



HAL
open science

Pathologies de la dynamique mitochondriale: étude de la relation structure-fonction au cours de la fission mitochondriale

Charlène Lhuissier

► **To cite this version:**

Charlène Lhuissier. Pathologies de la dynamique mitochondriale: étude de la relation structure-fonction au cours de la fission mitochondriale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2022. Français. NNT: 2022ANGE0090 . tel-04622482

HAL Id: tel-04622482

<https://theses.hal.science/tel-04622482>

Submitted on 24 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ÉCOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Par

Charlène LHUISSIER

Pathologies de la dynamique mitochondriale : étude de la relation structure-fonction au cours de la fission mitochondriale

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 16 décembre 2022

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc – Equipe MitoLab – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

Rapporteurs avant soutenance :

Hélène PUCCIO DR, Institut NeuroMyoGène UCBL – CNRS UMR 5310 – INSERM U1217, Lyon
Arnaud MOURIER CR CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires - UMR 5095, Bordeaux

Composition du Jury :

Examineurs : Julien CASSEREAU PU-PH, Université d'Angers
Timothy WAI DR2 CNRS Mitochondrial Biology Group Institut Pasteur CNRS UMR 3691, Paris

Dir. de thèse : Arnaud CHEVROLLIER MCF, MitoVasc CNRS 6015 – INSERM U1083, Angers
Co-encad. de thèse : Naïg GUEGUEN Ingénieur Hospitalier, MitoVasc CNRS 6015 – INSERM U1083, Angers

Invitée
Giulia BERTOLIN CR CNRS, Institute of Genetics and Development of Rennes (IGDR)
UMR 6290 CNRS, Rennes

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



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

**Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

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



Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres de mon jury de thèse : **Mme Hélène Puccio, Mr Arnaud Mourier, Mr Timothy Wai, Mr Julien Cassereau et Mme Giulia Bertolin** pour le temps accordé à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

J'aimerais ensuite remercier mes directeurs de thèse **Arnaud Chevrollier** et **Naïg Gueguen**. Grâce à vous, j'ai pu développer beaucoup de compétences, tant le versant microscopie que le côté biochimie/biologie cellulaire.

Arnaud, je te remercie d'avoir cru en moi jusqu'au bout et de m'avoir poussée si loin. Après un stage de master 1, un stage de master 2 et maintenant la thèse, je te suis reconnaissante de m'avoir permis de travailler avec toi tout au long de ces années. Elles sont passées si vite... Je te remercie également de m'avoir transmis ta passion pour la microscopie et les magnifiques images de microscopie (qui mettent beaucoup trop de temps à se déconvoluer). Merci pour ta disponibilité tout au long de la thèse. Même si tu étais pris par l'IUT, tu as toujours su trouver du temps pour m'accompagner. Je te remercie aussi pour ta gentillesse, ta patience que j'ai pu mettre à l'épreuve. Et pour ce délicieux barbecue tous ensemble.

Je tiens aussi à te remercier **Naïg**. A tes côtés j'ai énormément appris. J'ai eu de la chance de t'avoir également comme encadrante. Je te remercie pour tous tes encouragements et ta disponibilité tout au long du master 2 et de la thèse, que ce soit pour l'apprentissage des techniques, des questions pour les protocoles, pour la bibliographie et surtout pour les problèmes d'oxygraphe, de WB et de BN-PAGE... Sans tes conseils je n'aurais jamais pu obtenir autant de résultats. Je te remercie également pour la relecture de la thèse, notamment pour tes magnifiques phrases de transitions, que j'ai tant de mal à faire. Je te remercie simplement pour tout.

Je remercie également **Guy Lenaers**, directeur de l'équipe MitoLab et maintenant de l'unité MitoVasc, et **Daniel Henrion** de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de ce laboratoire.

Je remercie également la Pr **Isabelle Maystadt** de l'Institut de Pathologie et de Génétique Centre de Génétique Humaine de Belgique, pour cette belle collaboration au service d'une recherche complexe autour d'un cas clinique DNM1L.

Je tiens à remercier toute l'équipe actuelle de MitoLab : Charlotte, Alexia, Florian, Nolwenn, Théophile, Salim, Mathieu, Bettina, Cinzia, Morgan, Yannick, Claudie, Magalie, Anaïs, Mireille, Jérémy, Guy et Olivier, ceux qui sont partis en cours de route : Jade, Aurélie, Nancy, Steph, Caroline, Aurore, la petite Anaïs, Sophie et David et tous les stagiaires de l'équipe : Paul, Valentin, Cécile, Margaux, Marine... Pour leur accueil et leur gentillesse tout au long de ces années.

A **Anaïs**, merci pour tout ce que tu as fait, le soutien que tu m'as apporté tant moralement que niveau manip (surtout pour toute la culture et la microscopie). Je te remercie de m'avoir transmis le décodeur pour

comprendre certaines personnes, au moins on était deux dans cette galère haha. Je te remercie pour toute l'énergie que tu as mise avec Aurélie pour le labo : le téléthon et autres. Je te remercie aussi d'avoir été présente à chaque instant, dans les moments de joie comme les moments de déprime. Merci pour nos nombreuses conversations où nous avons pu échanger et nous serrer les coudes. Vraiment MERCI pour tout.

A **Charlotte**, voisine du bureau d'en face comme tu dis. On a fait la même licence, presque le même master, et on a été en thèse ensemble. On a connu les mêmes épreuves, les mêmes galères comme tu dis : la COVID, les super oxy et les BN-PAGE, les galères administratives de la thèse et fin de thèse... Je te remercie pour tous tes nombreux conseils de qualité. Tu as toujours su poser les bonnes questions et avoir un bon œil critique sur les travaux qui m'ont permis de m'améliorer. Merci pour les petits cadeaux de la réunion après la COVID. Je te souhaite aussi de bonnes choses pour l'avenir, que tu puisses faire ce que tu aimes dans ta région natale. A **Léa**, ma binôme de master 2, on a aussi traversé les mêmes épreuves, ensemble, juste la soutenance de thèse qui est en décalé. Je te souhaite plein de bonnes choses pour ta thèse et la suite avec flouflou.

Aux doctorants/anciens doctorant, **Magalie, Jérémy, Florian, Alexia, Jade**, merci pour votre aide et vos précieux conseils. Merci aussi pour les sorties en dehors du laboratoire, boire un coup avec vous est toujours un plaisir. Aux nouveaux doctorants, **Théophile** et **Nolwenn**, bon courage pour les 2 années à venir, vous verrez ça passe plus vite qu'on ne le pense, donc profitez bien. **Nolwenn**, je te remercie aussi pour MitoNice, ça a été un plaisir de partager 3 jours avec toi. A toutes nos galères avant (vive l'administratif), pendant (l'alarme incendie de l'hôtel et l'organisation du congrès), et après. Plus jamais un congrès à Nice haha. Et à ceux qui viennent d'arriver : **Léa** et **Pauline**, je vous souhaite plein de beaux résultats et une belle thèse.

