une mort indépendante de l'activation des caspases et non détectée par la méthode TUNEL. Pour tester cette hypothèse, des mesures du stress RE en condition d'expression de *debcl* avec ou sans ARNi *BNIP3* sont en cours au laboratoire. Par ailleurs, il sera nécessaire de rechercher si le stress du RE induit en contexte *vg>debcl* est associé à une augmentation de l'expression de BNIP3.

La seconde hypothèse concerne la prolifération cellulaire au niveau du disque d'aile. Le rôle de BNIP3 sur la prolifération reste indéterminé. Des études montrent une augmentation de la prolifération en cas de perte de la protéine BNIP3 [399,400]. À l'inverse il a été montré que la surexpression de *BNIP3* participe à la prolifération cellulaire [401]. BNIP3 semble pouvoir induire ou inhiber la prolifération cellulaire selon le type cellulaire et les stimuli testés. Au laboratoire, il a été montré que l'apoptose induite par *Rbf1* est aussi accompagnée d'une prolifération compensatoire qui permet de limiter l'endommagement des tissus [354,355]. Il est possible que l'induction de l'apoptose par *Debcl* induise aussi une prolifération compensatoire. Ainsi, si BNIP3 est nécessaire à ce mécanisme, sa perte pourrait expliquer l'aggravation du phénotype d'aile induit par *Debcl*, sans pour autant altérer le processus apoptotique. Cette hypothèse pourrait être testée en réalisant des marquages de la prolifération cellulaire à l'aide d'anti-Phospho Histone H3 sur des disques imaginaux d'aile *vg>debcl* en contexte sauvage ou de surexpression d'un ARNi *BNIP3*.

Nos résultats montrent que BNIP3 régulerait négativement le processus apoptotique induit par *Rbf1*. Nous avons également montré que BNIP3 module le phénotype induit par *Debcl* indépendamment d'une régulation du processus apoptotique et ne module pas la mitophagie induite par *Debcl*. La modulation du phénotype par BNIP3 est donc indépendante de l'apoptose et de la mitophagie. Or la surexpression de *Debcl* conduit à une augmentation de stress du RE mais impacte également la prolifération cellulaire. Le rôle complexe de BNIP3 sur ces deux processus permet de supposer que BNIP3 pourrait diminuer le phénotype d'aile en induisant un stress RE qui pourrait favoriser la prolifération pour compenser la perte de tissu.

b. PINK1 dans le processus apoptotique

De tous les résultats obtenus, les plus clairs sont les résultats concernant la protéine PINK1. Nous avons pu montrer que la protéine est impliquée dans le processus apoptotique induit par les protéines Rbf1 ou Debcl. PINK1 agit donc en aval ou au niveau de la protéine Debcl. Pour identifier les mécanismes par lesquels PINK1 intervient au cours de l'apoptose nous avons voulu tester plusieurs hypothèses.

Un nombre grandissant de protéines connues pour leur capacité à induire de la mitophagie interviennent également dans la régulation de dynamique mitochondriale. De plus, l'activation de Drp1 et son adressage à la mitochondrie sont régulés par des phosphorylations de Drp1. Aussi, nous nous avons recherché si la protéine PINK1 modulait l'activité de la protéine DRP1. Pour cela nous avons comparé différents paramètres en condition mutante pour PINK1 :

- **L'état de phosphorylation de Drp1.** En effet, la kinase PINK1 peut phosphoryler la protéine DRP1 comme le montrent certaines études [80,402]. L'expérience a été réalisée avec un anticorps dirigé uniquement contre la protéine Drp1 phosphorylée en S616 (site induisant l'activation de Drp1). Aucune différence n'a été observée quand la protéine PINK1 fonctionnelle est absente au cours des deux expériences réalisées.
- **La relocalisation de Drp1 à la mitochondrie.** Cette relocalisation est essentielle pour induire la fission mitochondriale observée au cours du processus apoptotique [355]. Pour répondre à cette question des expériences de fractionnement cellulaire sur disque d'aile ont été réalisées. Malgré de multiples tentatives, nous n'avons pas réussi à séparer les mitochondries des microsomes du RE. Les résultats n'étaient pas exploitables car la protéine Drp1 peut se localiser au niveau de la MME, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique [403]. Une alternative serait de quantifier le taux de protéine DRP1 mitochondriale en analysant les images obtenues après marquage par immunofluorescence de la protéine DRP1 phosphorylée en S616.
- **L'interaction Debcl Drp1.** Debcl et Drp1 doivent interagir pour permettre la fission mitochondriale observée au cours de l'apoptose induite par Rbf1 [355]. Des expériences de CoIP réalisées pour mettre en évidence cette interaction ont été tentées. Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence l'interaction Debcl Drp1 en condition témoin. Des expériences de PLA sont actuellement mises au point pour répondre à cette question.
- **Induction de la fission mitochondriale.** En effet, l'apoptose induite par Rbf1 ou Debcl conduit à une augmentation de la fission mitochondriale [355]. Le réseau mitochondrial est précisément visualisé par le marquage mtKeima. De nombreuses images ont été prises en mtKeima pour évaluer le niveau de mitophagie. Ces images pourront être utilisées pour déterminer s'il y a des modifications de la fission en absence de PINK1. De nombreuses pistes restent à explorer pour mieux appréhender le rôle de PINK1 dans le processus apoptotique.

Le rôle pro apoptotique de PINK1 dans le processus apoptotique passerait par une action au niveau mitochondriale en altérant soit la dynamique mitochondriale soit au niveau des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 30).

c. La mitophagie au cours du processus apoptotique

La fonction pro-mitophagie connue de BNIP3 et PINK1 soulève la question du rôle de la mitophagie dans l'apoptose induite par Rbf1 et *Debcl*.

i. BNIP3 un régulateur de la mitophagie basale

BNIP3 est le plus souvent associé une mitophagie induite par HIF1 ou à une mitophagie développemental au cours de la fécondation. Néanmoins BNIP3 semble impliquée dans la mitophagie basale [404]. Chez la drosophile, la diminution de BNIP3 par CRISPER/Cas9 montre une augmentation de la quantité de mitochondries et souligne ainsi son rôle dans l'élimination mitochondriale [398].

Au cours de nos travaux, nous avons observé que BNIP3 n'est pas responsable de la mitophagie observée en contexte de surexpression de *rbf1* ou *debcl*. Mais une augmentation de la mitophagie est observée lorsque l'on diminue le niveau de BNIP3 par rapport à un témoin sauvage. Ces observations confirment le rôle de BNIP3 dans l'induction de la mitophagie basale. Elles sont en accord avec ce que dit la littérature sur le modèle drosophile. Ce rôle est distinct de sa fonction inhibitrice du processus apoptotique car l'induction de la mitophagie par Rbf1 n'est pas impactée par la perte de BNIP3.

Notre hypothèse est que BNIP3 serait à l'interface de l'apoptose et de la mitophagie en induisant la mitophagie pour limiter l'apoptose induite par Rbf1. Compte tenu des résultats de la littérature il est possible que BNIP3 puisse interagir avec Buffy et avec Beclin 1 (aussi appelée Atg6 chez la drosophile). L'interaction transitoire de BNIP3 et Buffy serait inhibée par Rbf1 qui diminue l'expression de *buffy* permettant une interaction entre BNIP3 et Beclin 1 pour induire une mitophagie protectrice et diminuée l'apoptose induite par Rbf1 (Figure 30).

ii. PINK1 un régulateur de la mitophagie induite par le processus apoptotique

Pour PINK1, de manière surprenante, sa perte augmente la mitophagie. Ce résultat n'est pas un cas isolé. Une étude dans des cellules SH-SY5Y, montre que la diminution de PINK1 induite par RNAi favorise l'autophagie [405]. De même, dans des cellules dopaminergiques de souris MN9D, la diminution de la quantité de PINK1 conduit à une augmentation la mitophagie [406]. Enfin une publication montre que PINK1 peut agir comme un inhibiteur de la mitophagie. La forme cytosolique de PINK1 issue de son clivage mitochondrial peut interagir avec Parkin. Cette interaction pour empêcher la translocation mitochondriale de Parkin [407,408]. Dans ces études PINK1 est un régulateur négatif du stress mitochondrial. Au vu de rôle pro-apoptotiques de PINK1 et de son rôle pro-mitophagie dans l'apoptose induite par Rbf1, il est peu probable que PINK1 inhibe la mitophagie. Sa perte pourrait conduire à une augmentation du stress qui n'est plus pris en charge. Dans ces conditions une mitophagie indépendante de PINK1 serait induite. La perte de PINK1 induirait une voie de mitophagie parallèle pour compenser le stress induit par son absence.

L'apoptose induite par *debcl* ou *rbf1* s'accompagne d'une augmentation de la mitophagie. Dans le cas de *Debcl*, la mitophagie induite est indépendante de PINK1. Une autre protéine est donc responsable de la mitophagie induite par la surexpression de *debcl*. Pour Rbf1, la mitophagie induite est affectée par la perte de PINK1. PINK1 pourrait jouer un double rôle en induisant en parallèle de l'apoptose et de la mitophagie. Une seconde hypothèse est que PINK1 induit une

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

mitophagie nécessaire au processus apoptotique. D'après nos expériences, la perte des protéines Atg n'affecte pas l'apoptose induite par *rbf1*. Cette observation est en faveur de la première hypothèse, PINK1 induirait indépendamment l'apoptose et la mitophagie dans un contexte de surexpression de *rbf1*. Néanmoins, il est important de souligner que, chez les mammifères, les protéines de la famille Atg sont parfois nécessaires à l'induction de l'apoptose [409,410]. La perte de Atg5 ou Atg12 inhibe la mort cellulaire [411,412] et Atg7 peut interagir avec la caspase-9 pour moduler la balance apoptose/autophagie dans des cellules MEFs. Nos études chez la drosophile sont réalisées avec Atg1 et Atg7. Chez la drosophile, la surexpression d'Atg1 induit la mort cellulaire [413]. Pour Atg7 il a été montré qu'elle est requise pour l'apoptose au niveau intestinal [414]. La lignée Atg7 utilisée par l'équipe du professeur Neufeld est un hétérozygote composite qui présente des mutations différentes sur les deux allèles codant Atg7. Dans notre cas, la lignée utilisée est hétérozygote pour la mutation Atg7. Cette différence pourrait expliquer nos résultats non significatifs. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour compléter nos observations. Ces expériences devront être réalisées en utilisant des outils induisant une altération plus forte du processus autophagique.

iii. Deux voies de mitophagies distinctes

Chez les mammifères, une étude montre que BNIP3 protège PINK1 en empêchant son clivage, favorisant ainsi sa relocalisation mitochondriale [170]. Ainsi, dans ce contexte, PINK1 active Parkin pour induire la mitophagie. Une perte de BNIP3 conduit à une diminution de la mitophagie PINK1/Parkin dépendante. Les effets antagonistes, que nous avons observés, de la perte de PINK1 et BNIP3 sur la mitophagie basale semblent exclure la possibilité pour BNIP3 d'induire la mitophagie par l'intermédiaire de PINK1. En effet, la mitophagie augmente suite à la perte de PINK1. Si la mitophagie induite par BNIP3 était dépendante de PINK1, la perte de PINK1 devrait induire une baisse de la mitophagie, comme cela est observé en condition RNAi BNIP3. Il semblerait donc que dans notre système PINK1 et BNIP3 ne collaborent pas pour induire de la mitophagie. À l'inverse, nous pouvons supposer que BNIP3 compenserait le stress induit par la perte de PINK1 en augmentant la mitophagie. Pour mieux caractériser le processus mitophagie que nous observons, il pourrait être intéressant de construire des lignées mutantes pour PINK1 et BNIP3 et observer les conséquences sur la mitophagie basale.

L'étude de la mitophagie a permis de mettre en avant deux systèmes régulateurs de mitophagie distincts. Une première mitophagie basale, induite en partie par BNIP3 et une seconde mitophagie dépendante du stress induit par *Rbf1*, médiée par PINK1 (Figure 30).

d. Parkin une protéine pléiotropique au rôle complexe

Nous avons étudié le rôle éventuel de Parkin dans l'apoptose induite par *rbf1* ou *debcl*. Les premiers résultats, qui restent à confirmer, suggèrent que Parkin module les phénotypes d'ailes induits par *rbf1* et *debcl*. L'étude de l'apoptose a été plus complexe. Les quantifications de l'apoptose dans le disque d'aile semblent montrer que Parkin est impliquée dans l'apoptose induite par *debcl* mais pas dans l'apoptose induite par *rbf1*. Comme présenté en introduction, Parkin peut interagir avec de nombreuses protéines de la famille Bcl-2 pour induire ou inhiber l'apoptose. Nous suspectons donc que Parkin agit au niveau de Debcl pour moduler l'apoptose. Cette modulation est visible uniquement en cas de surexpression de Debcl car la quantité de protéines Debcl est bien plus importante dans ce contexte par rapport à la quantité de Debcl en condition de surexpression de *rbf1*.

Concernant Rbf1, la modulation de phénotype observée pourrait être liée au rôle de Parkin dans la biogenèse mitochondriale (PARIS, Parkin interacting substrate), le cycle cellulaire (induit la dégradation de cycline) ou le métabolisme [185,186]. Nos résultats concernant Parkin doivent être confirmés. En effet, la répétition des expériences de quantification de l'apoptose a montré une diminution de l'apoptose non significative pour deux expériences et une diminution significative pour une troisième. La souche mutante utilisée contient une mutation de *Parkin* létale à l'état homozygote. Les individus testés sont donc hétérozygotes pour la mutation. La copie sauvage de la protéine pourrait être suffisante pour que les fonctions de Parkin soient assurées dans le processus apoptotique. Pour remédier à ce problème, il faudrait utiliser une souche homozygote ou diminuer la quantité de protéine Parkin en exprimant un ARNi Parkin en fond mutant pour Pakin.

La fonction de Parkin dans ce processus est complexe à déterminer. Parkin possède une activité pléiotropique dans les cellules. Elle peut moduler la mitophagie, la prolifération cellulaire, réguler le cycle cellulaire, agir directement sur les protéines impliquées dans le processus apoptotique ou altérer le métabolisme cellulaire. De nombreuses pistes sont à envisager pour pouvoir répondre à la question du rôle de Parkin dans le processus induit par la surexpression de *rbf1* ou *debcl*.

e. PINK1 prend son indépendance

i. Une fonction indépendante de la mitophagie

Au vu de ces résultats, l'action de PINK1 sur l'apoptose induite par Rbf1 ou Debcl ne semble pas dépendre de son action sur la mitophagie. Un certain nombre d'études montrent que PINK1 présente des fonctions indépendantes de la mitophagie [415–417]. Si la fonction la plus étudiée de PINK1 est l'induction de la mitophagie, il a été montré que PINK1 régule d'autres fonctions cellulaires. La régulation de l'apoptose comme citée plus haut. PINK1 phosphoryle Bcl-xL, empêchant le clivage de cette protéine anti-apoptotique et protégeant ainsi de la mort cellulaire, indépendamment de la mitophagie [203]. Il a également été observé à de nombreuses reprises des diminutions de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans le modèle murin mutant pour la protéine PINK1 [415–417]. Plus spécifiquement, une étude chez des souris mutées pour PINK1 montre une diminution de la phosphorylation d'une sous-unité du complexe 1 (NdufA10) altérant la fonction du complexe [418]. De plus, PINK1 pourrait également être impliquée dans le

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

transport mitochondrial [204]. PINK1 interagit avec la protéine Miro et induit une dérégulation de la protéine conduisant à une diminution du transport mitochondrial au niveau axonale [419]. La capacité de PINK1 à phosphoryler DRP1 est aussi importante car le transport mitochondrial requiert l'isolement d'une section mitochondriale par fission [80]. Enfin PINK1 pourrait largement impacter la cellule, car elle est capable d'activer le facteur de transcription p53 dans des cellules cancéreuses [371]. Ces exemples montrent bien que PINK1 remplit des rôles distincts de la mitophagie. Ces éléments sont cohérents avec la possibilité pour PINK1 d'induire l'apoptose et la mitophagie.

ii. Une fonction indépendante de Parkin

PINK1 module l'apoptose induite par *rbf1* alors que Parkin ne semble pas moduler le taux d'apoptose. On peut donc supposer qu'au cours de cette apoptose, l'activation de Parkin par PINK1 n'est pas requise pour diminuer le taux d'apoptose. Cette observation est cohérente avec notre hypothèse : PINK1 pourrait exercer son action pro-apoptotique indépendamment de la mitophagie. Un nombre croissant d'études comme cité plus haut, identifient des régulations induites par PINK1 et indépendante de Parkin. Chez la drosophile notamment, PINK1 agirait en amont de HtrA2, une protéine inhibitrice de IAP, donc pro-apoptotique pour la protection neuronale [218]. Cette activité est justement indépendante de Parkin.

Le rôle de PINK1 au cours du processus apoptotique induit par Rbf1 semble ainsi indépendant de sa fonction pro-mitophagie, mais aussi de son partenaire Parkin, soulignant le rôle complexe de PINK1 dans la régulation des processus cellulaires.

2. Les partenaires de Debcl

a. Drp1 et la balance mitophagie apoptose

La seule régulation transcriptionnelle que nous avons observée est une diminution de l'expression de *Drp1* induite par la surexpression de *rbf1*. Cette régulation négative, directe ou indirecte, est inattendue. Drp1 est nécessaire au processus apoptotique induit par *rbf1* [355] donc la diminution de quantité de la protéine pourrait conduire à une diminution de la fission ce qui n'est pas observée.

Chez le mammifère, DRP1 est un régulateur de la balance apoptose mitophagie, notamment dans le tissu embryonnaire en développement [349]. Il est montré que la quantité de Drp1 régule la capacité des cellules souches à entrer en apoptose en favorisant la mitophagie. En revanche, au cours de la différenciation, le niveau de DRP1 est réduit, on observe un faible taux de fission mitochondriale et une baisse de mitophagie qui facilitent l'apoptose. Un taux élevé de DRP1 favorise donc la mitophagie alors qu'une baisse de l'activité de DRP1 sensibilise les cellules à l'apoptose [349]. Dans ces conditions, la surexpression de *rbf1*, en diminuant l'expression de *Drp1*, pourrait sensibiliser les cellules à l'apoptose. De plus, une étude a montré par co-immunoprécipitation que l'induction de la nécroptose par le calcium dans les hépatocytes conduit à une interaction physique entre les protéines DRP1 et pRb au niveau mitochondrial [420]. Cette observation ouvre une autre piste pour expliquer la régulation par pRb de l'activité de DRP1, à un niveau post transcriptionnelle cette fois.