A **Cinzia, Morgane** et maintenant **Claudie**, les mamans de l'équipe, merci de nous avoir raconté comment on vit une grossesse, un accouchement et l'après. Je pense que la case négative est quand même largement plus longue que la case positive mais qu'importe. Merci **Cinzia** pour l'appel du « pause-café », ce moment où l'on peut échapper au laboratoire et parler de tout sans gêne. A **Yannick** et **Salim**, merci pour tous vos conseils techniques et vos remarques pertinentes pour les manips et en réunion de labo. A **Olivier**, merci de m'avoir poussée dans mes retranchements, de m'encourager à aller plus loin, et de m'aider à vaincre ma timidité. Merci aussi pour ta joie de vivre et tes concerts musicaux au labo. J'ADORE LA ..., tu comprendras. A **Mireille**, merci d'avoir réorganisé le laboratoire, tu n'imagines même pas la charge que tu nous as enlevé (surtout pour Anaïs) des épaules.

A **Aurélie**, merci de m'avoir accueillie dans le labo. C'est grâce à toi que j'ai appris comment fonctionnait le laboratoire, comment on cultive des fibroblastes, où se trouvaient les poudres, comment utiliser le matériel correctement ... Je te remercie pour toute l'énergie que tu as fournie pour faire fonctionner le labo et que l'équipe reste soudée. Merci aussi pour ces moments en dehors, pour la course à pied, pour le défi 24h du téléthon, pour le weekend à Arzon...

A **Steph**, merci pour ces années avec toi au Diag. Qu'est-ce que j'ai aimé bavarder avec toi pendant les WB et les Oxy. Je descendais avec plaisir, lorsque tu étais de manip, pour tout te raconter. Merci du coup pour l'aide que tu m'apportais en même temps, parce que faut pas déconner on bossait quand même. Une fois que tu étais partie, je me suis sentie tellement seule :(Je te remercie aussi pour le temps passé ensemble autour d'un verre ou plus à refaire le monde qui nous entoure. A quand le prochain ?

A la **petite Anaïs**, merci pour ton aide pour les déconvolutions des images de microscopie. Sans ton aide je crois que je n'aurais pas pu analyser autant d'images. Merci aussi pour ta gentillesse et ta joie de vivre qui donnaient du baume au cœur.

A mes amis, je vous remercie d'être toujours présents quoi qu'il arrive et malgré la distance. Je vous love. Aux **Sumsum, Florent, Maxime J, Tommy**, et les rapportées **Camille et Justine**. Ça dure depuis maintenant plus de 10 ans... 10 ans de conneries ensemble, de fou rire, de cuites (mort à 21h au rosé). Avec vous on ne s'ennuie jamais. Par contre je ne remercie pas ce jeu de merde auquel vous jouez toujours (à vous de deviner lequel). Je suis heureuse que vous fassiez partie de notre vie. Vous êtes vraiment les meilleurs et vous le serez toujours <3

Aux **Longole de Mézart, Tommy, Mathou, Pauline et Fanny**, je vous remercie pour ces années avec vous. Pour toutes les soirées pâtes, ou sushi chez Paupau, pour toutes nos conversations aussi joyeuses que déprimantes (Conversation de la déprime), pour tous ces moments où simplement parler avec vous remonte le moral de fou. Mathou tu es un rayon de soleil. Si je pouvais insérer des gifs ça serait direct le « bravocado ». Vous resterez à jamais les meilleurs <3

Aux copains de la fac, **Hamtaro, Louise, Chloé, Valou, Mélissa, Lopez, Ulysse, Juliette, Antoine, Anaïs**, et **Jimmy**, merci pour les années de licence. Surtout la L2, depuis le foie a perdu de l'entraînement. Merci pour toutes les soirées et les week-ends avec vous. Merci aux Pépettes pour ces superbes vacances à Orthez (IFP SCHHHHOOOOL) <3

A toute ma famille : **Mamie Avo, Myriam, Américo, Françoise, Lucia, Rosa, Bernard, Marie, Marc, Fabienne, Pascal, Adrien, Vanessa, Pauline, Rudy, Marine, Kevin, Pierre, Élise, Ilona, David, Chloé, Simon, Amandine et Paulo**. Je vous remercie pour votre soutien inconditionnel. C'est toujours un plaisir de vous voir, une bouffée d'eau fraîche et d'amour. Merci pour tout l'amour que cette famille m'a apporté. On se revoit prochainement, je vous love tous. A **papi**, j'espère que tu es fier de moi de là où tu es, et j'aurais aimé que tu vois mon futur aux cotés de Maxime, je t'aime mon **papi chéri**.

A ma belle-famille : **Nathalie, Dany, Lucie, Alex, Renée, Louise et Hortense**, merci de m'avoir accueillie dans votre famille. C'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous et maintenant avec les filles en plus.

A **mon papounet** et **ma moman**, ce fut long, mais je suis arrivée jusqu'au bout de ces années d'études. J'espère aussi que vous êtes fiers de moi. Je vous remercie pour tout, pour l'amour que vous me donnez, pour avoir cru en moi et mes choix, pour le soutien psychologique que tu me donnes moman, pour toute l'aide manuel et autres que tu me donnes papa. J'ai beaucoup trop de chose à remercier, ça serait trop long. A **Alex** et **Ju'**, merci aussi de m'avoir soutenue et de m'avoir boostée. Merci pour les heures de transpiration pendant le confinement et après. Merci de m'avoir initié à la course à pied Ju' et aux randos. Hâte de retourner au ski tous ensemble. Je vous aime <3

A **Mouh**, toi qui es mon tout, mon confident, mon ami, mon âme sœur, merci pour ces 10 années passées ensemble et pour les prochaines. Merci d'être présent dans les moments les plus heureux comme les plus tristes. Merci de me supporter, ça ne doit pas être facile tous les jours d'après Ju' et pourtant tu n'as pas encore fui (surtout pour la fin de thèse). Je ne vois pas ma vie sans toi, merci d'avoir fait de moi ton petit bout de femme. Je pars en premier nous trouver un beau petit nid, rejoins moi là-bas, je t'attendrais... Je t'aime Mouh <3

REMERCIEMENTS

ABREVIATION

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION	1
1. Généralités sur la mitochondrie	1
1.1. Historique – origine	1
1.2. Structure	1
2. Le métabolisme énergétique	5
2.1. La glycolyse	5
2.1.1. Les étapes de la glycolyse	5
2.1.2. Glycolyse "anaérobie", glycolyse "aérobie" : recyclage du NADH et devenir du pyruvate	7
2.2. Le cycle de Krebs.....	10
2.3. La phosphorylation oxydative ou OXPHOS	11
2.3.1. Fonctionnement.....	11
2.3.2. L'ATP synthase ou F ₀ F ₁ -ATP synthase	14
a) Structure	15
b) Assemblage.....	15
c) Super-structure	17
d) Fonctionnement.....	19
e) Régulation de l'activité ATPase	21
2.3.3. Adénine nucléotide translocase ou ANT	23
2.3.4. La composition de la chaîne respiratoire.....	25
a) Complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase)	27
b) Complexe II ou succinate ubiquinone oxydoréductase	27
c) Complexe III ou ubiquinol cytochrome c oxydoréductase	29
d) Complexe IV ou cytochrome c oxydase	31
e) Les Supercomplexes.....	31
2.4. La production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS	31
2.4.1. Génération de ROS par le complexe I	33
2.4.2. Génération de ROS par le complexe II	35
2.4.3. Génération de ROS par le complexe III	35
2.4.4. La détoxification mitochondriale des ROS	37
3. La dynamique mitochondriale	40
3.1. La protéine de fission mitochondriale : DRP1 (DMN1L)	41
3.1.1. Structure et fonction de DRP1	42
3.1.2. Les protéines adaptatrices de DRP1	43
3.1.3. Mécanisme de la fission mitochondriale.....	47
3.1.4. Les autres protéines acteurs de la fission	49
3.1.5. Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de DRP1	49
a) Régulation par épissage alternatif.....	49
b) Régulation post-traductionnelle	51
Phosphorylation de DRP1	51
Ubiquitination	53
SUMOylation	53
S-Nitrosylation	55
O-GlucNAcylation	55
3.1.6. Les signaux cellulaires régulant la fission mitochondriale	55
3.2. Les protéines de fusion : MFN1/2	56
3.2.1. Structure et fonction de MFN1/2	57
3.2.2. Mécanisme de la fusion des membranes externes	59
3.2.3. Régulation de la fusion des membranes mitochondriales externes	59
a) Phosphorylation	59
b) Acétylation	59
c) Ubiquitination	61
d) Modification lipidique.....	61
3.3. La protéine de fusion : OPA1	61
3.3.1. Structure d'OPA1	Erreur ! Signet non défini.

3.3.2.	Les différentes fonctions d'OPA1 dans ...	63
	a) La fusion des membranes internes.....	63
	b) La structuration des crêtes mitochondriales	64
	c) L'Apoptose	65
	d) La maintenance de l'ADNmt	65
3.3.3.	Mécanisme de la fusion des membranes internes	65
3.3.4.	Les protéines de maturation d'OPA1	67
	a) YME1L	67
	b) OMA1	67
3.3.5.	Les protéines interagissant avec OPA1	67
	a) MICOS	67
	b) ATP synthase.....	69
3.3.6.	Régulation de la fusion des membranes mitochondriales internes	69
	a) Processus protéolytiques de OPA1	69
	b) Autres régulations de OPA1.....	71
3.4.	Le contrôle qualité des mitochondries : la mitophagie.....	72
4.	La relation ambiguë entre la dynamique mitochondriale et le métabolisme	73
4.1.	Un défaut de fusion/fission influence t'il le métabolisme ?	75
4.1.1.	Défaut de fission et métabolisme énergétique.....	75
	a) DRP1	75
4.1.2.	Défaut de fusion et métabolisme énergétique	77
	a) MFN2.....	77
	b) OPA1	79
4.2.	Le métabolisme influence-t-il les processus de fusion/fission ?	83
4.2.1.	Le métabolisme cellulaire module la fusion/fission.....	83
4.2.2.	Le fonctionnement mitochondrial module la fusion/fission ?	85
	a) La variation du $\Delta\Psi_m$	86
	b) Variation de l'activité de la chaîne respiratoire	87
	Modulation de l'activité de la chaîne respiratoire induite par inhibitions pharmacologiques	87
	Modulation de l'activité de la chaîne respiratoire induite par des altérations d'origine génétiques... ..	89
	c) La variation de la production de ROS	91
	d) La variation d'ATP et l'ATP synthase.....	93
OBJECTIF DE LA THESE	97	
RESULTATS	101	
1. Progression de trente ans d'une encéphalopathie EMPF1 due à une fission mitochondriale et peroxysomale défectueuse causée par un nouveau variant hétérozygote de novo DNMI1L.	101	
1.1.	Introduction	101
1.2.	Résultats	115
1.3.	Discussion.....	115
2. Caractérisation des voies d'induction et de résistance à la fission mitochondriale	119	
2.1.	La F0F1-ATP synthase mitochondriale conditionne la réactivité des mitochondries à la fission.....	119
2.1.1.	Introduction	119
2.1.2.	Résultats	173
2.2.	Une surproduction de ROS ne perturberait pas la structure du réseau mitochondrial	176
2.2.1.	Analyse de la production de ROS	177
2.2.2.	Analyse de l'assemblage des supercomplexes	179
2.3.	Recrutement de la protéine DRP1 au cours du temps	181
2.4.	Discussion.....	181
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	191	
CONCLUSION GENERALE.....	201	
FICHES TECHNIQUES	203	
Fiche technique n°1 : Culture primaire de fibroblaste de peau	203	
Fiche technique n°2 : Dosage des protéines par spectrophotométrie	205	
Fiche technique n°3 : Mesure de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial sur cellules intactes par oxygraphie	206	

Fiche technique n°4 : Mesure de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial sur cellules perméabilisées par oxygraphie	208
Fiche technique n°5 : Mesure de la respiration cellulaire et des espèces réactives de l'oxygène sur cellules perméabilisées par oxygraphie	211
Fiche technique n°6 : Western-Blot	214
Fiche technique n°7 : Enrichissement en mitochondries de fibroblastes	219
Fiche technique n°8 : Blue native poly-acrylamide gel electrophoresis (Blue Native-PAGE)	220
Fiche technique n°9 : Microscopie à fluorescence sur fibroblastes en culture	224
Fiche technique n°10 : Microscopie Super-Résolution (dSTORM)	226
Fiche technique n°11 : Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (complexe I) sur fibroblastes	228
Fiche technique n°12 : Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome c Réductase (complexe III) sur fibroblastes	231
Fiche technique n°13 : Dosage de l'activité F1-ATP synthase sur fibroblaste	233
Fiche technique n°14 : Dosage de l'activité Citrate synthase (CS) sur fibroblastes	236
BIBLIOGRAPHIE	238
TABLE DES ILLUSTRATIONS	271
TABLE DES TABLEAUX	273
AUTRES ACTIVITÉS	274
Publications	274
Communication	274
Enseignement	275
Vulgarisation scientifique	275