Ces résultats inattendus montrent qu'en plus de *buffy*, *Rbf1* pourrait également induire une répression de *drp1* au cours du processus apoptotique. Déterminer si cette répression est directement induite par *Rbf1* sera la prochaine étape pour comprendre le mécanisme.

b. Turbo-ID une autre approche

Pour pousser plus loin l'étude des protéines de la famille Bcl-2, nous avons choisi d'étudier l'interactome de Debcl. Pour ce faire, des souches présentant une protéine recombinante Debcl couplée à la protéine biotinyllante Turbo-ID ont été construites. Les protéines proches de Debcl seront biotinyllées, isolées grâce à la streptavidine et identifiées par spectroscopie de masse. La validation des souches transgéniques Turbo-ID que j'ai générées nécessitent encore des étapes de validation. Pour l'instant, seules les souches présentant un insert sur le chromosome III ont été testées. Nous sommes en train de poursuivre en utilisant les souches possédant une insertion sur le chromosome II.

Les premiers résultats obtenus, notamment par marquage à l'aide d'un anti-DCP1 clivé, d'un anti-Biotine et d'un anti-V5, suggèrent que notre construction TurboD-Debcl n'induit pas d'apoptose. Ces résultats étaient inattendus, car jusqu'à présent, la surexpression de deux copies de *debcl* était nécessaire pour observer une induction d'apoptose. Cela permet de synthétiser une quantité de Debcl plus importante. Les croisements nécessaires pour obtenir une souche exprimant deux copies du transgène sont en cours de réalisation. Nous espérons ainsi induire de l'apoptose dans ce contexte génétique. Une fois ces souches validées, nous pourrons réaliser des

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

expériences pour identifier les protéines qui interagissent avec Debcl et confirmer, ou non, le rôle de PINK1 dans la modulation de ces interactions.

L'utilisation de cette souche ne se limitera pas à l'étude du rôle de PINK1. Elle nous permettra de mieux comprendre la régulation induite par Debcl chez la drosophile. Nous pourrons notamment comparer les interactions de Debcl dans différents tissus comme le tissu en prolifération du disque d'aile ou des tissus différenciés comme les neurones.

Pour conclure, la construction turbo ID est terminée. Les validations nécessaires à son utilisation sont en cours. Une fois la mise au point terminée nous commencerons à analyser les protéines interagissant potentiellement avec Debcl.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif de ma thèse était de mieux caractériser, chez la drosophile, les interactions entre les voies de mitophagie et la voie d'apoptose induite par Rbf1. Cette dernière implique Debcl, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2. En travaillant sur ce projet, nous avons pu mettre en évidence différents événements qui ont lieu au cours du processus apoptotique.

Dans le contexte de surexpression de Rbf1 ou de Debcl au niveau du disque imaginal d'aile larvaire, PINK1 apparaît comme une protéine pro-mitophagie et pro-apoptotique en agissant sur des voies parallèles. La mitophagie induite par Rbf1 est en partie contrôlée par PINK1. L'apoptose induite semble indépendante de Parkin et la protéine PINK1 interviendrait au niveau ou en aval de Debcl au cours du processus apoptotique. Nous cherchons à présent à caractériser la fonction de PINK1 dans le processus apoptotique induit par Debcl ou Rbf1.

Le second inducteur de mitophagie que j'ai étudié est BNIP3. Il est important pour la mitophagie basale indépendante de PINK1 et Parkin qui pourraient faire intervenir Beclin 1 (Atg6 chez la drosophile). BNIP3 est un régulateur négatif de l'apoptose induit par Rbf1. Cette régulation passe potentiellement par une interaction avec les protéines de la famille Bcl-2. BNIP3 pourrait jouer un rôle indépendant de l'apoptose en modulant le stress du Réticulum Endoplasmique induit par la surexpression de Debcl. Identifier une possible modulation du stress du RE en condition de déplétion de BNIP3 est le prochain objectif relatif à cet aspect du projet.

Concernant le facteur pro-fission Drp1, la diminution du niveau de son transcrite en contexte de surexpression *rbf1* pose de nombreuses questions. Il serait intéressant de mesurer la fission du réseau mitochondriale dans ces conditions. Il serait également informatif de rechercher si cette régulation est également observée en condition de surexpression de *debcl*.

Enfin les derniers tests nécessaires pour valider l'outil Turbo Debcl sont en cours. En plus des expériences de validation, des croisements doivent être effectués pour permettre de contrôler l'outil afin de l'utiliser à son plein potentiel.

L'ensemble de ces résultats a permis de progresser dans l'identification des acteurs de la mitophagie qui interagissent avec l'apoptose dans ce modèle. Toutefois, ils ne permettent pas d'identifier clairement les mécanismes sous-jacents aux liens apoptose/mitophagie mis en évidence. Néanmoins, il ne fait aucun doute que ces liens sont forts et jouent un rôle particulièrement important dans la régulation des fonctions cellulaires et le développement de l'organisme. Approfondir ces questions présenterait un réel intérêt. Les techniques et outils mis en place au cours de ma thèse permettront de répondre à une partie des questions soulevées par nos observations.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kölliker, A. *Zeitschrift Für Wissenschaftliche Zoologie*; Wilhelm Engelmann: Leipzig, 1857; Vol. 8, pp. 1–582;.
2. Altmann, R. *Die Elementarorganismen Und Ihre Beziehungen Zu Den Zellen*; 1. Auflage.; Veit: Leipzig, 1890;
3. Benda, C. *Ueber Die Spermatogeneses Der Vertebraten Und Höherer Evartabratem. II. Theol:Die Hisotigenese Der Spermien.*; Archiv für Physiologie; Veit & Comp: Leipzig, 1898; Vol. 1898, pp. 1–588;.
4. Schimper, A.F.W. Ueber Die Entwicklung Der Chlorophyllköner and Farbkörper. *Botanische Zeitung* 1883.
5. Portier, P. *Les Symbiotes. Paris, France : Masson et Cie. 1918.*
6. Palade, G.E. The Fine Structure of Mitochondria. *The Anatomical Record* **1952**, *114*, 427–451, doi:10.1002/ar.1091140304.
7. Ernster, L.; Schatz, G. Mitochondria: A Historical Review. *Journal of Cell Biology* **1981**, *91*, 227s–255s, doi:10.1083/jcb.91.3.227s.
8. *General Cytology: A Textbook of Cellular Structure and Function for Students of Biology and Medicine*; Cowdry, E.V., Ed.; University of Chicago Press: Chicago, IL, 2014; ISBN 978-0-226-25125-7.
9. Sjöstrand, F.S. Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes: Ultra-Structure of Rod-Shaped Mitochondria. *Nature* **1953**, *171*, 30–31, doi:10.1038/171030a0.
10. Bridge, D.; Cunningham, C.W.; Schierwater, B.; DeSalle, R.; Buss, L.W. Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Evidence from Mitochondrial Genome Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 8750–8753.
11. Nass, S.; Nass, M.M.K. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *J Cell Biol* **1963**, *19*, 613–629.
12. Reich, E.; Luck, D.J. Replication and Inheritance of Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1966**, *55*, 1600–1608, doi:10.1073/pnas.55.6.1600.
13. Schatz, G.; Haslbrunner, E.; Tuppy, H. DEOXYRIBONUCLEIC ACID ASSOCIATED WITH YEAST MITOCHONDRIA. *Biochem Biophys Res Commun* **1964**, *15*, 127–132, doi:10.1016/0006-291x(64)90311-0.
14. 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.; et al. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* **1981**, *290*, 457–465, doi:10.1038/290457a0.

BIBLIOGRAPHIE

15. Barshad, G.; Marom, S.; Cohen, T.; Mishmar, D. Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective. *Trends in Genetics* **2018**, *34*, 682–692, doi:10.1016/j.tig.2018.05.009.
16. Kühlbrandt, W. Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes. *BMC Biology* **2015**, *13*, 89, doi:10.1186/s12915-015-0201-x.
17. Protasoni, M.; Zeviani, M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**.
18. Chacinska, A.; Koehler, C.M.; Milenkovic, D.; Lithgow, T.; Pfanner, N. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* **2009**, *138*, 628–644, doi:10.1016/j.cell.2009.08.005.
19. Kagan, V.E.; Tyurin, V.A.; Jiang, J.; Tyurina, Y.Y.; Ritov, V.B.; Amoscato, A.A.; Osipov, A.N.; Belikova, N.A.; Kapralov, A.A.; Kini, V.; et al. Cytochrome c Acts as a Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors. *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 223–232, doi:10.1038/nchembio727.
20. Paradies, G.; Paradies, V.; De Benedictis, V.; Ruggiero, F.M.; Petrosillo, G. Functional Role of Cardiolipin in Mitochondrial Bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1837*, 408–417, doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.006.
21. Bustillo-Zabalbeitia, I.; Montessuit, S.; Raemy, E.; Basañez, G.; Terrones, O.; Martinou, J.-C. Specific Interaction with Cardiolipin Triggers Functional Activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* **2014**, *9*, e102738, doi:10.1371/journal.pone.0102738.
22. Herrmann, J.M.; Bihlmaier, K.; Mesecke, N. 13 - The Role of the Mia40-Erv1 Disulfide Relay System in Import and Folding of Proteins of the Intermembrane Space of Mitochondria. In *The Enzymes*; Dalbey, R.E., Koehler, C.M., Tamanoi, F., Eds.; Molecular Machines Involved in Protein Transport across Cellular Membranes; Academic Press, 2007; Vol. 25, pp. 345–366.
23. Colina-Tenorio, L.; Horten, P.; Pfanner, N.; Rampelt, H. Shaping the Mitochondrial Inner Membrane in Health and Disease. *Journal of Internal Medicine* **2020**, *287*, 645–664, doi:10.1111/joim.13031.
24. Zorova, L.D.; Popkov, V.A.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N.; Pevzner, I.B.; Jankauskas, S.S.; Babenko, V.A.; Zorov, S.D.; Balakireva, A.V.; Juhaszova, M.; et al. Mitochondrial Membrane Potential. *Anal Biochem* **2018**, *552*, 50–59, doi:10.1016/j.ab.2017.07.009.
25. Miller, K.E.; Sheetz, M.P. Axonal Mitochondrial Transport and Potential Are Correlated. *J Cell Sci* **2004**, *117*, 2791–2804, doi:10.1242/jcs.01130.
26. Vafaj, S.B.; Mootha, V.K. Mitochondrial Disorders as Windows into an Ancient Organelle. *Nature* **2012**, *491*, 374–383, doi:10.1038/nature11707.
27. Bogorodskiy, A.; Okhrimenko, I.; Burkatovskii, D.; Jakobs, P.; Maslov, I.; Gordeliy, V.; Dencher, N.A.; Gensch, T.; Voos, W.; Altschmied, J.; et al. Role of Mitochondrial Protein Import in Age-Related Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 3528, doi:10.3390/cells10123528.

28. Krimmer, T.; Rapaport, D.; Ryan, M.T.; Meisinger, C.; Kassenbrock, C.K.; Blachly-Dyson, E.; Forte, M.; Douglas, M.G.; Neupert, W.; Nargang, F.E.; et al. Biogenesis of Porin of the Outer Mitochondrial Membrane Involves an Import Pathway via Receptors and the General Import Pore of the Tom Complex. *J Cell Biol* **2001**, *152*, 289–300.
29. Colombini, M. Voltage Gating in the Mitochondrial Channel, VDAC. *J Membr Biol* **1989**, *111*, 103–111, doi:10.1007/BF01871775.
30. Ryan, M.T.; Müller, H.; Pfanner, N. Functional Staging of ADP/ATP Carrier Translocation across the Outer Mitochondrial Membrane*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 20619–20627, doi:10.1074/jbc.274.29.20619.
31. Kozjak, V.; Wiedemann, N.; Milenkovic, D.; Lohaus, C.; Meyer, H.E.; Guiard, B.; Meisinger, C.; Pfanner, N. An Essential Role of Sam50 in the Protein Sorting and Assembly Machinery of the Mitochondrial Outer Membrane. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 48520–48523, doi:10.1074/jbc.C300442200.
32. Deshaies, R.J.; Koch, B.D.; Werner-Washburne, M.; Craig, E.A.; Schekman, R. A Subfamily of Stress Proteins Facilitates Translocation of Secretory and Mitochondrial Precursor Polypeptides. *Nature* **1988**, *332*, 800–805, doi:10.1038/332800a0.
33. Murakami, H.; Pain, D.; Blobel, G. 70-kD Heat Shock-Related Protein Is One of at Least Two Distinct Cytosolic Factors Stimulating Protein Import into Mitochondria. *J Cell Biol* **1988**, *107*, 2051–2057, doi:10.1083/jcb.107.6.2051.
34. Endo, T.; Yamano, K. Transport of Proteins across or into the Mitochondrial Outer Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2010**, *1803*, 706–714, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.11.007.
35. Bolender, N.; Sickmann, A.; Wagner, R.; Meisinger, C.; Pfanner, N. Multiple Pathways for Sorting Mitochondrial Precursor Proteins. *EMBO reports* **2008**, *9*, 42–49, doi:10.1038/sj.embor.7401126.
36. Curran, S.P.; Leuenberger, D.; Oppliger, W.; Koehler, C.M. The Tim9p–Tim10p Complex Binds to the Transmembrane Domains of the ADP/ATP Carrier. *The EMBO Journal* **2002**, *21*, 942–953, doi:10.1093/emboj/21.5.942.
37. Wiedemann, N.; Pfanner, N.; Chacinska, A. Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space. *Molecular Cell* **2006**, *21*, 145–148, doi:10.1016/j.molcel.2006.01.001.
38. Gomkale, R.; Linden, A.; Neumann, P.; Schendzielorz, A.B.; Stoldt, S.; Dybkov, O.; Kilisch, M.; Schulz, C.; Cruz-Zaragoza, L.D.; Schwappach, B.; et al. Mapping Protein Interactions in the Active TOM-TIM23 Supercomplex. *Nat Commun* **2021**, *12*, 5715, doi:10.1038/s41467-021-26016-1.
39. Sirrenberg, C.; Bauer, M.F.; Guiard, B.; Neupert, W.; Brunner, M. Import of Carrier Proteins into the Mitochondrial Inner Membrane Mediated by Tim22. *Nature* **1996**, *384*, 582–585, doi:10.1038/384582a0.
40. Kovermann, P.; Truscott, K.N.; Guiard, B.; Rehling, P.; Sepuri, N.B.; Müller, H.; Jensen, R.E.; Wagner, R.; Pfanner, N. Tim22, the Essential Core of the Mitochondrial Protein Insertion Complex,

BIBLIOGRAPHIE

Forms a Voltage-Activated and Signal-Gated Channel. *Molecular Cell* **2002**, *9*, 363–373, doi:10.1016/S1097-2765(02)00446-X.

41. Duchen, M.R. Mitochondria and Calcium: From Cell Signalling to Cell Death. *J Physiol* **2000**, *529*, 57–68, doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x.

42. Carafoli, E. The Interplay of Mitochondria with Calcium: An Historical Appraisal. *Cell Calcium* **2012**, *52*, 1–8, doi:10.1016/j.ceca.2012.02.007.

43. Baughman, J.M.; Perocchi, F.; Girgis, H.S.; Plovanich, M.; Belcher-Timme, C.A.; Sancak, Y.; Bao, X.R.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R.L.; et al. Integrative Genomics Identifies MCU as an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 341–345, doi:10.1038/nature10234.

44. De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 336–340, doi:10.1038/nature10230.

45. Colombini, M. A Candidate for the Permeability Pathway of the Outer Mitochondrial Membrane. *Nature* **1979**, *279*, 643–645, doi:10.1038/279643a0.

46. Dietz, J.V.; Fox, J.L.; Khalimonchuk, O. Down the Iron Path: Mitochondrial Iron Homeostasis and Beyond. *Cells* **2021**, *10*, 2198, doi:10.3390/cells10092198.

47. Gao, J.; Zhou, Q.; Wu, D.; Chen, L. Mitochondrial Iron Metabolism and Its Role in Diseases. *Clinica Chimica Acta* **2021**, *513*, 6–12, doi:10.1016/j.cca.2020.12.005.

48. Kim, H.J.; Khalimonchuk, O.; Smith, P.M.; Winge, D.R. Structure, Function, and Assembly of Heme Centers in Mitochondrial Respiratory Complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2012**, *1823*, 1604–1616, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.04.008.

49. Eaton, S.; Bartlett, K.B.; Pourfarzam, M. Mammalian Mitochondrial β -Oxidation. *Biochemical Journal* **1996**, *320*, 345–357, doi:10.1042/bj3200345.

50. Sweet, S.; Singh, G. Changes in Mitochondrial Mass, Membrane Potential, and Cellular Adenosine Triphosphate Content during the Cell Cycle of Human Leukemic (HL-60) Cells. *J. Cell. Physiol.* **1999**, *180*, 91–96, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<91::AID-JCP10>3.0.CO;2-6.

51. Kidd, T.; Abu-Shumays, R.; Katzen, A.; Sisson, J.C.; Jiménez, G.; Pinchin, S.; Sullivan, W.; Ish-Horowicz, D. The ϵ -Subunit of Mitochondrial ATP Synthase Is Required for Normal Spindle Orientation During the *Drosophila* Embryonic Divisions. *Genetics* **2005**, *170*, 697–708, doi:10.1534/genetics.104.037648.

52. Humeau, J.; Bravo-San Pedro, J.M.; Vitale, I.; Nuñez, L.; Villalobos, C.; Kroemer, G.; Senovilla, L. Calcium Signaling and Cell Cycle: Progression or Death. *Cell Calcium* **2018**, *70*, 3–15, doi:10.1016/j.ceca.2017.07.006.

53. Zimmerman, J.J.; Von Saint André-von Arnim, A.; McLaughlin, J. Cellular Respiration. In *Pediatric Critical Care*; Elsevier, 2011; pp. 1058–1072 ISBN 978-0-323-07307-3.

54. Krauss, S. Mitochondria: Structure and Role in Respiration. *Encyclopedia of life sciences* **2001**, doi:10.1038/npg.els.0001380.

55. Rehling, P.; Model, K.; Brandner, K.; Kovermann, P.; Sickmann, A.; Meyer, H.E.; Kühlbrandt, W.; Wagner, R.; Truscott, K.N.; Pfanner, N. Protein Insertion into the Mitochondrial Inner Membrane by a Twin-Pore Translocase. *Science* **2003**, *299*, 1747–1751, doi:10.1126/science.1080945.
56. O'Malley, J.; Kumar, R.; Inigo, J.; Yadava, N.; Chandra, D. Mitochondrial Stress Response and Cancer. *Trends Cancer* **2020**, *6*, 688–701, doi:10.1016/j.trecan.2020.04.009.
57. Ichim, G.; Lopez, J.; Ahmed, S.U.; Muthalagu, N.; Giampazolias, E.; Delgado, M.E.; Haller, M.; Riley, J.S.; Mason, S.M.; Athineos, D.; et al. Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. *Mol Cell* **2015**, *57*, 860–872, doi:10.1016/j.molcel.2015.01.018.
58. Baumgartner, H.K.; Gerasimenko, J.V.; Thorne, C.; Ferdek, P.; Pozzan, T.; Tepikin, A.V.; Petersen, O.H.; Sutton, R.; Watson, A.J.M.; Gerasimenko, O.V. Calcium Elevation in Mitochondria Is the Main Ca²⁺ Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 20796–20803, doi:10.1074/jbc.M109.025353.
59. Moon, D.-O. Calcium's Role in Orchestrating Cancer Apoptosis: Mitochondrial-Centric Perspective. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 8982, doi:10.3390/ijms24108982.
60. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D.A. Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1863*, 2977–2992, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
61. Fribley, A.; Zhang, K.; Kaufman, R.J. Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response. *Methods Mol Biol* **2009**, *559*, 191–204, doi:10.1007/978-1-60327-017-5_14.
62. Smyrniak, I.; Gray, S.P.; Okonko, D.O.; Sawyer, G.; Zoccarato, A.; Catibog, N.; López, B.; González, A.; Ravassa, S.; Díez, J.; et al. Cardioprotective Effect of the Mitochondrial Unfolded Protein Response During Chronic Pressure Overload. *J Am Coll Cardiol* **2019**, *73*, 1795–1806, doi:10.1016/j.jacc.2018.12.087.
63. Hamacher-Brady, A.; Brady, N.R. Mitophagy Programs: Mechanisms and Physiological Implications of Mitochondrial Targeting by Autophagy. *Cell Mol Life Sci* **2015**, *73*, 775–795, doi:10.1007/s00018-015-2087-8.
64. Barnhart, E.L. Mechanics of Mitochondrial Motility in Neurons. *Current Opinion in Cell Biology* **2016**, *38*, 90–99, doi:10.1016/j.ceb.2016.02.022.
65. Zhao, F.; Wang, Q. The Protective Effect of Peroxiredoxin II on Oxidative Stress Induced Apoptosis in Pancreatic β -Cells. *Cell & Bioscience* **2012**, *2*, 22, doi:10.1186/2045-3701-2-22.
66. Escobar-Henriques, M.; Joaquim, M. Mitofusins: Disease Gatekeepers and Hubs in Mitochondrial Quality Control by E3 Ligases. *Front Physiol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphys.2019.00517.
67. Song, Z.; Ghochani, M.; McCaffery, J.M.; Frey, T.G.; Chan, D.C. Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 3525–3532, doi:10.1091/mbc.E09-03-0252.
68. Frezza, C.; Cipolat, S.; Martins De Brito, O.; Micaroni, M.; Beznoussenko, G.V.; Rudka, T.; Bartoli, D.; Polishuck, R.S.; Danial, N.N.; De Strooper, B.; et al. OPA1 Controls Apoptotic Cristae

BIBLIOGRAPHIE

Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* **2006**, *126*, 177–189, doi:10.1016/j.cell.2006.06.025.

69. Chang, C.-R.; Blackstone, C. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 21583–21587, doi:10.1074/jbc.C700083200.

70. Cribbs, J.T.; Strack, S. Reversible Phosphorylation of Drp1 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Cell Death. *EMBO Rep* **2007**, *8*, 939–944, doi:10.1038/sj.embor.7401062.

71. Taguchi, N.; Ishihara, N.; Jofuku, A.; Oka, T.; Mihara, K. Mitotic Phosphorylation of Dynamin-Related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 11521–11529, doi:10.1074/jbc.M607279200.

72. Smirnova, E.; Griparic, L.; Shurland, D.-L.; van der Bliek, A.M. Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* **2001**, *12*, 2245–2256.

73. Qin, L.; Xi, S. The Role of Mitochondrial Fission Proteins in Mitochondrial Dynamics in Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 14725, doi:10.3390/ijms232314725.

74. Wang, Z.; Jiang, H.; Chen, S.; Du, F.; Wang, X. The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Functions at the Convergence Point of Multiple Necrotic Death Pathways. *Cell* **2012**, *148*, 228–243, doi:10.1016/j.cell.2011.11.030.

75. Chen, K.-H.; Dasgupta, A.; Lin, J.; Potus, F.; Bonnet, S.; Iremonger, J.; Fu, J.; Mewburn, J.; Wu, D.; Dunham-Snary, K.; et al. Epigenetic Dysregulation of the Dynamin-Related Protein 1 Binding Partners MiD49 and MiD51 Increases Mitotic Mitochondrial Fission and Promotes Pulmonary Arterial Hypertension: Mechanistic and Therapeutic Implications. *Circulation* **2018**, *138*, 287–304, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031258.

76. Kamerkar, S.C.; Kraus, F.; Sharpe, A.J.; Pucadyil, T.J.; Ryan, M.T. Dynamin-Related Protein 1 Has Membrane Constricting and Severing Abilities Sufficient for Mitochondrial and Peroxisomal Fission. *Nat Commun* **2018**, *9*, 5239, doi:10.1038/s41467-018-07543-w.

77. Losón, O.C.; Song, Z.; Chen, H.; Chan, D.C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 Mediate Drp1 Recruitment in Mitochondrial Fission. *Mol Biol Cell* **2013**, *24*, 659–667, doi:10.1091/mbc.E12-10-0721.

78. Friedman, J.R.; Lackner, L.L.; West, M.; DiBenedetto, J.R.; Nunnari, J.; Voeltz, G.K. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* **2011**, *334*, 358–362, doi:10.1126/science.1207385.

79. Kleele, T.; Rey, T.; Winter, J.; Zaganelli, S.; Mahecic, D.; Perreten Lambert, H.; Ruberto, F.P.; Nemir, M.; Wai, T.; Pedrazzini, T.; et al. Distinct Fission Signatures Predict Mitochondrial Degradation or Biogenesis. *Nature* **2021**, doi:10.1038/s41586-021-03510-6.

80. Han, H.; Tan, J.; Wang, R.; Wan, H.; He, Y.; Yan, X.; Guo, J.; Gao, Q.; Li, J.; Shang, S.; et al. PINK1 Phosphorylates Drp1S616 to Regulate Mitophagy-Independent Mitochondrial Dynamics. *EMBO Rep* **2020**, e48686, doi:10.15252/embr.201948686.

81. Rana, A.; Oliveira, M.P.; Khamoui, A.V.; Aparicio, R.; Rera, M.; Rossiter, H.B.; Walker, D.W. Promoting Drp1-Mediated Mitochondrial Fission in Midlife Prolongs Healthy Lifespan of *Drosophila Melanogaster*. *Nat Commun* **2017**, *8*, 448, doi:10.1038/s41467-017-00525-4.
82. Ziviani, E.; Tao, R.N.; Whitworth, A.J. *Drosophila* Parkin Requires PINK1 for Mitochondrial Translocation and Ubiquitinates Mitofusins. *PNAS* **2010**, *107*, 5018–5023, doi:10.1073/pnas.0913485107.
83. Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A.J.A.; Mohamed, H.; Wikstrom, J.D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S.E.; Katz, S.; Las, G.; et al. Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy. *EMBO J* **2008**, *27*, 433–446, doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
84. Chan, D.C. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annu Rev Pathol* **2020**, *15*, 235–259, doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711.
85. Fu, W.; Liu, Y.; Yin, H. Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem Cells Int* **2019**, *2019*, 9757201, doi:10.1155/2019/9757201.
86. Hu, C.; Huang, Y.; Li, L. Drp1-Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 144, doi:10.3390/ijms18010144.
87. Verstreken, P.; Ly, C.V.; Venken, K.J.T.; Koh, T.-W.; Zhou, Y.; Bellen, H.J. Synaptic Mitochondria Are Critical for Mobilization of Reserve Pool Vesicles at *Drosophila* Neuromuscular Junctions. *Neuron* **2005**, *47*, 365–378, doi:10.1016/j.neuron.2005.06.018.
88. Wang, W.; Yin, J.; Ma, X.; Zhao, F.; Siedlak, S.L.; Wang, Z.; Torres, S.; Fujioka, H.; Xu, Y.; Perry, G.; et al. Inhibition of Mitochondrial Fragmentation Protects against Alzheimer's Disease in Rodent Model. *Hum Mol Genet* **2017**, *26*, 4118–4131, doi:10.1093/hmg/ddx299.
89. Kandimalla, R.; Manczak, M.; Fry, D.; Suneetha, Y.; Sesaki, H.; Reddy, P.H. Reduced Dynamin-Related Protein 1 Protects against Phosphorylated Tau-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage in Alzheimer's Disease. *Hum Mol Genet* **2016**, *25*, 4881–4897, doi:10.1093/hmg/ddw312.
90. Xie, W.; Chung, K.K.K. Alpha-Synuclein Impairs Normal Dynamics of Mitochondria in Cell and Animal Models of Parkinson's Disease. *J Neurochem* **2012**, *122*, 404–414, doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07769.x.
91. Rappold, P.M.; Cui, M.; Grima, J.C.; Fan, R.Z.; de Mesy-Bentley, K.L.; Chen, L.; Zhuang, X.; Bowers, W.J.; Tieu, K. Drp1 Inhibition Attenuates Neurotoxicity and Dopamine Release Deficits in Vivo. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5244, doi:10.1038/ncomms6244.
92. Filichia, E.; Hoffer, B.; Qi, X.; Luo, Y. Inhibition of Drp1 Mitochondrial Translocation Provides Neural Protection in Dopaminergic System in a Parkinson's Disease Model Induced by MPTP. *Sci Rep* **2016**, *6*, 32656, doi:10.1038/srep32656.
93. Portz, P.; Lee, M.K. Changes in Drp1 Function and Mitochondrial Morphology Are Associated with the α -Synuclein Pathology in a Transgenic Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10040885.

BIBLIOGRAPHIE

94. Song, W.; Chen, J.; Petrilli, A.; Liot, G.; Klinglmayr, E.; Zhou, Y.; Poquiz, P.; Tjong, J.; Pouladi, M.A.; Hayden, M.R.; et al. Mutant Huntingtin Binds the Mitochondrial Fission GTPase Dynamin-Related Protein-1 and Increases Its Enzymatic Activity. *Nat Med* **2011**, *17*, 377–382, doi:10.1038/nm.2313.
95. Shirendeb, U.P.; Calkins, M.J.; Manczak, M.; Anekonda, V.; Dufour, B.; McBride, J.L.; Mao, P.; Reddy, P.H. Mutant Huntingtin's Interaction with Mitochondrial Protein Drp1 Impairs Mitochondrial Biogenesis and Causes Defective Axonal Transport and Synaptic Degeneration in Huntington's Disease. *Hum Mol Genet* **2012**, *21*, 406–420, doi:10.1093/hmg/ddr475.
96. Zhao, Y.; Sun, X.; Qi, X. Inhibition of Drp1 Hyperactivation Reduces Neuropathology and Behavioral Deficits in zQ175 Knock-in Mouse Model of Huntington's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *507*, 319–323, doi:10.1016/j.bbrc.2018.11.031.
97. Cha, M.Y.; Chen, H.; Chan, D. Removal of the Mitochondrial Fission Factor Mff Exacerbates Neuronal Loss and Neurological Phenotypes in a Huntington's Disease Mouse Model. *PLoS Curr* **2018**, *10*, ecurrents.hd.a4e15b80c4915c828d39754942c6631f, doi:10.1371/currents.hd.a4e15b80c4915c828d39754942c6631f.
98. Forte, M.; Schirone, L.; Ameri, P.; Basso, C.; Catalucci, D.; Modica, J.; Chimenti, C.; Crotti, L.; Frati, G.; Rubattu, S.; et al. The Role of Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Diseases. *British Journal of Pharmacology* **2021**, *178*, 2060–2076, doi:10.1111/bph.15068.
99. Chen, L.; Gong, Q.; Stice, J.P.; Knowlton, A.A. Mitochondrial OPA1, Apoptosis, and Heart Failure. *Cardiovasc Res* **2009**, *84*, 91–99, doi:10.1093/cvr/cvp181.
100. Bell, M.B.; Bush, Z.; McGinnis, G.R.; Rowe, G.C. Adult Skeletal Muscle Deletion of Mitofusin 1 and 2 Impedes Exercise Performance and Training Capacity. *J Appl Physiol (1985)* **2019**, *126*, 341–353, doi:10.1152/jappphysiol.00719.2018.
101. Romanello, V.; Guadagnin, E.; Gomes, L.; Roder, I.; Sandri, C.; Petersen, Y.; Milan, G.; Masiero, E.; Del Piccolo, P.; Foretz, M.; et al. Mitochondrial Fission and Remodelling Contributes to Muscle Atrophy. *EMBO J* **2010**, *29*, 1774–1785, doi:10.1038/emboj.2010.60.
102. Touvier, T.; De Palma, C.; Rigamonti, E.; Scagliola, A.; Incerti, E.; Mazelin, L.; Thomas, J.-L.; D'Antonio, M.; Politi, L.; Schaeffer, L.; et al. Muscle-Specific Drp1 Overexpression Impairs Skeletal Muscle Growth via Translational Attenuation. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1663, doi:10.1038/cddis.2014.595.
103. Larrea, D.; Pera, M.; Gonnelli, A.; Quintana-Cabrera, R.; Akman, H.O.; Guardia-Laguarta, C.; Velasco, K.R.; Area-Gomez, E.; Dal Bello, F.; De Stefani, D.; et al. MFN2 Mutations in Charcot-Marie-Tooth Disease Alter Mitochondria-Associated ER Membrane Function but Do Not Impair Bioenergetics. *Hum Mol Genet* **2019**, *28*, 1782–1800, doi:10.1093/hmg/ddz008.
104. Züchner, S.; Mersyanova, I.V.; Muglia, M.; Bissar-Tadmouri, N.; Rochelle, J.; Dadali, E.L.; Zappia, M.; Nelis, E.; Patitucci, A.; Senderek, J.; et al. Mutations in the Mitochondrial GTPase Mitofusin 2 Cause Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A. *Nat Genet* **2004**, *36*, 449–451, doi:10.1038/ng1341.
105. Alavi, M.V.; Bette, S.; Schimpf, S.; Schuettauf, F.; Schraermeyer, U.; Wehrl, H.F.; Ruttiger, L.; Beck, S.C.; Tonagel, F.; Pichler, B.J.; et al. A Splice Site Mutation in the Murine Opa1 Gene Features

Pathology of Autosomal Dominant Optic Atrophy. *Brain* **2007**, *130*, 1029–1042, doi:10.1093/brain/awm005.

106. Cohn, A.C.; Toomes, C.; Potter, C.; Towns, K.V.; Hewitt, A.W.; Inglehearn, C.F.; Craig, J.E.; Mackey, D.A. Autosomal Dominant Optic Atrophy: Penetrance and Expressivity in Patients With OPA1 Mutations. *American Journal of Ophthalmology* **2007**, *143*, 656–662.e1, doi:10.1016/j.ajo.2006.12.038.

107. Wang, X.; Su, B.; Siedlak, S.L.; Moreira, P.I.; Fujioka, H.; Wang, Y.; Casadesus, G.; Zhu, X. Amyloid-Beta Overproduction Causes Abnormal Mitochondrial Dynamics via Differential Modulation of Mitochondrial Fission/Fusion Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 19318–19323, doi:10.1073/pnas.0804871105.

108. Wang, X.; Sun, Y.; Han, S.; Wu, C.; Ma, Y.; Zhao, Y.; Shao, Y.; Chen, Y.; Kong, L.; Li, W.; et al. Amyloid Precursor like Protein-1 Promotes JNK-Mediated Cell Migration in *Drosophila*. *Oncotarget* **2017**, *8*, doi:10.18632/oncotarget.17681.

109. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

110. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

111. Yoke Wui Ng, M.; Wai, T.; Simonsen, A. Quality Control of the Mitochondrion. *Developmental Cell* **2021**, *56*, 881–905, doi:10.1016/j.devcel.2021.02.009.

112. Pickles, S.; Vigié, P.; Youle, R.J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology* **2018**, *28*, R170–R185, doi:10.1016/j.cub.2018.01.004.

113. Trempe, J.-F.; Gehring, K. Structural Mechanisms of Mitochondrial Quality Control Mediated by PINK1 and Parkin. *J Mol Biol* **2023**, 168090, doi:10.1016/j.jmb.2023.168090.

114. Spinazzi, M.; De Strooper, B. PARL: The Mitochondrial Rhomboid Protease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2016**, *60*, 19–28, doi:10.1016/j.semcdb.2016.07.034.

115. Deas, E.; Plun-Favreau, H.; Gandhi, S.; Desmond, H.; Kjaer, S.; Loh, S.H.Y.; Renton, A.E.M.; Harvey, R.J.; Whitworth, A.J.; Martins, L.M.; et al. PINK1 Cleavage at Position A103 by the Mitochondrial Protease PARL. *Human Molecular Genetics* **2011**, *20*, 867–879, doi:10.1093/hmg/ddq526.

116. Saita, S.; Nolte, H.; Fiedler, K.U.; Kashkar, H.; Venne, A.S.; Zahedi, R.P.; Krüger, M.; Langer, T. PARL Mediates Smac Proteolytic Maturation in Mitochondria to Promote Apoptosis. *Nat Cell Biol* **2017**, *19*, 318–328, doi:10.1038/ncb3488.

117. Sekine, S.; Kanamaru, Y.; Koike, M.; Nishihara, A.; Okada, M.; Kinoshita, H.; Kamiyama, M.; Maruyama, J.; Uchiyama, Y.; Ishihara, N.; et al. Rhomboid Protease PARL Mediates the Mitochondrial Membrane Potential Loss-Induced Cleavage of PGAM5*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 34635–34645, doi:10.1074/jbc.M112.357509.