Abréviation

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial
ADNmt	ADN mitochondrial
AMPc	Adenosine 3',5'monophosphate cyclique
ANT	Adénine nucléotide translocase
AOD	Atrophie optique dominante
ARNi	Acide Ribo-Nucléique interférent
ARNr	Acide Ribo-Nucléique ribosomal
ARNt	Acide Ribo-Nucléique de transfert
ATR	Atractyloside
Bax	BCL-2 associated protein X
BSE	bundle signalling elements
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ -/calmodulin-dependent kinase II
CC	Coil-coil
Cdk1	Cyclin dependant kinase 1
RGCs	Cellules ganglionnaires de la rétine
CL	Cardiolipine
Cys	Cystéine
Cyt c	Cytochrome c
DNM1L	Dynamin like 1
DRP1	Dynamin related protein 1
EMPF1	Encéphalopathie due à un défaut de fission mitochondriale et peroxysomale 1
ERK-1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2
Fis1	Mitochondrial fission 1 protein
Fzo1	fuzzy onion
GDAP1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
GST	Glutathion-s-transférase
HD1	Domaine hydrophobe
HDAC6	Histone déacétylase 6
HR	Heptad repeat
IF1	Inhibit factor 1
INF2	Inverted-formin 2
IPs	cellule souche pluripotente induite
KO	Knock-down
MALP	Mitochondrial-anchored protein ligase
MCU	Uniporteur de calcium mitochondrial
ME	Membrane externe

MEF	Fibroblastes embryonnaires de souris
MFF	Mitochondrial Fission Factor
MFN1/2	Mitofusine 1 et 2
MI	Membrane interne
MiD49/51	Mitochondrial dynamics protein 49kD/51kD
MTS	Mitochondria targetting sequence
NO	Oxyde nitrique
OMA1	Metalloendopeptidase OMA1
OPA1	Atrophie optique 1
OPA5	Atrophie optique 5 autosomique dominante isolée
PA	Acide phosphatidique
PKA	Protéine kinase A
PKC δ	Protéine kinase C δ
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
Ser	Sérine
SOD	Superoxyde dismutase
TIM	Translocase of Inner Membrane
TM	Trans-membranaire
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TRP	Tétratricopeptides
VDAC	Voltage-Dependant-Anion-Channel
YME1L	Yeast mitochondrial DNA escape 1-like
FMN	Flavine mononucléotide
MPC	Mitochondrial pyruvate carrier

Avant-propos

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité mixte de recherche CNRS 6015 – Inserm U1083 dirigé par le Professeur Daniel HENRION. Ma thèse a été réalisée dans l'équipe MitoLab, spécialisée dans l'étude du métabolisme mitochondrial et de ses régulations dans différentes pathologies, sous la direction du Docteur Arnaud Chevrollier et co-encadrée par le Docteur Naïg Gueguen.

L'un des principaux axes de recherche du laboratoire porte sur l'étude des pathologies neurodégénératives en relation avec des anomalies de la dynamique mitochondriale. Les objectifs de l'équipe sont d'étudier les mécanismes physiopathologiques entrant en jeu dans les pathologies de la dynamique mitochondriale afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires fondamentaux pour la production d'énergie sous forme d'ATP et possèdent leur propre génome appelé l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ainsi, chaque cellule possède quelques centaines à plusieurs milliers de molécules d'ADNmt regroupées en nucléoïde, et codant pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire. Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries sont organisées en un réseau tubulaire et plus ou moins connecté selon le type tissulaire et selon les conditions métaboliques. Les propriétés dynamiques des mitochondries, leur fusion, leur fission, leur remodelage des membranes internes et leur dégradation par mitophagie, sont essentiels au bon fonctionnement de ces mitochondries.

La machinerie de fusion/fission mitochondriale est sous le contrôle de protéines appartenant à la famille des dynamines GTPase. La protéine cytoplasmique, responsable de la fission des membranes externes DRP1 et la protéine de fusion de la membrane interne OPA1 sont des acteurs clés de ces processus. Afin d'assurer le maintien des fonctions mitochondriales et cellulaires, ces deux processus doivent être finement régulés. Pour preuve, les atteintes génétiques de cette machinerie provoquent des pathologies qui touchent plus particulièrement le système nerveux et notamment les nerfs optiques. De plus, une altération de la dynamique mitochondriale est impliquée dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives fréquentes, conduisant généralement à une hyper-fission du réseau mitochondrial. Cette hyper-fission correspond à une individualisation des mitochondries qui deviennent plus courtes et isolées conduisant plus ou moins à court terme à la mort cellulaire.

D'autre part, dans certaines pathologies neurodégénératives présentant une altération de la dynamique mitochondriale, un défaut du métabolisme mitochondrial est également retrouvé, dont notamment une diminution de la phosphorylation oxydative. Ainsi, la dynamique et la bioénergétique mitochondriale semblent liées, cependant leurs relations précises restent floues. La régulation de la dynamique mitochondriale est un phénomène complexe, et sa compréhension est cruciale pour le développement d'approches thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives ou plus largement, mitochondriales. Au moins trois mécanismes différents, non exclusifs les uns des autres, jouent probablement un rôle important dans les processus moléculaires permettant l'adaptation de la fusion/fission mitochondriales à l'état bioénergétique de la cellule :

premièrement, l'expression des facteurs clés de la dynamique mitochondriale est régulée au niveau transcriptionnel ; deuxièmement, plusieurs voies de signalisation cellulaire modulent l'activité des protéines de fusion et de fission par modification post-traductionnelle; et troisièmement, l'activité de la machinerie de fusion mitochondriale pourrait répondre directement à l'état bioénergétique des mitochondries. De nombreux progrès ont été réalisés sur la compréhension des acteurs de la fission et des mécanismes de régulation transcriptionnelle et plus particulièrement post-traductionnelle, qui seront détaillés en introduction de cette thèse. Cependant, les signaux internes aux mitochondries, les mécanismes bioénergétiques et leur cinétique à l'origine de cette fission ne sont pas encore parfaitement connus.

Le principal objectif de mon travail de thèse a ainsi été d'étudier le lien entre l'activité bioénergétique de la mitochondrie et sa dynamique. Le potentiel de membrane mitochondrial, la production de ROS ainsi que la synthèse d'ATP sont trois paramètres clés du métabolisme énergétique mitochondrial. D'après la littérature, la modulation de l'une ou l'autre de ces constantes pourrait conduire à la fission du réseau mitochondrial. L'objectif était donc de comprendre comment la structuration tubulaire mitochondriale résiste aux variations de ces constantes et de préciser les voies de signalisation internes induisant la fission mitochondriale. Pour ce faire, nous avons étudié la modulation des constantes bioénergétiques suite à une inhibition pharmacologique de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase à l'aide de différents inhibiteurs (inhibiteurs des complexes I : roténone (R), III : antimycine (A) et V : oligomycine (O)) dans des fibroblastes de peau sains. Suite à nos résultats, l'étude a été également réalisée sur des fibroblastes primaires d'une bio-collection de patients porteurs de mutation de l'ATP synthase. Une collaboration avec le Pr Isabelle MAYSTADT de l'Institut de Pathologie et de Génétique Centre de Génétique Humaine de Belgique, nous a également permis d'accéder à un fibroblaste de patient muté sur la protéine DRP1, que nous avons caractérisé.