118. Gibellini, L.; De Gaetano, A.; Mandrioli, M.; Van Tongeren, E.; Bortolotti, C.A.; Cossarizza, A.; Pinti, M. The Biology of Lonp1: More than a Mitochondrial Protease. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Elsevier, 2020; Vol. 354, pp. 1–61 ISBN 978-0-12-819927-5.

BIBLIOGRAPHIE

119. Fukuda, R.; Zhang, H.; Kim, J.; Shimoda, L.; Dang, C.V.; Semenza, G.L. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* **2007**, *129*, 111–122, doi:10.1016/j.cell.2007.01.047.
120. Tian, Q.; Li, T.; Hou, W.; Zheng, J.; Schrum, L.W.; Bonkovsky, H.L. Lon Peptidase 1 (LONP1)-Dependent Breakdown of Mitochondrial 5-Aminolevulinic Acid Synthase Protein by Heme in Human Liver Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 26424–26430, doi:10.1074/jbc.M110.215772.
121. Greene, A.W.; Grenier, K.; Aguilera, M.A.; Muise, S.; Farazifard, R.; Haque, M.E.; McBride, H.M.; Park, D.S.; Fon, E.A. Mitochondrial Processing Peptidase Regulates PINK1 Processing, Import and Parkin Recruitment. *EMBO reports* **2012**, *13*, 378–385, doi:10.1038/embor.2012.14.
122. Bykov, Y.S.; Rapaport, D.; Herrmann, J.M.; Schuldiner, M. Cytosolic Events in the Biogenesis of Mitochondrial Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **2020**, *45*, 650–667, doi:10.1016/j.tibs.2020.04.001.
123. Sugiura, A.; Yonashiro, R.; Fukuda, T.; Matsushita, N.; Nagashima, S.; Inatome, R.; Yanagi, S. A Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL Controls Cell Toxicity of Polyglutamine-Expanded Protein. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 139–146, doi:10.1016/j.mito.2010.09.001.
124. Csizmadia, T.; Juhász, G. Crinophagy Mechanisms and Its Potential Role in Human Health and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2020; Vol. 172, pp. 239–255 ISBN 978-0-12-822021-4.
125. Weckman, A.; Di Ieva, A.; Rotondo, F.; Syro, L.V.; Ortiz, L.D.; Kovacs, K.; Cusimano, M.D. Autophagy in the Endocrine Glands. *Journal of Molecular Endocrinology* **2013**, *52*, R151–R163, doi:10.1530/JME-13-0241.
126. Chiang, H.-L.; Terlecky, S.R.; Plant, C.P.; Dice, J.F. A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins. *Science* **1989**, *246*, 382–385, doi:10.1126/science.2799391.
127. Bandyopadhyay, U.; Kaushik, S.; Varticovski, L.; Cuervo, A.M. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Molecular and Cellular Biology* **2008**, *28*, 5747–5763, doi:10.1128/MCB.02070-07.
128. Mijaljica, D.; Prescott, M.; Devenish, R. j. Microautophagy in Mammalian Cells: Revisiting a 40-Year-Old Conundrum. *Autophagy* **2011**, *7*, doi:10.4161/auto.7.7.14733.
129. Tsukada, M.; Ohsumi, Y. Isolation and Characterization of Autophagy-Defective Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEBS Lett* **1993**, *333*, 169–174, doi:10.1016/0014-5793(93)80398-e.
130. Kimura, S.; Noda, T.; Yoshimori, T. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *Autophagy* **2007**, *3*, 452–460, doi:10.4161/auto.4451.
131. Wong, A.S.L.; Cheung, Z.H.; Ip, N.Y. Molecular Machinery of Macroautophagy and Its Deregulation in Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2011**, *1812*, 1490–1497, doi:10.1016/j.bbadis.2011.07.005.

132. Morel, E. La formation de l'autophagosome - Un nouveau défi pour le biologiste cellulaire. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33*, 217–220, doi:10.1051/medsci/20173303004.
133. McKnight, N.C.; Zhong, Y.; Wold, M.S.; Gong, S.; Phillips, G.R.; Dou, Z.; Zhao, Y.; Heintz, N.; Zong, W.-X.; Yue, Z. Beclin 1 Is Required for Neuron Viability and Regulates Endosome Pathways via the UVRAG-VPS34 Complex. *PLOS Genetics* **2014**, *10*, e1004626, doi:10.1371/journal.pgen.1004626.
134. Tran, S.; Fairlie, W.D.; Lee, E.F. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells* **2021**, *10*, 1522, doi:10.3390/cells10061522.
135. Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosome Membranes after Processing. *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 5720–5728, doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
136. Burman, J.L.; Pickles, S.; Wang, C.; Sekine, S.; Vargas, J.N.S.; Zhang, Z.; Youle, A.M.; Nezich, C.L.; Wu, X.; Hammer, J.A.; et al. Mitochondrial Fission Facilitates the Selective Mitophagy of Protein Aggregates. *J Cell Biol* **2017**, *216*, 3231–3247, doi:10.1083/jcb.201612106.
137. Ikeda, Y.; Shirakabe, A.; Maejima, Y.; Zhai, P.; Sciarretta, S.; Toli, J.; Nomura, M.; Mihara, K.; Egashira, K.; Ohishi, M.; et al. Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart against Energy Stress. *Circ Res* **2015**, *116*, 264–278, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303356.
138. Tanaka, A.; Cleland, M.M.; Xu, S.; Narendra, D.P.; Suen, D.-F.; Karbowski, M.; Youle, R.J. Proteasome and P97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin. *J Cell Biol* **2010**, *191*, 1367–1380, doi:10.1083/jcb.201007013.
139. Lee, Y.; Lee, H.; Hanna, G.; Gustafsson Mitochondrial Autophagy by Bnip3 Involves Drp1-Mediated Mitochondrial Fission and Recruitment of Parkin in Cardiac Myocytes. **2011**, doi:10.1152/ajpheart.00368.2011.
140. Wu, W.; Lin, C.; Wu, K.; Jiang, L.; Wang, X.; Li, W.; Zhuang, H.; Zhang, X.; Chen, H.; Li, S.; et al. FUNDC1 Regulates Mitochondrial Dynamics at the ER–Mitochondrial Contact Site under Hypoxic Conditions. *EMBO J* **2016**, *35*, 1368–1384, doi:10.15252/embj.201593102.
141. Zimmermann, M.; Reichert, A.S. How to Get Rid of Mitochondria: Crosstalk and Regulation of Multiple Mitophagy Pathways. *Biological Chemistry* **2018**, *399*, 29–45, doi:10.1515/hsz-2017-0206.
142. Li, Y.; Zheng, W.; Lu, Y.; Zheng, Y.; Pan, L.; Wu, X.; Yuan, Y.; Shen, Z.; Ma, S.; Zhang, X.; et al. BNIP3L/NIX-Mediated Mitophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Human Disease. *Cell Death Dis* **2021**, *13*, 1–11, doi:10.1038/s41419-021-04469-y.
143. Novak, I.; Kirkin, V.; McEwan, D.G.; Zhang, J.; Wild, P.; Rozenknop, A.; Rogov, V.; Löhr, F.; Popovic, D.; Occhipinti, A.; et al. Nix Is a Selective Autophagy Receptor for Mitochondrial Clearance. *EMBO Rep* **2010**, *11*, 45–51, doi:10.1038/embo.2009.256.
144. Zhang, J.; Loyd, M.R.; Randall, M.S.; Waddell, M.B.; Kriwacki, R.W.; Ney, P.A. A Short Linear Motif in BNIP3L (NIX) Mediates Mitochondrial Clearance in Reticulocytes. *Autophagy* **2012**, *8*, 1325–1332, doi:10.4161/auto.20764.

BIBLIOGRAPHIE

145. Papandreou, I.; Lim, A.L.; Laderoute, K.; Denko, N.C. Hypoxia Signals Autophagy in Tumor Cells via AMPK Activity, Independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 1572–1581, doi:10.1038/cdd.2008.84.
146. Fei, P.; Wang, W.; Kim, S.; Wang, S.; Burns, T.F.; Sax, J.K.; Buzzai, M.; Dicker, D.T.; McKenna, W.G.; Bernhard, E.J.; et al. Bnip3L Is Induced by P53 under Hypoxia, and Its Knockdown Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 597–609, doi:10.1016/j.ccr.2004.10.012.
147. Yurkova, N.; Shaw, J.; Blackie, K.; Weidman, D.; Jayas, R.; Flynn, B.; Kirshenbaum, L.A. The Cell Cycle Factor E2F-1 Activates Bnip3 and the Intrinsic Death Pathway in Ventricular Myocytes. *Circulation Research* **2008**, *102*, 472–479, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164731.
148. Salvi, M.; Sarno, S.; Cesaro, L.; Nakamura, H.; Pinna, L.A. Extraordinary Pleiotropy of Protein Kinase CK2 Revealed by Weblogo Phosphoproteome Analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2009**, *1793*, 847–859, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.01.013.
149. Chen, G.; Han, Z.; Feng, D.; Chen, Y.; Chen, L.; Wu, H.; Huang, L.; Zhou, C.; Cai, X.; Fu, C.; et al. A Regulatory Signaling Loop Comprising the PGAM5 Phosphatase and CK2 Controls Receptor-Mediated Mitophagy. *Mol Cell* **2014**, *54*, 362–377, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.034.
150. Li, G.; Li, J.; Shao, R.; Zhao, J.; Chen, M. FUNDC1: A Promising Mitophagy Regulator at the Mitochondria-Associated Membrane for Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*.
151. Liu, L.; Feng, D.; Chen, G.; Chen, M.; Zheng, Q.; Song, P.; Ma, Q.; Zhu, C.; Wang, R.; Qi, W.; et al. Mitochondrial Outer-Membrane Protein FUNDC1 Mediates Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 177–185, doi:10.1038/ncb2422.
152. Chen, M.; Chen, Z.; Wang, Y.; Tan, Z.; Zhu, C.; Li, Y.; Han, Z.; Chen, L.; Gao, R.; Liu, L.; et al. Mitophagy Receptor FUNDC1 Regulates Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Autophagy* **2016**, *12*, 689–702, doi:10.1080/15548627.2016.1151580.
153. Pesah, Y.; Pham, T.; Burgess, H.; Middlebrooks, B.; Verstreken, P.; Zhou, Y.; Harding, M.; Bellen, H.; Mardon, G. Drosophila Parkin Mutants Have Decreased Mass and Cell Size and Increased Sensitivity to Oxygen Radical Stress. *Development* **2004**, *131*, 2183–2194, doi:10.1242/dev.01095.
154. Song, S.; Jang, S.; Park, J.; Bang, S.; Choi, S.; Kwon, K.-Y.; Zhuang, X.; Kim, E.; Chung, J. Characterization of PINK1 (PTEN-Induced Putative Kinase 1) Mutations Associated with Parkinson Disease in Mammalian Cells and Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 5660–5672, doi:10.1074/jbc.M112.430801.
155. Bae, Y.-J.; Kang, S.-J.; Park, K.S. Drosophila Melanogaster Parkin Ubiquitinates Peanut and Septin1 as an E3 Ubiquitin-Protein Ligase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2007**, *37*, 430–439, doi:10.1016/j.ibmb.2007.01.007.
156. Chen, G.; Ray, R.; Dubik, D.; Shi, L.; Cizeau, J.; Bleackley, R.C.; Saxena, S.; Gietz, R.D.; Greenberg, A.H. The E1B 19K/Bcl-2-Binding Protein Nip3 Is a Dimeric Mitochondrial Protein That Activates Apoptosis. *J Exp Med* **1997**, *186*, 1975–1983, doi:10.1084/jem.186.12.1975.

157. Kubasiak, L.A.; Hernandez, O.M.; Bishopric, N.H.; Webster, K.A. Hypoxia and Acidosis Activate Cardiac Myocyte Death through the Bcl-2 Family Protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 12825–12830, doi:10.1073/pnas.202474099.
158. Vande Velde, C.; Cizeau, J.; Dubik, D.; Alimonti, J.; Brown, T.; Israels, S.; Hakem, R.; Greenberg, A.H. BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 5454–5468, doi:10.1128/MCB.20.15.5454-5468.2000.
159. Landes, T.; Emorine, L.J.; Courilleau, D.; Rojo, M.; Belenguer, P.; Arnauné-Pelloquin, L. The BH3-Only Bnip3 Binds to the Dynamin Opa1 to Promote Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis by Distinct Mechanisms. *EMBO Rep* **2010**, *11*, 459–465, doi:10.1038/embor.2010.50.
160. Zhu, Y.; Massen, S.; Terenzio, M.; Lang, V.; Chen-Lindner, S.; Eils, R.; Novak, I.; Dikic, I.; Hamacher-Brady, A.; Brady, N.R. Modulation of Serines 17 and 24 in the LC3-Interacting Region of Bnip3 Determines Pro-Survival Mitophagy versus Apoptosis. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 1099–1113, doi:10.1074/jbc.M112.399345.
161. Liu, K.E.; Frazier, W.A. Phosphorylation of the BNIP3 C-Terminus Inhibits Mitochondrial Damage and Cell Death without Blocking Autophagy. *PLoS One* **2015**, *10*, e0129667, doi:10.1371/journal.pone.0129667.
162. Daido, S.; Kanzawa, T.; Yamamoto, A.; Takeuchi, H.; Kondo, Y.; Kondo, S. Pivotal Role of the Cell Death Factor BNIP3 in Ceramide-Induced Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells. *Cancer Res* **2004**, *64*, 4286–4293, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3084.
163. Kanzawa, T.; Zhang, L.; Xiao, L.; Germano, I.M.; Kondo, Y.; Kondo, S. Arsenic Trioxide Induces Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Upregulation of Mitochondrial Cell Death Protein BNIP3. *Oncogene* **2005**, *24*, 980–991, doi:10.1038/sj.onc.1208095.
164. Hanna, R.A.; Quinsay, M.N.; Orogo, A.M.; Giang, K.; Rikka, S.; Gustafsson, Å.B. Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 19094–19104, doi:10.1074/jbc.M111.322933.
165. Quinsay, M.N.; Thomas, R.L.; Lee, Y.; Gustafsson, Å.B. Bnip3-Mediated Mitochondrial Autophagy Is Independent of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Autophagy* **2010**, *6*, 855–862, doi:10.4161/auto.6.7.13005.
166. Sheel, A.; Shao, R.; Brown, C.; Johnson, J.; Hamilton, A.; Sun, D.; Oppenheimer, J.; Smith, W.; Visconti, P.E.; Markstein, M.; et al. Acheron/Larp6 Is a Survival Protein That Protects Skeletal Muscle From Programmed Cell Death During Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*.
167. Schmid, E.T.; Pyo, J.-H.; Walker, D.W. Neuronal Induction of BNIP3-Mediated Mitophagy Slows Systemic Aging in Drosophila. *Nat Aging* **2022**, *2*, 494–507, doi:10.1038/s43587-022-00214-y.
168. Lieber, T.; Jeedigunta, S.P.; Palozzi, J.M.; Lehmann, R.; Hurd, T.R. Mitochondrial Fragmentation Drives Selective Removal of Deleterious mtDNA in the Germline. *Nature* **2019**, *570*, 380–384, doi:10.1038/s41586-019-1213-4.

BIBLIOGRAPHIE

169. Lőw, P.; Varga, Á.; Piracs, K.; Nagy, P.; Szatmári, Z.; Sass, M.; Juhász, G. Impaired Proteasomal Degradation Enhances Autophagy via Hypoxia Signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biology* **2013**, *14*, 29, doi:10.1186/1471-2121-14-29.
170. Zhang, T.; Xue, L.; Li, L.; Tang, C.; Wan, Z.; Wang, R.; Tan, J.; Tan, Y.; Han, H.; Tian, R.; et al. BNIP3 Protein Suppresses PINK1 Kinase Proteolytic Cleavage to Promote Mitophagy. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 21616–21629, doi:10.1074/jbc.M116.733410.
171. Matsumine, H.; Saito, M.; Shimoda-Matsubayashi, S.; Tanaka, H.; Ishikawa, A.; Nakagawa-Hattori, Y.; Yokochi, M.; Kobayashi, T.; Igarashi, S.; Takano, H.; et al. Localization of a Gene for an Autosomal Recessive Form of Juvenile Parkinsonism to Chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* **1997**, *60*, 588–596.
172. Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S.; Yokochi, M.; Mizuno, Y.; Shimizu, N. Mutations in the Parkin Gene Cause Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Nature* **1998**, *392*, 605–608, doi:10.1038/33416.
173. Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, D.-F.; Youle, R.J. Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy. *J Cell Biol* **2008**, *183*, 795–803, doi:10.1083/jcb.200809125.
174. Imai, Y.; Soda, M.; Takahashi, R. Parkin Suppresses Unfolded Protein Stress-Induced Cell Death through Its E3 Ubiquitin-Protein Ligase Activity. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 35661–35664, doi:10.1074/jbc.C000447200.
175. Shimura, H.; Hattori, N.; Kubo, S. i; Mizuno, Y.; Asakawa, S.; Minoshima, S.; Shimizu, N.; Iwai, K.; Chiba, T.; Tanaka, K.; et al. Familial Parkinson Disease Gene Product, Parkin, Is a Ubiquitin-Protein Ligase. *Nat Genet* **2000**, *25*, 302–305, doi:10.1038/77060.
176. Seirafi, M.; Kozlov, G.; Gehring, K. Parkin Structure and Function. *FEBS J* **2015**, *282*, 2076–2088, doi:10.1111/febs.13249.
177. Chaugule, V.K.; Burchell, L.; Barber, K.R.; Sidhu, A.; Leslie, S.J.; Shaw, G.S.; Walden, H. Autoregulation of Parkin Activity through Its Ubiquitin-like Domain. *EMBO J* **2011**, *30*, 2853–2867, doi:10.1038/emboj.2011.204.
178. Kondapalli, C.; Kazlauskaitė, A.; Zhang, N.; Woodroof, H.I.; Campbell, D.G.; Gurlay, R.; Burchell, L.; Walden, H.; Macartney, T.J.; Deak, M.; et al. PINK1 Is Activated by Mitochondrial Membrane Potential Depolarization and Stimulates Parkin E3 Ligase Activity by Phosphorylating Serine 65. *Open Biol* **2012**, *2*, 120080, doi:10.1098/rsob.120080.
179. Trajkovska, M. The Mitochondrial Parkin Receptor Identified. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 578–578, doi:10.1038/ncb2785.
180. Sun, S.; Hou, H.; Ma, G.; Ma, Q.; Li, N.; Zhang, L.; Dong, C.; Cao, M.; Tam, K.Y.; Ying, Z.; et al. The Interaction between E3 Ubiquitin Ligase Parkin and Mitophagy Receptor PHB2 Links Inner Mitochondrial Membrane Ubiquitination to Efficient Mitophagy. *J Biol Chem* **2022**, *298*, 102704, doi:10.1016/j.jbc.2022.102704.

181. Greene, J.C.; Whitworth, A.J.; Kuo, I.; Andrews, L.A.; Feany, M.B.; Pallanck, L.J. Mitochondrial Pathology and Apoptotic Muscle Degeneration in *Drosophila* Parkin Mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 4078–4083, doi:10.1073/pnas.0737556100.
182. Wang, H.; Song, P.; Du, L.; Tian, W.; Yue, W.; Liu, M.; Li, D.; Wang, B.; Zhu, Y.; Cao, C.; et al. Parkin Ubiquitinates Drp1 for Proteasome-Dependent Degradation. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 11649–11658, doi:10.1074/jbc.M110.144238.
183. Gegg, M.E.; Cooper, J.M.; Chau, K.-Y.; Rojo, M.; Schapira, A.H.V.; Taanman, J.-W. Mitofusin 1 and Mitofusin 2 Are Ubiquitinated in a PINK1/Parkin-Dependent Manner upon Induction of Mitophagy. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 4861–4870, doi:10.1093/hmg/ddq419.
184. Basso, V.; Marchesan, E.; Peggion, C.; Chakraborty, J.; von Stockum, S.; Giacomello, M.; Ottolini, D.; Debattisti, V.; Caicci, F.; Tasca, E.; et al. Regulation of ER-Mitochondria Contacts by Parkin via Mfn2. *Pharmacological Research* **2018**, *138*, 43–56, doi:10.1016/j.phrs.2018.09.006.
185. Bernardini, J.P.; Lazarou, M.; Dewson, G. Parkin and Mitophagy in Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1315–1327, doi:10.1038/onc.2016.302.
186. Sarraf, S.A.; Raman, M.; Guarani-Pereira, V.; Sowa, M.E.; Huttlin, E.L.; Gygi, S.P.; Harper, J.W. Landscape of the PARKIN-Dependent Ubiquitylome in Response to Mitochondrial Depolarization. *Nature* **2013**, *496*, 372–376, doi:10.1038/nature12043.
187. Pickrell, A.M.; Youle, R.J. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron* **2015**, *85*, 257–273, doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007.
188. Maruszczak, K.K.; Jung, M.; Rasool, S.; Trempe, J.-F.; Rapaport, D. The Role of the Individual TOM Subunits in the Association of PINK1 with Depolarized Mitochondria. *J Mol Med (Berl)* **2022**, *100*, 747–762, doi:10.1007/s00109-022-02191-6.
189. Jin, S.M.; Lazarou, M.; Wang, C.; Kane, L.A.; Narendra, D.P.; Youle, R.J. Mitochondrial Membrane Potential Regulates PINK1 Import and Proteolytic Destabilization by PARL. *J Cell Biol* **2010**, *191*, 933–942, doi:10.1083/jcb.201008084.
190. Vives-Bauza, C.; Zhou, C.; Huang, Y.; Cui, M.; de Vries, R.L.A.; Kim, J.; May, J.; Tocilescu, M.A.; Liu, W.; Ko, H.S.; et al. PINK1-Dependent Recruitment of Parkin to Mitochondria in Mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 378–383, doi:10.1073/pnas.0911187107.
191. Clark, I.E.; Dodson, M.W.; Jiang, C.; Cao, J.H.; Huh, J.R.; Seol, J.H.; Yoo, S.J.; Hay, B.A.; Guo, M. *Drosophila* Pink1 Is Required for Mitochondrial Function and Interacts Genetically with Parkin. *Nature* **2006**, *441*, 1162–1166, doi:10.1038/nature04779.
192. Yang, Y.; Gehrke, S.; Imai, Y.; Huang, Z.; Ouyang, Y.; Wang, J.-W.; Yang, L.; Beal, M.F.; Vogel, H.; Lu, B. Mitochondrial Pathology and Muscle and Dopaminergic Neuron Degeneration Caused by Inactivation of *Drosophila* Pink1 Is Rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 10793–10798, doi:10.1073/pnas.0602493103.
193. Exner, N.; Treske, B.; Paquet, D.; Holmström, K.; Schiesling, C.; Gispert, S.; Carballo-Carbajal, I.; Berg, D.; Hoepken, H.-H.; Gasser, T.; et al. Loss-of-Function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin. *J Neurosci* **2007**, *27*, 12413–12418, doi:10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007.

BIBLIOGRAPHIE

194. Valente, E.M.; Bentivoglio, A.R.; Dixon, P.H.; Ferraris, A.; Ialongo, T.; Frontali, M.; Albanese, A.; Wood, N.W. Localization of a Novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, PARK6, on Human Chromosome 1p35-P36. *Am J Hum Genet* **2001**, *68*, 895–900.
195. Park, J.; Lee, S.B.; Lee, S.; Kim, Y.; Song, S.; Kim, S.; Bae, E.; Kim, J.; Shong, M.; Kim, J.-M.; et al. Mitochondrial Dysfunction in Drosophila PINK1 Mutants Is Complemented by Parkin. *Nature* **2006**, *441*, 1157–1161, doi:10.1038/nature04788.
196. Ma, P.; Yun, J.; Deng, H.; Guo, M. Atg1-Mediated Autophagy Suppresses Tissue Degeneration in Pink1/Parkin Mutants by Promoting Mitochondrial Fission in Drosophila. *Mol Biol Cell* **2018**, *29*, 3082–3092, doi:10.1091/mbc.E18-04-0243.
197. Park, J.; Lee, G.; Chung, J. The PINK1–Parkin Pathway Is Involved in the Regulation of Mitochondrial Remodeling Process. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *378*, 518–523, doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.086.
198. Chen, Y.; Dorn, G.W. PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science* **2013**, *340*, 471–475, doi:10.1126/science.1231031.
199. Sandebring, A.; Thomas, K.J.; Beilina, A.; Van Der Brug, M.; Cleland, M.M.; Ahmad, R.; Miller, D.W.; Zambrano, I.; Cowburn, R.F.; Behbahani, H.; et al. Mitochondrial Alterations in PINK1 Deficient Cells Are Influenced by Calcineurin-Dependent Dephosphorylation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5701, doi:10.1371/journal.pone.0005701.
200. Li, Y.; Chen, W.; Wang, D. Promotion of Mitochondrial Fragmentation Suppresses the Formation of Mitochondrial Spherical Compartmentation in PINK1B9 Drosophila Melanogaster. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2023**, *676*, 48–57, doi:10.1016/j.bbrc.2023.07.022.
201. Yang, Y.; Ouyang, Y.; Yang, L.; Beal, M.F.; McQuibban, A.; Vogel, H.; Lu, B. Pink1 Regulates Mitochondrial Dynamics through Interaction with the Fission/Fusion Machinery. *PNAS* **2008**, *105*, 7070–7075, doi:10.1073/pnas.0711845105.
202. Deng, H.; Dodson, M.W.; Huang, H.; Guo, M. The Parkinson’s Disease Genes Pink1 and Parkin Promote Mitochondrial Fission and/or Inhibit Fusion in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 14503–14508, doi:10.1073/pnas.0803998105.
203. Arena, G.; Gelmetti, V.; Torosantucci, L.; Vignone, D.; Lamorte, G.; De Rosa, P.; Cilia, E.; Jonas, E.A.; Valente, E.M. PINK1 Protects against Cell Death Induced by Mitochondrial Depolarization, by Phosphorylating Bcl-xL and Impairing Its pro-Apoptotic Cleavage. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 920–930, doi:10.1038/cdd.2013.19.
204. Wang, X.; Winter, D.; Ashrafi, G.; Schlehe, J.; Wong, Y.L.; Selkoe, D.; Rice, S.; Steen, J.; LaVoie, M.J.; Schwarz, T.L. PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* **2011**, *147*, 893–906, doi:10.1016/j.cell.2011.10.018.
205. Yang, W.; Guo, X.; Tu, Z.; Chen, X.; Han, R.; Liu, Y.; Yan, S.; Wang, Q.; Wang, Z.; Zhao, X.; et al. PINK1 Kinase Dysfunction Triggers Neurodegeneration in the Primate Brain without Impacting Mitochondrial Homeostasis. *Protein Cell* **2022**, *13*, 26–46, doi:10.1007/s13238-021-00888-x.

206. Geisler, S.; Holmström, K.M.; Skujat, D.; Fiesel, F.C.; Rothfuss, O.C.; Kahle, P.J.; Springer, W. PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy Is Dependent on VDAC1 and P62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 119–131, doi:10.1038/ncb2012.
207. Haque, M.E.; Thomas, K.J.; S’Souza, C.; Callaghan, S. Cytoplasmic Pink1 Activity Protects Neurons from Dopaminergic Neurotoxin MPTP. *PNAS* **2007**, doi:10.1073/pnas.0705363105.
208. Narendra, D.P.; Jin, S.M.; Tanaka, A.; Suen, D.-F.; Gautier, C.A.; Shen, J.; Cookson, M.R.; Youle, R.J. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biology* **2010**, *8*, e1000298, doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
209. Ge, P.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. PINK1 and Parkin Mitochondrial Quality Control: A Source of Regional Vulnerability in Parkinson’s Disease. *Molecular Neurodegeneration* **2020**, *15*, 20, doi:10.1186/s13024-020-00367-7.
210. Lazarou, M.; Jin, S.M.; Kane, L.A.; Youle, R.J. Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin. *Dev Cell* **2012**, *22*, 320–333, doi:10.1016/j.devcel.2011.12.014.
211. Koyano, F.; Okatsu, K.; Kosako, H.; Tamura, Y.; Go, E.; Kimura, M.; Kimura, Y.; Tsuchiya, H.; Yoshihara, H.; Hirokawa, T.; et al. Ubiquitin Is Phosphorylated by PINK1 to Activate Parkin. *Nature* **2014**, *510*, 162–166, doi:10.1038/nature13392.
212. Okatsu, K.; Koyano, F.; Kimura, M.; Kosako, H.; Saeki, Y.; Tanaka, K.; Matsuda, N. Phosphorylated Ubiquitin Chain Is the Genuine Parkin Receptor. *J Cell Biol* **2015**, *209*, 111–128, doi:10.1083/jcb.201410050.
213. Ordureau, A.; Heo, J.-M.; Duda, D.M.; Paulo, J.A.; Olszewski, J.L.; Yanishevski, D.; Rinehart, J.; Schulman, B.A.; Harper, J.W. Defining Roles of PARKIN and Ubiquitin Phosphorylation by PINK1 in Mitochondrial Quality Control Using a Ubiquitin Replacement Strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 6637–6642, doi:10.1073/pnas.1506593112.
214. Harper, J.W.; Ordureau, A.; Heo, J.-M. Building and Decoding Ubiquitin Chains for Mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 93–108, doi:10.1038/nrm.2017.129.
215. Johansen, T.; Lamark, T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology* **2020**, *432*, 80–103, doi:10.1016/j.jmb.2019.07.016.
216. Peng, H.; Yang, J.; Li, G.; You, Q.; Han, W.; Li, T.; Gao, D.; Xie, X.; Lee, B.-H.; Du, J.; et al. Ubiquitylation of P62/Sequestosome1 Activates Its Autophagy Receptor Function and Controls Selective Autophagy upon Ubiquitin Stress. *Cell Res* **2017**, *27*, 657–674, doi:10.1038/cr.2017.40.
217. Ham, S.J.; Lee, D.; Yoo, H.; Jun, K.; Shin, H.; Chung, J. Decision between Mitophagy and Apoptosis by Parkin via VDAC1 Ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2020**, *117*, 4281–4291, doi:10.1073/pnas.1909814117.
218. Tain, L.; Chowdhury, C.; Tao; Plun-Favreau, P.-F.; N; Lm, M.; J, D.; Aj, W.; N, T. Drosophila HtrA2 Is Dispensable for Apoptosis but Acts Downstream of PINK1 Independently from Parkin Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19282869/> (accessed on 2 December 2020).

BIBLIOGRAPHIE

219. Chen, X.; Wang, Q.; Li, S.; Li, X.-J.; Yang, W. Mitochondrial-Dependent and Independent Functions of PINK1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2022**, *10*.
220. Poole, A.C.; Thomas, R.E.; Andrews, L.A.; McBride, H.M.; Whitworth, A.J.; Pallanck, L.J. The PINK1/Parkin Pathway Regulates Mitochondrial Morphology. *PNAS* **2008**, *105*, 1638–1643, doi:10.1073/pnas.0709336105.
221. Saini, N.; Oelhafen, S.; Hua, H.; Georgiev, O.; Schaffner, W.; Büeler, H. Extended Lifespan of *Drosophila* Parkin Mutants through Sequestration of Redox-Active Metals and Enhancement of Anti-Oxidative Pathways. *Neurobiol Dis* **2010**, *40*, 82–92, doi:10.1016/j.nbd.2010.05.011.
222. Whitworth, A.J.; Lee, J.R.; Ho, V.M.-W.; Flick, R.; Chowdhury, R.; McQuibban, G.A. Rhomboid-7 and HtrA2/Omi Act in a Common Pathway with the Parkinson's Disease Factors Pink1 and Parkin. *Dis Model Mech* **2008**, *1*, 168–174, doi:10.1242/dmm.000109.
223. Yun, J.; Puri, R.; Yang, H.; Lizzio, M.A.; Wu, C.; Sheng, Z.-H.; Guo, M. MUL1 Acts in Parallel to the PINK1/Parkin Pathway in Regulating Mitofusin and Compensates for Loss of PINK1/Parkin. *eLife* **2014**, *3*, doi:10.7554/eLife.01958.
224. Shiba-Fukushima, K.; Ishikawa, K.-I.; Inoshita, T.; Izawa, N.; Takanashi, M.; Sato, S.; Onodera, O.; Akamatsu, W.; Okano, H.; Imai, Y.; et al. Evidence That Phosphorylated Ubiquitin Signaling Is Involved in the Etiology of Parkinson's Disease. *Human Molecular Genetics* **2017**, *26*, 3172–3185, doi:10.1093/hmg/ddx201.
225. Wang, Z.-H.; Clark, C.; Geisbrecht, E.R. *Drosophila* Clueless Is Involved in Parkin-Dependent Mitophagy by Promoting VCP-Mediated Marf Degradation. *Hum Mol Genet* **2016**, *25*, 1946–1964, doi:10.1093/hmg/ddw067.
226. Pirooznia, S.K.; Yuan, C.; Khan, M.R.; Karuppagounder, S.S.; Wang, L.; Xiong, Y.; Kang, S.U.; Lee, Y.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. PARIS Induced Defects in Mitochondrial Biogenesis Drive Dopamine Neuron Loss under Conditions of Parkin or PINK1 Deficiency. *Mol Neurodegener* **2020**, *15*, 17, doi:10.1186/s13024-020-00363-x.
227. Yang, Y.; Ouyang, Y.; Yang, L.; Beal, M.F.; McQuibban, A.; Vogel, H.; Lu, B. Pink1 Regulates Mitochondrial Dynamics through Interaction with the Fission/Fusion Machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 7070–7075, doi:10.1073/pnas.0711845105.
228. Liu, S.; Sawada, T.; Lee, S.; Yu, W.; Silverio, G.; Alapatt, P.; Millan, I.; Shen, A.; Saxton, W.; Kanao, T.; et al. Parkinson's Disease-Associated Kinase PINK1 Regulates Miro Protein Level and Axonal Transport of Mitochondria. *PLoS Genet* **2012**, *8*, e1002537, doi:10.1371/journal.pgen.1002537.
229. Thomas, R.; Andrews, L.; Burman, J.; Lin, W.-Y.; Pallanck, L. PINK1-Parkin Pathway Activity Is Regulated by Degradation of PINK1 in the Mitochondrial Matrix. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004279, doi:10.1371/journal.pgen.1004279.
230. Lee, J.J.; Sanchez-Martinez, A.; Zarate, A.M.; Benincá, C.; Mayor, U.; Clague, M.J.; Whitworth, A.J. Basal Mitophagy Is Widespread in *Drosophila* but Minimally Affected by Loss of Pink1 or Parkin. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1613–1622, doi:10.1083/jcb.201801044.