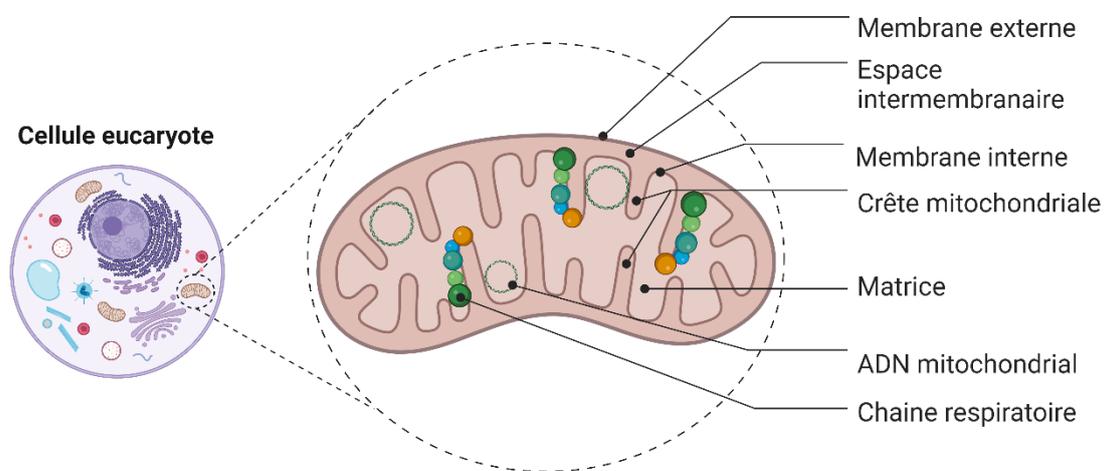


Figure 1 : Représentation schématique de la structure des mitochondries

Introduction

1. Généralités sur la mitochondrie

1.1. Historique – origine

Les mitochondries sont des organites de quelques micromètres présentes dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Chaque cellule humaine contient plusieurs centaines voire quelques milliers de mitochondries, selon le type de cellule et leur métabolisme. Elles sont considérées comme la centrale énergétique de la cellule de par leur rôle majeur dans la production d'énergie via la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs. Cependant, les mitochondries sont également le siège de nombreuses synthèses et autres fonctions comme l'apoptose ou la génération d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS).

Elles ont été observées pour la première fois en 1857, lorsque Rudolf Albert Von Kölliker décrit lors d'une analyse microscopique la présence de « granules » au sein de nombreux types cellulaires. Lors des études menées sur la structure de ce compartiment dans les années 1890, elles furent nommées « mitochondries » qui vient du grec « mitos » (filament) et chondrios (granules) (Benda 1898). Selon la théorie endosymbiotique émise par Lynn Margulis dans les années 1970 (Margulis 1970), les mitochondries proviendraient d'un évènement d'endocytose d'une α -protéobactérie par l'ancêtre de la cellule eucaryote, une hypothèse soutenue par leurs similarités biochimiques et génétiques (Gray, Burger, et Lang 1999).

1.2. Structure

Les mitochondries mesurent entre 0.5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre plus de 20 μm de longueur. Il est reconnu que les mitochondries peuvent se présenter sous différentes formes, que ce soit au niveau de leur aspect général (rondeur, largeur, longueur), ou de leur ultrastructure (organisation des membranes mitochondriales). De ce fait, elles présentent de nombreuses variations entre cellules, au cours du cycle cellulaire et en fonction des signaux métaboliques. Les mitochondries ont une architecture membranaire complexe, reposant sur une double membrane qui délimite des compartiments distincts, que sont l'espace inter-membranaire, l'espace intra-crête et la matrice (Mannella et al. 2001) (Figure 1).

La Membrane Externe est formée d'une bicouche lipidique comportant un grand nombre de protéines dont des enzymes, des porines, des protéines de la machinerie de translocation et d'insertion des précurseurs protéiques d'origine nucléaire (ADN génomique) (Walther et al. 2009). La perméabilité de cette membrane est

assurée par différentes familles de protéines de type β -barrel impliquées dans le transport ionique et peptidique. On retrouve notamment les porines ou « Voltage-Dependant-Anion-Channel » (VDAC) pour le transport des molécules inférieures à 4-5 kDa (Maldonado et Lemasters 2012) et les « Translocase of the Outer Membrane » (TOM) pour le transport des molécules supérieures à 10 kDa (Schnell et Hebert 2003), plus spécifiquement impliquées dans le transport des protéines mitochondriales. En effet, la plupart des protéines mitochondriales sont synthétisées hors de la mitochondrie et possèdent un signal d'adressage qui leur permet l'importation mitochondriale (Dudek, Rehling, et van der Laan 2013).

La Membrane Interne double la membrane externe en face interne et forme des replis appelés crêtes mitochondriales. Au sein de ces crêtes sont insérés les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, assurant la chaîne des oxydations, lesquelles sont couplées à la phosphorylation de l'ADP + phosphate inorganique (Pi) en ATP au niveau de l'ATP synthase. Cette membrane à une composition particulièrement riche en protéines (environ 80%) et enrichie en cardiolipines, qui lui confèrent une moindre perméabilité que la membrane externe (Gohil et Greenberg 2009). Ces cardiolipines sont impliquées dans la fluidité, la courbure de la membrane interne et dans la stabilisation des complexes et supercomplexes de la chaîne respiratoire et interagissent avec de nombreuses protéines de la machinerie des translocases « Translocase of Inner Membrane » (TIM) (Zhang, Mileykovskaya, et Dowhan 2002). Cette membrane étant peu perméable, elle possède des transporteurs spécifiques tels que l'adénine nucléotide translocase (ANT) permettant l'échange d'ADP et d'ATP, le transporteur du Pi (PiC) ou les TIM permettant le passage des protéines dans la matrice.

L'espace intra-crête est un espace clos contrôlé par les points de jonction des crêtes. Le diamètre de cette jonction varie entre 12 et 40nm. Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que les protéines ancrées aux niveaux de ces jonctions de crêtes comme le complexe MICOS (Mitochondrial contact site and cristae organizing system) ou OPA1 (optic atrophy 1) empêcheraient la diffusion de cofacteurs, ions ou molécules comme le cytochrome *c*, les protons (H⁺) ou l'ADP (Eydt et al. 2017; Glytsou et al. 2016), c'est pourquoi ce compartiment serait particulièrement riche en H⁺.

L'espace intermembranaire se situe entre les deux membranes mitochondriales. Sa composition est proche du cytosol cellulaire mais son pH est plus faible en raison de sa forte concentration en protons (pH=7,3 pour le cytosol contre pH=7 pour l'espace inter-membranaire et pH=8 pour la matrice).