231. Khalil, B.; El Fissi, N.; Aouane, A.; Cabirol-Pol, M.-J.; Rival, T.; Liévens, J.-C. PINK1-Induced Mitophagy Promotes Neuroprotection in Huntington's Disease. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1617, doi:10.1038/cddis.2014.581.
232. Kim, Y.Y.; Um, J.-H.; Yoon, J.-H.; Kim, H.; Lee, D.-Y.; Lee, Y.J.; Jee, H.J.; Kim, Y.M.; Jang, J.S.; Jang, Y.-G.; et al. Assessment of Mitophagy in Mt-Keima *Drosophila* Revealed an Essential Role of the PINK1-Parkin Pathway in Mitophagy Induction in Vivo. *FASEB J* **2019**, *33*, 9742–9751, doi:10.1096/fj.201900073R.
233. Cornelissen, T.; Vilain, S.; Vints, K.; Gounko, N.; Verstreken, P.; Vandenberghe, W. Deficiency of Parkin and PINK1 Impairs Age-Dependent Mitophagy in *Drosophila*. *eLife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.35878.
234. Srivastav, S.; Singh, S.K.; Yadav, A.K.; Srikrishna, S. Folic Acid Supplementation Ameliorates Oxidative Stress, Metabolic Functions and Developmental Anomalies in a Novel Fly Model of Parkinson's Disease. *Neurochem Res* **2015**, *40*, 1350–1359, doi:10.1007/s11064-015-1598-x.
235. Cackovic, J.; Gutierrez-Luke, S.; Call, G.B.; Juba, A.; O'Brien, S.; Jun, C.H.; Buhlman, L.M. Vulnerable Parkin Loss-of-Function *Drosophila* Dopaminergic Neurons Have Advanced Mitochondrial Aging, Mitochondrial Network Loss and Transiently Reduced Autophagosome Recruitment. *Front Cell Neurosci* **2018**, *12*, 39, doi:10.3389/fncel.2018.00039.
236. Julienne, H.; Buhl, E.; Leslie, D.S.; Hodge, J.J.L. *Drosophila* PINK1 and Parkin Loss-of-Function Mutants Display a Range of Non-Motor Parkinson's Disease Phenotypes. *Neurobiol Dis* **2017**, *104*, 15–23, doi:10.1016/j.nbd.2017.04.014.
237. Doktor, B.; Damulewicz, M.; Krzeptowski, W.; Bednarczyk, B.; Pyza, E. Effects of PINK1 Mutation on Synapses and Behavior in the Brain of *Drosophila Melanogaster*. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* **2018**, *78*, 231–241, doi:10.21307/ane-2018-021.
238. Stanojlovic, M.; Bishnu, A.; Singh, F.; Ganley, I.G. Physiological Functions of Mitophagy. *Current Opinion in Physiology* **2022**, *30*, 100612, doi:10.1016/j.cophys.2022.100612.
239. Hamasaki, M.; Furuta, N.; Matsuda, A.; Nezu, A.; Yamamoto, A.; Fujita, N.; Oomori, H.; Noda, T.; Haraguchi, T.; Hiraoka, Y.; et al. Autophagosomes Form at ER–Mitochondria Contact Sites. *Nature* **2013**, *495*, 389–393, doi:10.1038/nature11910.
240. Allen, G.F.G.; Toth, R.; James, J.; Ganley, I.G. Loss of Iron Triggers PINK1/Parkin-Independent Mitophagy. *EMBO Rep* **2013**, *14*, 1127–1135, doi:10.1038/embor.2013.168.
241. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Montava-Garriga, L.; Ball, G.; Singh, F.; Barini, E.; Muqit, M.M.K.; Brooks, S.P.; Ganley, I.G. Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 439-449.e5, doi:10.1016/j.cmet.2017.12.008.
242. Sun, N.; Yun, J.; Liu, J.; Malide, D.; Liu, C.; Rovira, I.I.; Holmström, K.M.; Fergusson, M.M.; Yoo, Y.H.; Combs, C.A.; et al. Measuring In Vivo Mitophagy. *Molecular Cell* **2015**, *60*, 685–696, doi:10.1016/j.molcel.2015.10.009.
243. Palikaras, K.; Lionaki, E.; Tavernarakis, N. Mechanisms of Mitophagy in Cellular Homeostasis, Physiology and Pathology. *Nat Cell Biol* **2018**, *20*, 1013–1022, doi:10.1038/s41556-018-0176-2.

BIBLIOGRAPHIE

244. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Villarejo-Zori, B.; Ball, G.; Boya, P.; Ganley, I.G. A Comparative Map of Macroautophagy and Mitophagy in the Vertebrate Eye. *Autophagy* **2019**, *15*, 1296–1308, doi:10.1080/15548627.2019.1580509.
245. McWilliams, T.G.; Prescott, A.R.; Allen, G.F.G.; Tamjar, J.; Munson, M.J.; Thomson, C.; Muqit, M.M.K.; Ganley, I.G. Mito-QC Illuminates Mitophagy and Mitochondrial Architecture in Vivo. *The Journal of cell biology* **2016**, doi:10.1083/jcb.201603039.
246. Gottlieb, R.A.; Bernstein, D. Mitochondria Shape Cardiac Metabolism. *Science* **2015**, *350*, 1162–1163, doi:10.1126/science.aad8222.
247. Stanley, W.C.; Recchia, F.A.; Lopaschuk, G.D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev* **2005**, *85*, 1093–1129, doi:10.1152/physrev.00006.2004.
248. Gong, G.; Song, M.; Csordas, G.; Kelly, D.P.; Matkovich, S.J.; Dorn, G.W. Parkin-Mediated Mitophagy Directs Perinatal Cardiac Metabolic Maturation in Mice. *Science* **2015**, *350*, aad2459, doi:10.1126/science.aad2459.
249. Grosso, R.; Fader, C.M.; Colombo, M.I. Autophagy: A Necessary Event during Erythropoiesis. *Blood Reviews* **2017**, *31*, 300–305, doi:10.1016/j.blre.2017.04.001.
250. Sato, M.; Sato, K. Degradation of Paternal Mitochondria by Fertilization-Triggered Autophagy in *C. Elegans* Embryos. *Science* **2011**, *334*, 1141–1144, doi:10.1126/science.1210333.
251. Sutovsky, P.; Van Leyen, K.; McCauley, T.; Day, B.N.; Sutovsky, M. Degradation of Paternal Mitochondria after Fertilization: Implications for Heteroplasmy, Assisted Reproductive Technologies and mtDNA Inheritance. *Reprod Biomed Online* **2004**, *8*, 24–33, doi:10.1016/s1472-6483(10)60495-6.
252. Al Rawi, S.; Louvet-Vallée, S.; Djeddi, A.; Sachse, M.; Culetto, E.; Hajjar, C.; Boyd, L.; Legouis, R.; Galy, V. Allophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 421–423, doi:10.4161/auto.19242.
253. Sutovsky, P.; Song, W.-H. Post-Fertilisation Sperm Mitophagy: The Tale of Mitochondrial Eve and Steve. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 56, doi:10.1071/RD17364.
254. Eiyama, A.; Kondo-Okamoto, N.; Okamoto, K. Mitochondrial Degradation during Starvation Is Selective and Temporally Distinct from Bulk Autophagy in Yeast. *FEBS Letters* **2013**, *587*, 1787–1792, doi:10.1016/j.febslet.2013.04.030.
255. Schofield, J.H.; Schafer, Z.T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitophagy: A Complex and Nuanced Relationship. *Antioxidants & Redox Signaling* **2021**, *34*, 517–530, doi:10.1089/ars.2020.8058.
256. Madhu, V.; Boneski, P.K.; Silagi, E.; Qiu, Y.; Kurland, I.; Guntur, A.R.; Shapiro, I.M.; Risbud, M.V. Hypoxic Regulation of Mitochondrial Metabolism and Mitophagy in Nucleus Pulposus Cells Is Dependent on HIF-1 α -BNIP3 Axis. *Journal of Bone and Mineral Research* **2020**, *35*, 1504–1524, doi:10.1002/jbmr.4019.
257. Devi, L.; Raghavendran, V.; Prabhu, B.M.; Avadhani, N.G.; Anandatheerthavarada, H.K. Mitochondrial Import and Accumulation of α -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic

Neuronal Cultures and Parkinson Disease *Brain. J Biol Chem* **2008**, *283*, 9089–9100, doi:10.1074/jbc.M710012200.

258. Hansson Petersen, C.A.; Alikhani, N.; Behbahani, H.; Wiehager, B.; Pavlov, P.F.; Alafuzoff, I.; Leinonen, V.; Ito, A.; Winblad, B.; Glaser, E.; et al. The Amyloid β -Peptide Is Imported into Mitochondria via the TOM Import Machinery and Localized to Mitochondrial Cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 13145–13150, doi:10.1073/pnas.0806192105.

259. Orr, A.L.; Li, S.; Wang, C.-E.; Li, H.; Wang, J.; Rong, J.; Xu, X.; Mastroberardino, P.G.; Greenamyre, J.T.; Li, X.-J. N-Terminal Mutant Huntingtin Associates with Mitochondria and Impairs Mitochondrial Trafficking. *J Neurosci* **2008**, *28*, 2783–2792, doi:10.1523/JNEUROSCI.0106-08.2008.

260. Martinez, J.H.; Alaimo, A.; Gorjod, R.M.; Porte Alcon, S.; Fuentes, F.; Coluccio Leskow, F.; Kotler, M.L. Drp-1 Dependent Mitochondrial Fragmentation and Protective Autophagy in Dopaminergic SH-SY5Y Cells Overexpressing Alpha-Synuclein. *Mol Cell Neurosci* **2018**, *88*, 107–117, doi:10.1016/j.mcn.2018.01.004.

261. Chinta, S.J.; Mallajosyula, J.K.; Rane, A.; Andersen, J.K. Mitochondrial Alpha-Synuclein Accumulation Impairs Complex I Function in Dopaminergic Neurons and Results in Increased Mitophagy in Vivo. *Neurosci Lett* **2010**, *486*, 235–239, doi:10.1016/j.neulet.2010.09.061.

262. Doblado, L.; Lueck, C.; Rey, C.; Samhan-Arias, A.K.; Prieto, I.; Stacchiotti, A.; Monsalve, M. Mitophagy in Human Diseases. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22083903.

263. Koentjoro, B.; Park, J.-S.; Sue, C.M. Nix Restores Mitophagy and Mitochondrial Function to Protect against PINK1/Parkin-Related Parkinson's Disease. *Sci Rep* **2017**, *7*, 44373, doi:10.1038/srep44373.

264. Fang, E.F.; Hou, Y.; Palikaras, K.; Adriaanse, B.A.; Kerr, J.S.; Yang, B.; Lautrup, S.; Hasan-Olive, M.M.; Caponio, D.; Dan, X.; et al. Mitophagy Inhibits Amyloid- β and Tau Pathology and Reverses Cognitive Deficits in Models of Alzheimer's Disease. *Nat Neurosci* **2019**, *22*, 401–412, doi:10.1038/s41593-018-0332-9.

265. Cummins, N.; Tweedie, A.; Zuryn, S.; Bertran-Gonzalez, J.; Götz, J. Disease-associated Tau Impairs Mitophagy by Inhibiting Parkin Translocation to Mitochondria. *EMBO J* **2019**, *38*, e99360, doi:10.15252/embj.201899360.

266. Martinez-Vicente, M.; Tallozy, Z.; Wong, E.; Tang, G.; Koga, H.; Kaushik, S.; de Vries, R.; Arias, E.; Harris, S.; Sulzer, D.; et al. Cargo Recognition Failure Is Responsible for Inefficient Autophagy in Huntington's Disease. *Nat Neurosci* **2010**, *13*, 567–576, doi:10.1038/nn.2528.

267. Rui, Y.-N.; Xu, Z.; Patel, B.; Chen, Z.; Chen, D.; Tito, A.; David, G.; Sun, Y.; Stimming, E.F.; Bellen, H.; et al. Huntingtin Functions as a Scaffold for Selective Macroautophagy. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 262–275, doi:10.1038/ncb3101.

268. Kim, J.; Moody, J.P.; Edgerly, C.K.; Bordiuk, O.L.; Cormier, K.; Smith, K.; Beal, M.F.; Ferrante, R.J. Mitochondrial Loss, Dysfunction and Altered Dynamics in Huntington's Disease. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 3919–3935, doi:10.1093/hmg/ddq306.

BIBLIOGRAPHIE

269. Aman, Y.; Ryan, B.; Torsetnes, S.B.; Knapskog, A.-B.; Watne, L.O.; McEwan, W.A.; Fang, E.F. Enhancing Mitophagy as a Therapeutic Approach for Neurodegenerative Diseases. *Int Rev Neurobiol* **2020**, *155*, 169–202, doi:10.1016/bs.irn.2020.02.008.
270. Sowter, H.M.; Ratcliffe, P.J.; Watson, P.; Greenberg, A.H.; Harris, A.L. HIF-1-Dependent Regulation of Hypoxic Induction of the Cell Death Factors BNIP3 and NIX in Human Tumors¹. *Cancer Research* **2001**, *61*, 6669–6673.
271. Vara-Perez, M.; Felipe-Abrio, B.; Agostinis, P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* **2019**, *8*, 493, doi:10.3390/cells8050493.
272. Denisenko, T.V.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Mitophagy in Carcinogenesis and Cancer Treatment. *Discov Oncol* **2021**, *12*, 58, doi:10.1007/s12672-021-00454-1.
273. Jung, J.; Zhang, Y.; Celiku, O.; Zhang, W.; Song, H.; Williams, B.J.; Giles, A.J.; Rich, J.N.; Abounader, R.; Gilbert, M.R.; et al. Mitochondrial NIX Promotes Tumor Survival in the Hypoxic Niche of Glioblastoma. *Cancer Res* **2019**, *79*, 5218–5232, doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0198.
274. Maes, H.; Van Eygen, S.; Krysko, D.V.; Vandenabeele, P.; Nys, K.; Rillaerts, K.; Garg, A.D.; Verfaillie, T.; Agostinis, P. BNIP3 Supports Melanoma Cell Migration and Vasculogenic Mimicry by Orchestrating the Actin Cytoskeleton. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1127, doi:10.1038/cddis.2014.94.
275. Liu, J.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Yue, X.; Wu, H.; Huang, S.; Chen, J.; Tomskey, K.; Xie, H.; Khella, C.A.; et al. Parkin Targets HIF-1 α for Ubiquitination and Degradation to Inhibit Breast Tumor Progression. *Nat Commun* **2017**, *8*, 1823, doi:10.1038/s41467-017-01947-w.
276. Zhang, J.; Ney, P.A. Role of BNIP3 and NIX in Cell Death, Autophagy, and Mitophagy. *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 939–946, doi:10.1038/cdd.2009.16.
277. Bianconi, E.; Piovesan, A.; Facchin, F.; Beraudi, A.; Casadei, R.; Frabetti, F.; Vitale, L.; Pelleri, M.C.; Tassani, S.; Piva, F.; et al. An Estimation of the Number of Cells in the Human Body. *Annals of Human Biology* **2013**, *40*, 463–471, doi:10.3109/03014460.2013.807878.
278. Madden, S.D.; Donovan, M.; Cotter, T.G. Key Apoptosis Regulating Proteins Are Down-Regulated during Postnatal Tissue Development. *Int J Dev Biol* **2007**, *51*, 415–423, doi:10.1387/ijdb.062263sm.
279. Wood, W.; Martin, P. Macrophage Functions in Tissue Patterning and Disease: New Insights from the Fly. *Developmental Cell* **2017**, *40*, 221–233, doi:10.1016/j.devcel.2017.01.001.
280. Clarke, P.G. Neuron Death in the Developing Avian Isthmo-Optic Nucleus, and Its Relation to the Establishment of Functional Circuitry. *J Neurobiol* **1992**, *23*, 1140–1158, doi:10.1002/neu.480230907.
281. Rogulja-Ortmann, A.; Lüer, K.; Seibert, J.; Rickert, C.; Technau, G.M. Programmed Cell Death in the Embryonic Central Nervous System of *Drosophila Melanogaster*. *Development* **2007**, *134*, 105–116, doi:10.1242/dev.02707.
282. Southwell, D.G.; Paredes, M.F.; Galvao, R.P.; Jones, D.L.; Froemke, R.C.; Sebe, J.Y.; Alfaro-Cervello, C.; Tang, Y.; Garcia-Verdugo, J.M.; Rubenstein, J.L.; et al. Intrinsically Determined Cell Death of Developing Cortical Interneurons. *Nature* **2012**, *491*, 109–113, doi:10.1038/nature11523.

283. Coelho, S.G.; Hearing, V.J. UVA Tanning Is Involved in the Increased Incidence of Skin Cancers in Fair-Skinned Young Women. *Pigment Cell Melanoma Res* **2010**, *23*, 57–63, doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00656.x.
284. Takasawa, R.; Nakamura, H.; Mori, T.; Tanuma, S. Differential Apoptotic Pathways in Human Keratinocyte HaCaT Cells Exposed to UVB and UVC. *Apoptosis* **2005**, *10*, 1121–1130, doi:10.1007/s10495-005-0901-8.
285. Jorgensen, I.; Rayamajhi, M.; Miao, E.A. Programmed Cell Death as a Defence against Infection. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 151–164, doi:10.1038/nri.2016.147.
286. Erekat, N.S. *Apoptosis and Its Role in Parkinson's Disease*; Codon Publications, 2018;
287. Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **1972**, *26*, 239–257.
288. Sulston, J.E.; Schierenberg, E.; White, J.G.; Thomson, J.N. The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Dev Biol* **1983**, *100*, 64–119, doi:10.1016/0012-1606(83)90201-4.
289. Ellis, H.M.; Horvitz, H.R. Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. Elegans*. *Cell* **1986**, *44*, 817–829, doi:10.1016/0092-8674(86)90004-8.
290. Hengartner, M.O.; Ellis, R.E.; Horvitz, H.R. *Caenorhabditis Elegans* Gene Ced-9 Protects Cells from Programmed Cell Death. *Nature* **1992**, *356*, 494–499, doi:10.1038/356494a0.
291. Igney, F.H.; Krammer, P.H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 277–288, doi:10.1038/nrc776.
292. Alnemri, E.S.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **1996**, *87*, 171.
293. Fuentes-Prior, P.; Salvesen, G.S. The Protein Structures That Shape Caspase Activity, Specificity, Activation and Inhibition. *Biochem J* **2004**, *384*, 201–232, doi:10.1042/BJ20041142.
294. Riedl, S.J.; Shi, Y. Molecular Mechanisms of Caspase Regulation during Apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 897–907, doi:10.1038/nrm1496.
295. Kumar, S. Caspase Function in Programmed Cell Death. *Cell Death & Differentiation* **2007**, *14*, 32–43, doi:10.1038/sj.cdd.4402060.
296. Deveraux, Q.L.; Reed, J.C. IAP Family Proteins--Suppressors of Apoptosis. *Genes Dev* **1999**, *13*, 239–252, doi:10.1101/gad.13.3.239.
297. Deveraux, Q.L.; Roy, N.; Stennicke, H.R.; Van Arsdale, T.; Zhou, Q.; Srinivasula, S.M.; Alnemri, E.S.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. IAPs Block Apoptotic Events Induced by Caspase-8 and Cytochrome c by Direct Inhibition of Distinct Caspases. *EMBO J* **1998**, *17*, 2215–2223, doi:10.1093/emboj/17.8.2215.
298. Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* **2000**, *102*, 33–42, doi:10.1016/s0092-8674(00)00008-8.

BIBLIOGRAPHIE

299. Van Loo, G.; Van Gurp, M.; Depuydt, B.; Srinivasula, S.M.; Rodriguez, I.; Alnemri, E.S.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Declercq, W.; Vandenabeele, P. The Serine Protease Omi/HtrA2 Is Released from Mitochondria during Apoptosis. Omi Interacts with Caspase-Inhibitor XIAP and Induces Enhanced Caspase Activity. *Cell Death Differ* **2002**, *9*, 20–26, doi:10.1038/sj.cdd.4400970.
300. Verhagen, A.M.; Ekert, P.G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L.M.; Reid, G.E.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Vaux, D.L. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein That Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **2000**, *102*, 43–53, doi:10.1016/s0092-8674(00)00009-x.
301. Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C.M. Analysis of the Structure, Transcripts, and Protein Products of Bcl-2, the Gene Involved in Human Follicular Lymphoma. *PNAS* **1985**, doi:10.1073/pnas.83.14.5214.
302. Tsujihata, Y.; Croce, C.M. Involvement of the Bcl-2 Gene in Human Follicular Lymphoma. *Science* **1986**.
303. Vaux, D.L.; Cory, S.; Adams, J.M. Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates with c-Myc to Immortalize Pre-B Cells. *Nature* **1988**, *335*, 440–442, doi:10.1038/335440a0.
304. Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 65–80, doi:10.1038/cdd.2017.186.
305. Chen, L.; Willis, S.N.; Wei, A.; Smith, B.J.; Fletcher, J.I.; Hinds, M.G.; Colman, P.M.; Day, C.L.; Adams, J.M.; Huang, D.C.S. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Mol Cell* **2005**, *17*, 393–403, doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030.
306. Czabotar, P.E.; Westphal, D.; Dewson, G.; Ma, S.; Hockings, C.; Fairlie, W.D.; Lee, E.F.; Yao, S.; Robin, A.Y.; Smith, B.J.; et al. Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* **2013**, *152*, 519–531, doi:10.1016/j.cell.2012.12.031.
307. Kluck, R.M.; Bossy-Wetzell, E.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* **1997**, *275*, 1132–1136, doi:10.1126/science.275.5303.1132.
308. Chipuk, J.E.; Kuwana, T.; Bouchier-Hayes, L.; Droin, N.M.; Newmeyer, D.D.; Schuler, M.; Green, D.R. Direct Activation of Bax by P53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* **2004**, *303*, 1010–1014, doi:10.1126/science.1092734.
309. Ray, R.; Chen, G.; Vande Velde, C.; Cizeau, J.; Park, J.H.; Reed, J.C.; Gietz, R.D.; Greenberg, A.H. BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 1439–1448, doi:10.1074/jbc.275.2.1439.
310. Burton, T.R.; Gibson, S.B. The Role of Bcl-2 Family Member BNIP3 in Cell Death and Disease: NIPping at the Heels of Cell Death. *Cell Death Differ* **2009**, *16*, 515–523, doi:10.1038/cdd.2008.185.

311. Ray, R.; Chen, G.; Vande Velde, C.; Cizeau, J.; Park, J.H.; Reed, J.C.; Gietz, R.D.; Greenberg, A.H. BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 1439–1448, doi:10.1074/jbc.275.2.1439.
312. Kang, R.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T.; Tang, D. The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cell Death Differ* **2011**, *18*, 571–580, doi:10.1038/cdd.2010.191.
313. Jenner, A.; Peña-Blanco, A.; Salvador-Gallego, R.; Ugarte-Urbe, B.; Zollo, C.; Ganief, T.; Bierlmeier, J.; Mund, M.; Lee, J.E.; Ries, J.; et al. DRP1 Interacts Directly with BAX to Induce Its Activation and Apoptosis. *The EMBO Journal* **2022**, *41*, e108587, doi:10.15252/embj.2021108587.
314. Milani, M.; Beckett, A.J.; Al-Zabeeby, A.; Luo, X.; Prior, I.A.; Cohen, G.M.; Varadarajan, S. DRP-1 Functions Independently of Mitochondrial Structural Perturbations to Facilitate BH3 Mimetic-Mediated Apoptosis. *Cell Death Discov* **2019**, *5*, 1–11, doi:10.1038/s41420-019-0199-x.
315. Oettinghaus, B.; D’Alonzo, D.; Barbieri, E.; Restelli, L.M.; Savoia, C.; Licci, M.; Tolnay, M.; Frank, S.; Scorrano, L. DRP1-Dependent Apoptotic Mitochondrial Fission Occurs Independently of BAX, BAK and APAF1 to Amplify Cell Death by BID and Oxidative Stress. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1857*, 1267–1276, doi:10.1016/j.bbabi.2016.03.016.
316. Reiter, L.T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila Melanogaster*. *Genome Res* **2001**, *11*, 1114–1125, doi:10.1101/gr.169101.
317. Nitta, Y.; Sugie, A. Studies of Neurodegenerative Diseases Using *Drosophila* and the Development of Novel Approaches for Their Analysis. *Fly (Austin)* **2022**, *16*, 275–298, doi:10.1080/19336934.2022.2087484.
318. Duffy, J.B. GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist’s Swiss Army Knife. *genesis* **2002**, *34*, 1–15, doi:10.1002/gene.10150.
319. Colussi, P.; Quinn, L.; Huang, D.; Coombe, M.; Read, S.; Richardson, H.; Kumar, S. Debcl, a Proapoptotic Bcl-2 Homologue, Is a Component of the *Drosophila Melanogaster* Cell Death Machinery. *J. Cell Biol* **2000**, *148*, 703–714, doi:10.1083/jcb.148.4.703.
320. Igaki, T.; Kanuka, H.; Inohara, N.; Sawamoto, K.; Núñez, G.; Okano, H.; Miura, M. Drob-1, a *Drosophila* Member of the Bcl-2/CED-9 Family That Promotes Cell Death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 662–667.
321. Ikegawa, Y.; Combet, C.; Groussin, M.; Navratil, V.; Safar-Remali, S.; Shiota, T.; Aouacheria, A.; Yoo, S.K. Evidence for Existence of an Apoptosis-Inducing BH3-Only Protein, Sayonara, in *Drosophila*. *EMBO J* **2023**, *42*, e110454, doi:10.15252/embj.2021110454.
322. Quinn, L.; Coombe, M.; Mills, K.; Daish, T.; Colussi, P.; Kumar, S.; Richardson, H. Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 Protein, Has Anti-Apoptotic and Cell Cycle Inhibitory Functions. *EMBO J* **2003**, *22*, 3568–3579, doi:10.1093/emboj/cdg355.
323. Senoo-Matsuda, N.; Igaki, T.; Miura, M. Bax-like Protein Drob-1 Protects Neurons from Expanded Polyglutamine-Induced Toxicity in *Drosophila*. *EMBO J* **2005**, *24*, 2700–2713, doi:10.1038/sj.emboj.7600721.

BIBLIOGRAPHIE

324. Clavier, A.; Rincheval-Arnold, A.; Mignotte, B.; GuénaI, I. Le come-back de la mitochondrie dans l'apoptose chez la drosophile. *Med Sci (Paris)* **2016**, *32*, 478–484, doi:10.1051/medsci/20163205014.
325. Dorstyn, L.; Mills, K.; Lazebnik, Y.; Kumar, S. The Two Cytochrome c Species, DC3 and DC4, Are Not Required for Caspase Activation and Apoptosis in Drosophila Cells. *J Cell Biol* **2004**, *167*, 405–410, doi:10.1083/jcb.200408054.
326. Varkey, J.; Chen, P.; Jemmerson, R.; Abrams, J.M. Altered Cytochrome c Display Precedes Apoptotic Cell Death in Drosophila. *J Cell Biol* **1999**, *144*, 701–710.
327. Wing, J.P.; Schwartz, L.M.; Nambu, J.R. The RHG Motifs of Drosophila Reaper and Grim Are Important for Their Distinct Cell Death-Inducing Abilities. *Mech Dev* **2001**, *102*, 193–203, doi:10.1016/s0925-4773(01)00316-1.
328. Brun, S.; Rincheval, V.; Gaumer, S.; Mignotte, B.; GuénaI, I. Reaper and Bax Initiate Two Different Apoptotic Pathways Affecting Mitochondria and Antagonized by Bcl-2 in Drosophila. *Oncogene* **2002**, *21*, 6458–6470, doi:10.1038/sj.onc.1205839.
329. Hawkins; Yoo; Peterson; Wang; Vernooy; Hay The Drosophila Caspase DRONC Cleaves Following Glutamate or Aspartate and Is Regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, doi:10.1074/jbc.M000869200.
330. Meier, P.; Silke, J.; Leever, S.J.; Evan, G.I. The Drosophila Caspase DRONC Is Regulated by DIAP1. *EMBO J* **2000**, *19*, 598–611, doi:10.1093/emboj/19.4.598.
331. Wilson, R.; Goyal, L.; Ditzel, M.; Zachariou, A.; Baker, D.A.; Agapite, J.; Steller, H.; Meier, P. The DIAP1 RING Finger Mediates Ubiquitination of Dronc and Is Indispensable for Regulating Apoptosis. *Nat Cell Biol* **2002**, *4*, 445–450, doi:10.1038/ncb799.
332. Kanuka, H.; Sawamoto, K.; Inohara, N.; Matsuno, K.; Okano, H.; Miura, M. Control of the Cell Death Pathway by Dapaf-1, a Drosophila Apaf-1/CED-4-Related Caspase Activator. *Mol Cell* **1999**, *4*, 757–769, doi:10.1016/s1097-2765(00)80386-x.
333. Fraser, A.G.; McCarthy, N.J.; Evan, G.I. drICE Is an Essential Caspase Required for Apoptotic Activity in Drosophila Cells. *EMBO J* **1997**, *16*, 6192–6199, doi:10.1093/emboj/16.20.6192.
334. Knudson, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, *68*, 820–823.
335. Huang, H.J.; Yee, J.K.; Shew, J.Y.; Chen, P.L.; Bookstein, R.; Friedmann, T.; Lee, E.Y.; Lee, W.H. Suppression of the Neoplastic Phenotype by Replacement of the RB Gene in Human Cancer Cells. *Science* **1988**, *242*, 1563–1566, doi:10.1126/science.3201247.
336. Du, W.; Pogoriler, J. Retinoblastoma Family Genes. *Oncogene* **2006**, *25*, 5190–5200, doi:10.1038/sj.onc.1209651.
337. Kent, L.N.; Leone, G. The Broken Cycle: E2F Dysfunction in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2019**.

338. Buchkovich, K.; Duffy, L.A.; Harlow, E. The Retinoblastoma Protein Is Phosphorylated during Specific Phases of the Cell Cycle. *Cell* **1989**, *58*, 1097–1105, doi:10.1016/0092-8674(89)90508-4.
339. Jiang, H.; Martin, V.; Gomez-Manzano, C.; Johnson, D.G.; Alonso, M.; White, E.; Xu, J.; McDonnell, T.J.; Shinojima, N.; Fueyo, J. The RB-E2F1 Pathway Regulates Autophagy. *Cancer Res* **2010**, *70*, 7882–7893, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1604.
340. Herrera, R.E.; Sah, V.P.; Williams, B.O.; Mäkelä, T.P.; Weinberg, R.A.; Jacks, T. Altered Cell Cycle Kinetics, Gene Expression, and G1 Restriction Point Regulation in Rb-Deficient Fibroblasts. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 2402–2407, doi:10.1128/MCB.16.5.2402.
341. Sherr, C.J. Principles of Tumor Suppression. *Cell* **2004**, *116*, 235–246, doi:10.1016/s0092-8674(03)01075-4.
342. Indovina, P.; Pentimalli, F.; Casini, N.; Vocca, I.; Giordano, A. RB1 Dual Role in Proliferation and Apoptosis: Cell Fate Control and Implications for Cancer Therapy. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17873–17890, doi:10.18632/oncotarget.4286.
343. Attardi, L.D.; Sage, J. RB Goes Mitochondrial. *Genes Dev* **2013**, *27*, 975–979, doi:10.1101/gad.219451.113.
344. Knudsen, E.S.; Wang, J.Y.J. Targeting the RB-Pathway in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 1094–1099, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0787.
345. Raicu, A.-M.; Castanheira, P.; Arnosti, D.N. Retinoblastoma Protein Activity Revealed by CRISPRi Study of Divergent Rbf1 and Rbf2 Paralogs. *bioRxiv* **2023**, 2023.05.19.541454, doi:10.1101/2023.05.19.541454.
346. Claudio, P.P.; Tonini, T.; Giordano, A. The Retinoblastoma Family: Twins or Distant Cousins? *Genome Biology* **2002**, *3*, reviews3012.1, doi:10.1186/gb-2002-3-9-reviews3012.
347. Mouawad, R.; Prasad, J.; Thorley, D.; Himadewi, P.; Kadiyala, D.; Wilson, N.; Kapranov, P.; Arnosti, D.N. Diversification of Retinoblastoma Protein Function Associated with Cis and Trans Adaptations. *Mol Biol Evol* **2019**, *36*, 2790–2804, doi:10.1093/molbev/msz187.
348. Dimova, D.K.; Stevaux, O.; Frolov, M.V.; Dyson, N.J. Cell Cycle-Dependent and Cell Cycle-Independent Control of Transcription by the Drosophila E2F/RB Pathway. *Genes Dev* **2003**, *17*, 2308–2320, doi:10.1101/gad.1116703.
349. Dominado, N.; La Marca, J.E.; Siddall, N.A.; Heaney, J.; Tran, M.; Cai, Y.; Yu, F.; Wang, H.; Somers, W.G.; Quinn, L.M.; et al. Rbf Regulates Drosophila Spermatogenesis via Control of Somatic Stem and Progenitor Cell Fate in the Larval Testis. *Stem Cell Reports* **2016**, *7*, 1152–1163, doi:10.1016/j.stemcr.2016.11.007.
350. Greenspan, L.J.; Matunis, E.L. Retinoblastoma Intrinsically Regulates Niche Cell Quiescence, Identity, and Niche Number in the Adult Drosophila Testis. *Cell Rep* **2018**, *24*, 3466–3476.e8, doi:10.1016/j.celrep.2018.08.083.

BIBLIOGRAPHIE

351. Moon, N.-S.; Di Stefano, L.; Morris, E.J.; Patel, R.; White, K.; Dyson, N.J. E2F and P53 Induce Apoptosis Independently during *Drosophila* Development but Intersect in the Context of DNA Damage. *PLoS Genet* **2008**, *4*, e1000153, doi:10.1371/journal.pgen.1000153.
352. Tanaka-Matakatsu, M.; Xu, J.; Cheng, L.; Du, W. Regulation of Apoptosis of Rbf Mutant Cells during *Drosophila* Development. *Developmental Biology* **2009**, *326*, 347–356, doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.035.
353. Du, W.; Dyson, N. The Role of RBF in the Introduction of G1 Regulation during *Drosophila* Embryogenesis. *EMBO J* **1999**, *18*, 916–925, doi:10.1093/emboj/18.4.916.
354. Millet, C.; Rincheval-Arnold, A.; Mignotte, B.; Guéna, I. The *Drosophila* Retinoblastoma Protein Induces Apoptosis in Proliferating but Not in Post-Mitotic Cells. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 97–103, doi:10.4161/cc.9.1.10251.
355. Clavier, A.; Ruby, V.; Rincheval-Arnold, A.; Mignotte, B.; Guéna, I. The *Drosophila* Retinoblastoma Protein, Rbf1, Induces a Debcl- and Drp1-Dependent Mitochondrial Apoptosis. *J. Cell. Sci.* **2015**, *128*, 3239–3249, doi:10.1242/jcs.169896.
356. Pattingre, S.; Tassa, A.; Qu, X.; Garuti, R.; Liang, X.H.; Mizushima, N.; Packer, M.; Schneider, M.D.; Levine, B. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* **2005**, *122*, 927–939, doi:10.1016/j.cell.2005.07.002.
357. Robert, G.; Gastaldi, C.; Puissant, A.; Hamouda, A.; Jacquet, A.; Dufies, M.; Belhacene, N.; Colosetti, P.; Reed, J.C.; Auberger, P.; et al. The Anti-Apoptotic Bcl-B Protein Inhibits BECN1-Dependent Autophagic Cell Death. *Autophagy* **2012**, *8*, 637–649, doi:10.4161/auto.19084.
358. Ciechomska, I.A.; Goemans, G.C.; Skepper, J.N.; Tolkovsky, A.M. Bcl-2 Complexed with Beclin-1 Maintains Full Anti-Apoptotic Function. *Oncogene* **2009**, *28*, 2128–2141, doi:10.1038/onc.2009.60.
359. Luo, S.; Rubinsztein, D.C. Apoptosis Blocks Beclin 1-Dependent Autophagosome Synthesis – an Effect Rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* **2010**, *17*, 268–277, doi:10.1038/cdd.2009.121.
360. Kubli, D.A.; Gustafsson, Å.B. Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. *Circ Res* **2012**, *111*, 1208–1221, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265819.
361. Pernaute, B.; Pérez-Montero, S.; Sánchez Nieto, J.M.; Di Gregorio, A.; Lima, A.; Lawlor, K.; Bowling, S.; Liccardi, G.; Tomás, A.; Meier, P.; et al. DRP1 Levels Determine the Apoptotic Threshold during Embryonic Differentiation through a Mitophagy-Dependent Mechanism. *Developmental Cell* **2022**, doi:10.1016/j.devcel.2022.04.020.
362. Yasuda, M.; Theodorakis, P.; Subramanian, T.; Chinnadurai, G. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 Interacting Protein BNIP3 Contains a BH3 Domain and a Mitochondrial Targeting Sequence. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 12415–12421, doi:10.1074/jbc.273.20.12415.
363. Hendgen-Cotta, U.B.; Esfeld, S.; Rudi, K.; Miinalainen, I.; Klare, J.P.; Rassaf, T. Cytosolic BNIP3 Dimer Interacts with Mitochondrial BAX Forming Heterodimers in the Mitochondrial Outer Membrane under Basal Conditions. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 687, doi:10.3390/ijms18040687.