La matrice est délimitée par la membrane interne. Ce compartiment est très actif métaboliquement puisqu'il est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la biosynthèse de l'hème et des centres Fer-Soufre et les synthèses nucléotidiques. Selon les tissus, la matrice contient également un ensemble d'enzymes impliqué dans le cycle de l'urée, la néoglucogénèse, ou encore la synthèse d'hormones stéroïdes. Au niveau matriciel se retrouve les nucléoïdes ou ADN mitochondrial associés à des protéines impliquées dans sa réplication et son expression. Les mitochondries disposent en effet d'un génome mitochondrial dont la transmission est maternelle, constitué d'un ADN double brin circulaire de 16 569 paires de bases chez l'Homme (Schatz 1995). Les nombreuses copies d'ADNmt sont distribuées dans l'ensemble du réseau mitochondrial ([The Conversation, https://theconversation.com/images-de-science-la-dynamique-des-mitochondries-eclairée-par-la-microscopie-a-fluorescence-166361](https://theconversation.com/images-de-science-la-dynamique-des-mitochondries-eclairée-par-la-microscopie-a-fluorescence-166361)). La séquence d'ADNmt porte

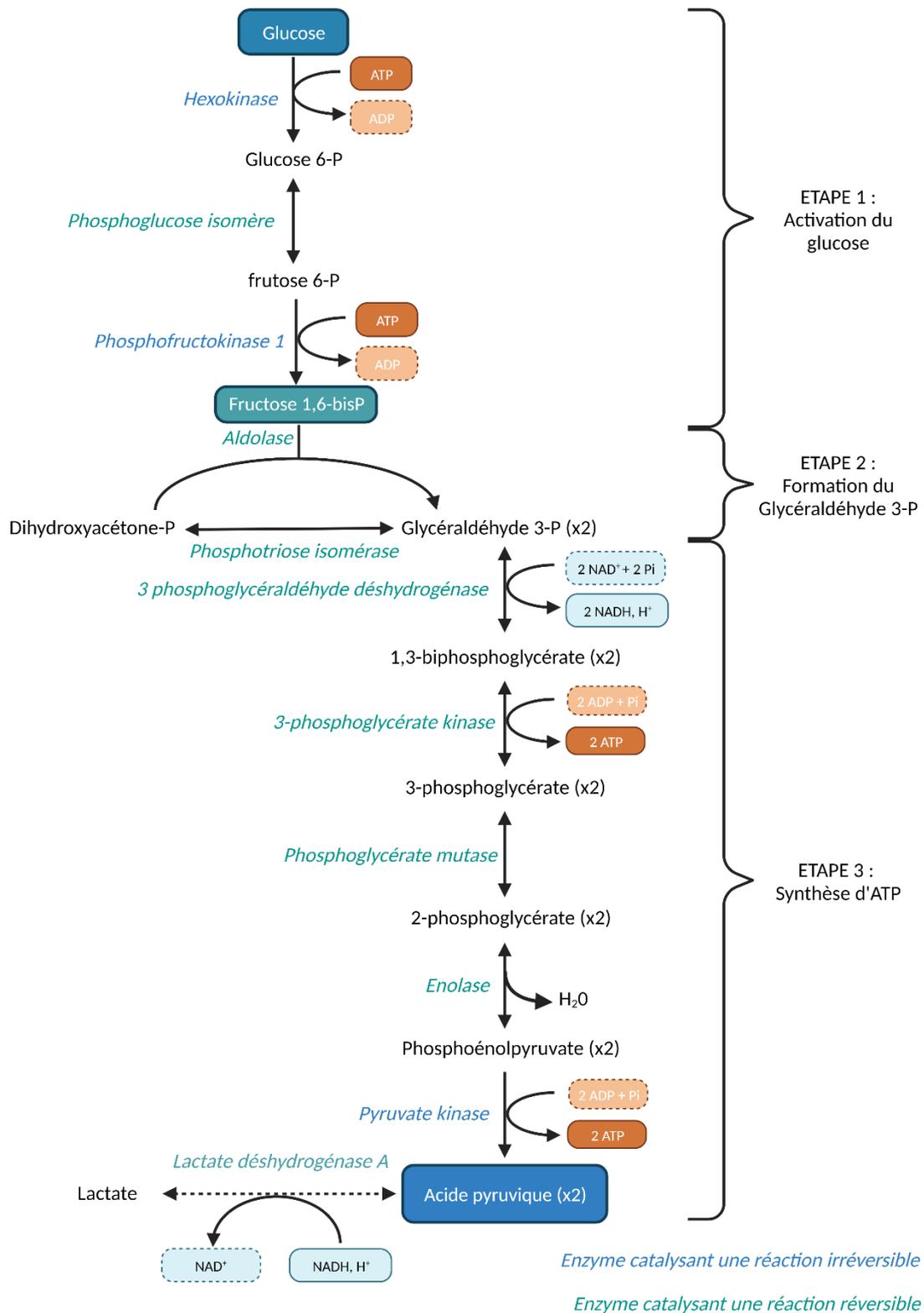


Figure 2 : Les différentes réactions enzymatiques de la glycolyse et la lactate déshydrogénase (inspiré de (Judge et Dodd 2020)).

La glycolyse implique 10 réactions enzymatiques qui permettent de transformer le glucose en 2 molécules de pyruvate, générant ainsi 2 molécules d'ATP et 2 NADH, H⁺. Cette voie métabolique comporte 3 étapes majeures qui sont la phase d'activation, la formation du glycéraldéhyde 3-Phosphate et la synthèse d'ATP. En absence d'oxygène, entre autres, le pyruvate peut être converti en lactate par la lactate déshydrogénase.

37 gènes qui codent pour 22 ARN de transfert (ARNt), et 2 ARN ribosomiques (ARNr) indispensables pour la synthèse des protéines mitochondriales, ainsi que pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire.

2. Le métabolisme énergétique

La principale fonction de la mitochondrie est de synthétiser des molécules à haut potentiel énergétique, tel l'ATP. Cette production d'énergie se fait via la phosphorylation oxydative ou OXPHOS au niveau de la membrane interne mitochondriale. Les substrats réduits, NADH,H⁺ et FADH₂ soutenant les réactions d'oxydation au sein de la chaîne respiratoire sont essentiellement fournis par le catabolisme des glucides et des acides gras, i.e., la glycolyse et la β-oxydation, respectivement.

2.1. La glycolyse

2.1.1. Les étapes de la glycolyse

La glycolyse est la plus ancienne voie métabolique élucidée et qui est hautement conservée chez les êtres vivants. Le mot "glycolyse" est dérivé du grec "glykys", qui signifie "sucré", et "lysis", qui signifie "diviser", ceci fait référence à la dégradation d'une molécule de glucose produisant 2 molécules de pyruvate à la fin de la glycolyse (Chandel 2021). Le lieu des réactions de la glycolyse se situe dans le cytoplasme et celle-ci implique 10 réactions enzymatiques, qui peuvent se décomposer en 3 étapes majeures (Figure 2).

- La première étape, dite d'activation, transforme le glucose en deux trioses phosphates. Le glucose est phosphorylé et isomérisé par des réactions successives impliquant : l'hexokinase, la phosphoglucose isomérase et la phosphofructose kinase, aboutissant à la formation de fructose-1,6bisP. Cette étape nécessite la consommation de 2 molécules d'ATP.

- Lors de la deuxième étape, celui-ci est alors clivé en deux trioses phosphate (le dihydroxyacétone phosphate et le glycéraldéhyde phosphate) par l'aldolase. Le dihydroxyacétone phosphate est isomérisé en glycéraldéhyde phosphate par la phosphotriose isomérase.