364. Kim, J.-Y.; Cho, J.-J.; Ha, J.; Park, J.-H. The Carboxy Terminal C-Tail of BNip3 Is Crucial in Induction of Mitochondrial Permeability Transition in Isolated Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **2002**, *398*, 147–152, doi:10.1006/abbi.2001.2673.
365. Kubli, D.A.; Ycaza, J.E.; Gustafsson, Å.B. Bnip3 Mediates Mitochondrial Dysfunction and Cell Death through Bax and Bak. *Biochem J* **2007**, *405*, 407–415, doi:10.1042/BJ20070319.
366. Yasuda, M.; D'Sa-Eipper, C.; Gong, X.L.; Chinnadurai, G. Regulation of Apoptosis by a Caenorhabditis Elegans BNIP3 Homolog. *Oncogene* **1998**, *17*, 2525–2530, doi:10.1038/sj.onc.1202467.
367. Hollville, E.; Carroll, R.G.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Bcl-2 Family Proteins Participate in Mitochondrial Quality Control by Regulating Parkin/PINK1-Dependent Mitophagy. *Molecular Cell* **2014**, *55*, 451–466, doi:10.1016/j.molcel.2014.06.001.
368. Yu, S.; Du, M.; Yin, A.; Mai, Z.; Wang, Y.; Zhao, M.; Wang, X.; Chen, T. Bcl-xL Inhibits PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy by Preventing Mitochondrial Parkin Accumulation. *Int J Biochem Cell Biol* **2020**, *122*, 105720, doi:10.1016/j.biocel.2020.105720.
369. Zhang, Z.; Chen, Z.; Liu, R.; Liang, Q.; Peng, Z.; Yin, S.; Tang, J.; Gong, T.; Liu, Y. Bcl-2 Proteins Regulate Mitophagy in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via PINK1/Parkin Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**, *2020*, e6579696, doi:10.1155/2020/6579696.
370. Carroll, R.G.; Hollville, E.; Martin, S.J. Parkin Sensitizes toward Apoptosis Induced by Mitochondrial Depolarization through Promoting Degradation of Mcl-1. *Cell Rep* **2014**, *9*, 1538–1553, doi:10.1016/j.celrep.2014.10.046.
371. Yin, K.; Lee, J.; Liu, Z.; Kim, H.; Martin, D.R.; Wu, D.; Liu, M.; Xue, X. Mitophagy Protein PINK1 Suppresses Colon Tumor Growth by Metabolic Reprogramming via P53 Activation and Reducing Acetyl-CoA Production. *Cell Death Differ* **2021**, *28*, 2421–2435, doi:10.1038/s41418-021-00760-9.
372. Zhang, Y.; Chen, L.; Luo, Y.; Wang, K.; Liu, X.; Xiao, Z.; Zhao, G.; Yao, Y.; Lu, Z. Pink1/Parkin-Mediated Mitophagy Regulated the Apoptosis of Dendritic Cells in Sepsis. *Inflammation* **2022**, *45*, 1374–1387, doi:10.1007/s10753-022-01628-x.
373. Zhu, C.; Zhao, Y.; Pei, D.; Liu, Z.; Liu, J.; Li, Y.; Yu, S.; Ma, L.; Sun, J.; Li, A. PINK1 Mediated Mitophagy Attenuates Early Apoptosis of Gingival Epithelial Cells Induced by High Glucose. *BMC Oral Health* **2022**, *22*, 144, doi:10.1186/s12903-022-02167-5.
374. Wan, H.; Tang, B.; Liao, X.; Zeng, Q.; Zhang, Z.; Liao, L. Analysis of Neuronal Phosphoproteome Reveals PINK1 Regulation of BAD Function and Cell Death. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 904–917, doi:10.1038/s41418-017-0027-x.
375. M'Angale, P.G.; Staveley, B.E. Overexpression of Buffy Enhances the Loss of Parkin and Suppresses the Loss of Pink1 Phenotypes in Drosophila. *Genome* **2017**, *60*, 241–247, doi:10.1139/gen-2016-0165.
376. Deng, H.; Jankovic, J.; Guo, Y.; Xie, W.; Le, W. Small Interfering RNA Targeting the PINK1 Induces Apoptosis in Dopaminergic Cells SH-SY5Y. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *337*, 1133–1138, doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.178.

BIBLIOGRAPHIE

377. She, Q.-B.; Solit, D.B.; Ye, Q.; O'Reilly, K.E.; Lobo, J.; Rosen, N. The BAD Protein Integrates Survival Signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt Kinase Pathways in PTEN-Deficient Tumor Cells. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 287–297, doi:10.1016/j.ccr.2005.09.006.
378. Wan, Z.; Xu, J.; Huang, Y.; Zhai, Y.; Ma, Z.; Zhou, B.; Cao, Z. Elevating Bioavailable Iron Levels in Mitochondria Suppresses the Defective Phenotypes Caused by PINK1 Loss-of-Function in *Drosophila Melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**, *532*, 285–291, doi:10.1016/j.bbrc.2020.08.002.
379. Soutar, M.P.M.; Kempthorne, L.; Miyakawa, S.; Annuario, E.; Melandri, D.; Harley, J.; O'Sullivan, G.A.; Wray, S.; Hancock, D.C.; Cookson, M.R.; et al. AKT Signalling Selectively Regulates PINK1 Mitophagy in SHSY5Y Cells and Human iPSC-Derived Neurons. *Sci Rep* **2018**, *8*, 8855, doi:10.1038/s41598-018-26949-6.
380. Imbriani, P.; Tassone, A.; Meringolo, M.; Ponterio, G.; Madeo, G.; Pisani, A.; Bonsi, P.; Martella, G. Loss of Non-Apoptotic Role of Caspase-3 in the PINK1 Mouse Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 3407, doi:10.3390/ijms20143407.
381. Yang, H.; Sibilla, C.; Liu, R.; Yun, J.; Hay, B.A.; Blackstone, C.; Chan, D.C.; Harvey, R.J.; Guo, M. Clueless/CLUH Regulates Mitochondrial Fission by Promoting Recruitment of Drp1 to Mitochondria. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1582, doi:10.1038/s41467-022-29071-4.
382. Yacobi-Sharon, K.; Namdar, Y.; Arama, E. Alternative Germ Cell Death Pathway in *Drosophila* Involves HtrA2/Omi, Lysosomes, and a Caspase-9 Counterpart. *Developmental Cell* **2013**, *25*, 29–42, doi:10.1016/j.devcel.2013.02.002.
383. Bernardini, J.P.; Brouwer, J.M.; Tan, I.K.; Sandow, J.J.; Huang, S.; Stafford, C.A.; Bankovacki, A.; Riffkin, C.D.; Wardak, A.Z.; Czabotar, P.E.; et al. Parkin Inhibits BAK and BAX Apoptotic Function by Distinct Mechanisms during Mitophagy. *The EMBO Journal* **2019**, *38*, e99916, doi:10.15252/embj.201899916.
384. Cakir, Z.; Funk, K.; Lauterwasser, J.; Todt, F.; Zerbes, R.M.; Oelgeklaus, A.; Tanaka, A.; van der Laan, M.; Edlich, F. Parkin Promotes Proteasomal Degradation of Misregulated BAX. *J Cell Sci* **2017**, *130*, 2903–2913, doi:10.1242/jcs.200162.
385. Charan, R.A.; Johnson, B.N.; Zaganelli, S.; Nardozi, J.D.; LaVoie, M.J. Inhibition of Apoptotic Bax Translocation to the Mitochondria Is a Central Function of Parkin. *Cell Death & Disease* **2014**, *5*, e1313–e1313, doi:10.1038/cddis.2014.278.
386. M'Angale, P.G.; Staveley, B.E. A Loss of Pdxk Model of Parkinson Disease in *Drosophila* Can Be Suppressed by Buffy. *BMC Res Notes* **2017**, *10*, 205, doi:10.1186/s13104-017-2526-8.
387. De Snoo, M.L.; Friesen, E.L.; Zhang, Y.T.; Earnshaw, R.; Dorval, G.; Kapadia, M.; O'Hara, D.M.; Agapova, V.; Chau, H.; Pellerito, O.; et al. Bcl-2-Associated Athanogene 5 (BAG5) Regulates Parkin-Dependent Mitophagy and Cell Death. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 907, doi:10.1038/s41419-019-2132-x.
388. Zhang, C.; Lee, S.; Peng, Y.; Bunker, E.; Giaime, E.; Shen, J.; Zhou, Z.; Liu, X. PINK1 Triggers Autocatalytic Activation of Parkin to Specify Cell Fate Decisions. *Curr Biol* **2014**, *24*, 1854–1865, doi:10.1016/j.cub.2014.07.014.

389. Johnson, B.N.; Berger, A.K.; Cortese, G.P.; LaVoie, M.J. The Ubiquitin E3 Ligase Parkin Regulates the Proapoptotic Function of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 6283–6288, doi:10.1073/pnas.1113248109.
390. Quarato, G.; Mari, L.; Barrows, N.J.; Yang, M.; Ruehl, S.; Chen, M.J.; Guy, C.S.; Low, J.; Chen, T.; Green, D.R. Mitophagy Restricts BAX/BAK-Independent, Parkin-Mediated Apoptosis. *Sci Adv* **9**, eadg8156, doi:10.1126/sciadv.adg8156.
391. Palozzi, J.M.; Hurd, T.R. The Role of Programmed Mitophagy in Germline Mitochondrial DNA Quality Control. *Autophagy* **2023**, *19*, 2817–2818, doi:10.1080/15548627.2023.2182595.
392. Tracy, K.; Dibling, B.C.; Spike, B.T.; Knabb, J.R.; Schumacker, P.; Macleod, K.F. BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 6229–6242, doi:10.1128/MCB.02246-06.
393. Scorrano, L.; Oakes, S.A.; Opferman, J.T.; Cheng, E.H.; Sorcinelli, M.D.; Pozzan, T.; Korsmeyer, S.J. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. *Science* **2003**, *300*, 135–139, doi:10.1126/science.1081208.
394. Bozi, L.H.M.; Takano, A.P.C.; Campos, J.C.; Rolim, N.; Dourado, P.M.M.; Voltarelli, V.A.; Wisløff, U.; Ferreira, J.C.B.; Barreto-Chaves, M.L.M.; Brum, P.C. Endoplasmic Reticulum Stress Impairs Cardiomyocyte Contractility through JNK-Dependent Upregulation of BNIP3. *Int J Cardiol* **2018**, *272*, 194–201, doi:10.1016/j.ijcard.2018.08.070.
395. Delgado, J.M.; Shepard, L.W.; Lamson, S.W.; Liu, S.L.; Shoemaker, C.J. The ER Membrane Protein Complex Governs Lysosomal Turnover of a Mitochondrial Tail-Anchored Protein, BNIP3, to Restrict Mitophagy 2023, 2023.03.22.533681.
396. Zhang, L.; Li, L.; Liu, H.; Borowitz, J.L.; Isom, G.E. BNIP3 Mediates Cell Death by Different Pathways Following Localization to Endoplasmic Reticulum and Mitochondrion. *FASEB J* **2009**, *23*, 3405–3414, doi:10.1096/fj.08-124354.
397. Zhang, L.; Li, L.; Leavesley, H.W.; Zhang, X.; Borowitz, J.L.; Isom, G.E. Cyanide-Induced Apoptosis of Dopaminergic Cells Is Promoted by BNIP3 and Bax Modulation of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Ca²⁺ Levels. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, *332*, 97–105, doi:10.1124/jpet.109.159103.
398. Wang, R.; Fortier, T.M.; Chai, F.; Miao, G.; Shen, J.L.; Restrepo, L.J.; DiGiacomo, J.J.; Velentzas, P.D.; Baehrecke, E.H. PINK1, Keap1, and Rtn1 Regulate Selective Clearance of Endoplasmic Reticulum during Development. *Cell* **2023**, *186*, 4172–4188.e18, doi:10.1016/j.cell.2023.08.008.
399. Azad, M.B.; Gibson, S.B. Role of BNIP3 in Proliferation and Hypoxia-Induced Autophagy: Implications for Personalized Cancer Therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2010**, *1210*, 8–16, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05778.x.
400. Singh, A.; Azad, M.; Shymko, M.D.; Henson, E.S.; Katyal, S.; Eisenstat, D.D.; Gibson, S.B. The BH3 Only Bcl-2 Family Member BNIP3 Regulates Cellular Proliferation. *PLoS One* **2018**, *13*, e0204792, doi:10.1371/journal.pone.0204792.
401. Zhu, Y.; Chen, B.; Yan, J.; Zhao, W.; Dou, P.; Sun, N.; Wang, Y.; Huang, X. BNIP3 Upregulation Characterizes Cancer Cell Subpopulation With Increased Fitness and Proliferation. *Frontiers in Oncology* **2022**, *12*.

BIBLIOGRAPHIE

402. Gao, Q.; Tian, R.; Han, H.; Slone, J.; Wang, C.; Ke, X.; Zhang, T.; Li, X.; He, Y.; Liao, P.; et al. PINK1-Mediated Drp1S616 Phosphorylation Modulates Synaptic Development and Plasticity via Promoting Mitochondrial Fission. *Signal Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 103, doi:10.1038/s41392-022-00933-z.
403. Adachi, Y.; Kato, T.; Yamada, T.; Murata, D.; Arai, K.; Stahelin, R.V.; Chan, D.C.; Iijima, M.; Sesaki, H. Drp1 Tubulates the ER in a GTPase Independent Manner. *Mol Cell* **2020**, *80*, 621–632.e6, doi:10.1016/j.molcel.2020.10.013.
404. Elcocks, H.; Brazel, A.J.; McCarron, K.R.; Kaulich, M.; Husnjak, K.; Mortiboys, H.; Clague, M.J.; Urbé, S. FBXL4 Ubiquitin Ligase Deficiency Promotes Mitophagy by Elevating NIX Levels. *The EMBO Journal* **2023**, *42*, e112799, doi:10.15252/embj.2022112799.
405. Dagda, R.K.; Cherra, S.J.; Kulich, S.M.; Tandon, A.; Park, D.; Chu, C.T. Loss of PINK1 Function Promotes Mitophagy through Effects on Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 13843–13855, doi:10.1074/jbc.M808515200.
406. Cui, T.; Fan, C.; Gu, L.; Gao, H.; Liu, Q.; Zhang, T.; Qi, Z.; Zhao, C.; Zhao, H.; Cai, Q.; et al. Silencing of PINK1 Induces Mitophagy via Mitochondrial Permeability Transition in Dopaminergic MN9D Cells. *Brain Res* **2011**, *1394*, 1–13, doi:10.1016/j.brainres.2011.01.035.
407. Fedorowicz, M.; de Vries-Schneider, R.; Rüb, C.; Becker, D.; Huang, Y.; Zhou, C.; Alessi Wolken, D.; Voos, W.; Liu, Y.; Przedborski, S. Cytosolic Cleaved PINK1 Represses Parkin Translocation to Mitochondria and Mitophagy. *EMBO Rep* **2014**, *15*, 86–93, doi:10.1002/embr.201337294.
408. Steer, E.K.; Dail, M.K.; Chu, C.T. Beyond Mitophagy: Cytosolic PINK1 as a Messenger of Mitochondrial Health. *Antioxid Redox Signal* **2015**, *22*, 1047–1059, doi:10.1089/ars.2014.6206.
409. Kessel, D.H.; Price, M.; Reiners, Jr., J.J. ATG7 Deficiency Suppresses Apoptosis and Cell Death Induced by Lysosomal Photodamage. *Autophagy* **2012**, *8*, 1333–1341, doi:10.4161/auto.20792.
410. Rami, A.; Benz, A. Exclusive Activation of Caspase-3 in Mossy Fibers and Altered Dynamics of Autophagy Markers in the Mice Hippocampus upon Status Epilepticus Induced by Kainic Acid. *Mol Neurobiol* **2018**, *55*, 4492–4503, doi:10.1007/s12035-017-0665-5.
411. Rubinstein, A.D.; Eisenstein, M.; Ber, Y.; Bialik, S.; Kimchi, A. The Autophagy Protein Atg12 Associates with Antiapoptotic Bcl-2 Family Members to Promote Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell* **2011**, *44*, 698–709, doi:10.1016/j.molcel.2011.10.014.
412. Xie, C.; Ginet, V.; Sun, Y.; Koike, M.; Zhou, K.; Li, T.; Li, H.; Li, Q.; Wang, X.; Uchiyama, Y.; et al. Neuroprotection by Selective Neuronal Deletion of Atg7 in Neonatal Brain Injury. *Autophagy* **2016**, *12*, 410–423, doi:10.1080/15548627.2015.1132134.
413. Scott, R.C.; Juhász, G.; Neufeld, T.P. Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death. *Curr Biol* **2007**, *17*, 1–11, doi:10.1016/j.cub.2006.10.053.
414. Juhász, G.; Érdi, B.; Sass, M.; Neufeld, T.P. Atg7-Dependent Autophagy Promotes Neuronal Health, Stress Tolerance, and Longevity but Is Dispensable for Metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **2007**, *21*, 3061–3066, doi:10.1101/gad.1600707.

415. Amo, T.; Sato, S.; Saiki, S.; Wolf, A.M.; Toyomizu, M.; Gautier, C.A.; Shen, J.; Ohta, S.; Hattori, N. Mitochondrial Membrane Potential Decrease Caused by Loss of PINK1 Is Not Due to Proton Leak, but to Respiratory Chain Defects. *Neurobiol Dis* **2011**, *41*, 111–118, doi:10.1016/j.nbd.2010.08.027.
416. Amo, T.; Saiki, S.; Sawayama, T.; Sato, S.; Hattori, N. Detailed Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Defects Caused by Loss of PINK1. *Neurosci Lett* **2014**, *580*, 37–40, doi:10.1016/j.neulet.2014.07.045.
417. Liu, W.; Acín-Peréz, R.; Geghman, K.D.; Manfredi, G.; Lu, B.; Li, C. Pink1 Regulates the Oxidative Phosphorylation Machinery via Mitochondrial Fission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 12920–12924, doi:10.1073/pnas.1107332108.
418. Morais, V.A.; Haddad, D.; Craessaerts, K.; De Bock, P.-J.; Swerts, J.; Vilain, S.; Aerts, L.; Overbergh, L.; Grünewald, A.; Seibler, P.; et al. PINK1 Loss-of-Function Mutations Affect Mitochondrial Complex I Activity via NdufA10 Ubiquinone Uncoupling. *Science* **2014**, *344*, 203–207, doi:10.1126/science.1249161.
419. Weihofen, A.; Thomas, K.J.; Ostaszewski, B.L.; Cookson, M.R.; Selkoe, D.J. Pink1 Forms a Multiprotein Complex with Miro and Milton, Linking Pink1 Function to Mitochondrial Trafficking. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2045–2052, doi:10.1021/bi8019178.
420. Zhang, S.; Che, L.; He, C.; Huang, J.; Guo, N.; Shi, J.; Lin, Y.; Lin, Z. Drp1 and RB Interaction to Mediate Mitochondria-Dependent Necroptosis Induced by Cadmium in Hepatocytes. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 523, doi:10.1038/s41419-019-1730-y.