- Enfin la troisième étape, dite de synthèse d'ATP, se compose de 5 réactions enzymatiques. Le glycéraldéhyde 3-phosphate est phosphorylé en 1,3-biphosphoglycérate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, conduisant à la formation de 2 NADH,H⁺. Puis le 1,3-biphosphoglycérate est transformé en 3-phosphoglycérate, permettant la formation de 2 molécules d'ATP. Le 3-phosphoglycérate va être isomérisé en 2-phosphoglycérate, réaction catalysée par la phosphoglycérate mutase, lequel est déshydraté, conduisant à la formation de phosphoénolpyruvate. Enfin ce dernier est converti en pyruvate grâce à la pyruvate kinase, libérant ainsi 2 nouvelles molécules d'ATP.

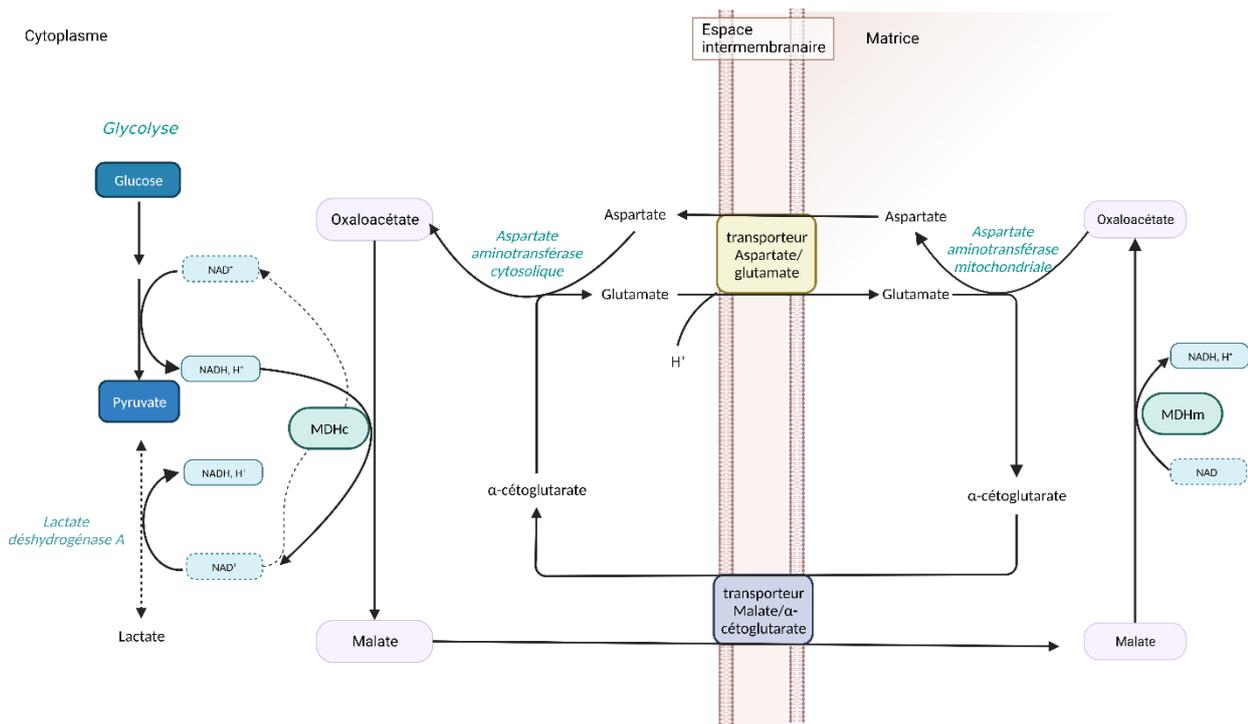
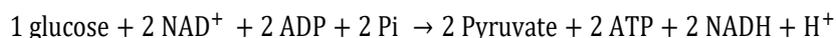


Figure 3 : La navette Malate/aspartate (McKenna et al. 2006)

Les électrons provenant de la glycolyse ou de l'oxydation du lactate en pyruvate sont transférés du NADH, H⁺ lorsque l'oxaloacétate (OA) est converti en malate par la malate déshydrogénase cytosolique (MDHc). Le malate entre dans la matrice mitochondriale via le transporteur malate/ α -cétoglutarate en échange de l' α -cétoglutarate (α -CG). Les électrons sont transférés à la chaîne de transport d'électrons lorsque le malate est oxydé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase mitochondriale (MDHm). L'OA + glutamate est ensuite converti en aspartate + α -CG par l'aspartate aminotransférase mitochondriale. L'aspartate quitte la mitochondrie via le transporteur aspartate-glutamate dans un échange contre du glutamate et un proton. Dans le cytosol, l'aspartate est convertie en OA avec l' α -cCG via l'aspartate aminotransférase cytosolique, complétant ainsi la navette.

En résumé, le glucose est phosphorylé, isomérisé et clivé en consommant 2 molécules d'ATP, pour produire 2 molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate. Ces molécules sont ensuite transformées en pyruvate conduisant à la libération de 4 molécules d'ATP et de 2 NADH,H⁺. Le bilan final est donc le suivant :



La glycolyse est finement régulée en fonction des besoins cataboliques ou anaboliques cellulaires, du statut redox (NAD/NAD⁺) et énergétique (ATP/ADP). Les produits de réactions régulent la glycolyse par rétro-contrôle, mais l'enzyme clé dans cette régulation est la phosphofructose kinase. Celle-ci est sous contrôle de nombreux effecteurs allostériques, en particulier l'ATP (inhibiteur) et l'AMP (activateur) (Lenzen 2014).

2.1.2. Glycolyse "anaérobie", glycolyse "aérobie" : recyclage du NADH et devenir du pyruvate

Le pyruvate est le produit final de la glycolyse. Son devenir définit en grande partie le type de métabolisme énergétique cellulaire, entre métabolisme préférentiellement glycolytique (glycolyse « anaérobie ») ou oxydatif (glycolyse aérobie «). Bien que les termes historiques d'anaérobie et aérobie soient encore généralement utilisés, l'orientation catabolique du pyruvate ne dépend pas uniquement de la disponibilité en oxygène, mais surtout, chez les organismes aérobies, de la voie de régénération du NADH,H⁺ et donc de l'équipement enzymatique de la cellule. En effet, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, le statut redox (rapport NADH,H⁺/NAD⁺) est un régulateur majeur de la glycolyse. La dégradation d'une molécule de glucose produit en effet 2 NADH,H⁺, lesquels doivent être réoxydés en NAD⁺ pour maintenir l'équilibre NAD⁺/NADH et permettre la poursuite de l'activité glycolytique, mais également éviter l'acidification intra-cytosolique.

Dans les cellules eucaryotes, cette réoxydation du NADH repose essentiellement sur 3 systèmes majeurs, l'un confiné au cytoplasme et impliquant la lactate déshydrogénase (LDH), les deux autres impliquant des systèmes de navettes combinant des enzymes cytosoliques et mitochondriales et couplées à l'activité de la chaîne respiratoire. La membrane interne mitochondriale étant imperméable au NADH, le recyclage du NADH en NAD⁺ se fait grâce à deux grandes navettes. Celles-ci transfèrent les électrons du NADH cytosolique au sein de la mitochondrie sans transport de la molécule à travers la membrane interne. Ce sont les navettes glycérol 3-phosphate (Estabrook et Sacktor 1958) et malate/aspartate (MacDonald 1982).

La navette malate/aspartate est relativement abondante dans les neurones et est considérée comme la navette la plus importante du cerveau (Cheeseman et Clark 1988). Cette navette est composée de plusieurs protéines dont : le transporteur aspartate/glutamate, le transporteur malate/ α -cétoglutarate, de deux malates déshydrogénases (MDH), l'une cytosolique et l'autre mitochondriale et de l'aspartate aminotransférase. Ainsi, la navette malate/aspartate permet, dans le cytosol, de transférer les électrons du NADH à l'oxaloacétate en formant du malate, lequel est transporté à la matrice mitochondriale contre une sortie de α -cétoglutarate. Au sein de la matrice mitochondriale, le malate forme de nouveau de l'oxaloacétate et un NADH, H⁺ via la MDH2 mitochondriale, ce NADH est finalement oxydé au sein de la chaîne respiratoire (figure 3).

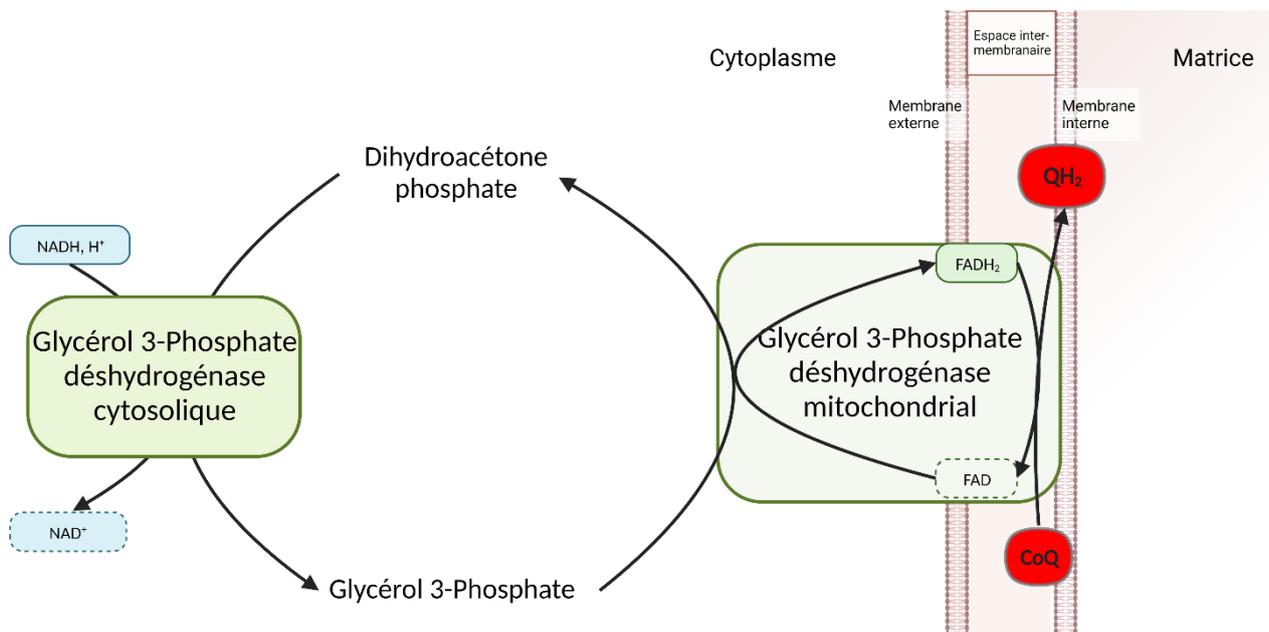


Figure 4 : La navette Glycérol 3-Phosphate (McKenna et al. 2006)

Des électrons sont transférés du NADH lorsque le phosphate de dihydroxyacétone est réduit en glycérol 3-phosphate. Le glycérol 3-phosphate est ré-oxdé en dihydroxyacétone phosphate par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase mitochondriale qui est liée au FAD sur la membrane mitochondriale interne et les électrons sont transférés au coenzyme Q (CoQ) et entrent ensuite dans la chaîne de transport des électrons.

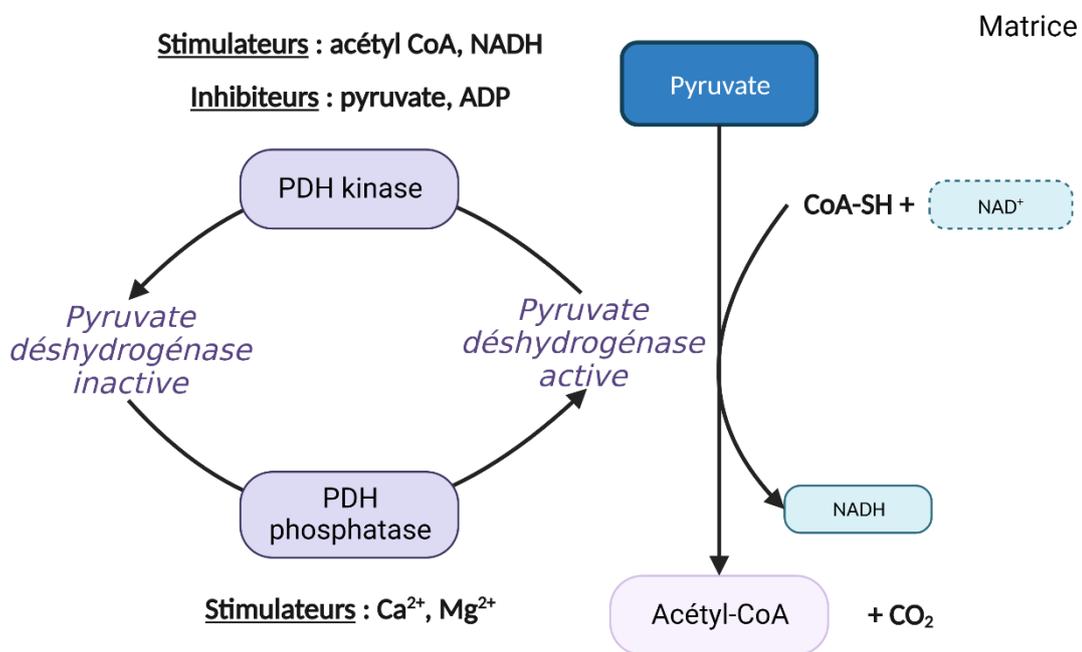


Figure 5 : Régulation de la pyruvate déshydrogénase (Stanley et al. 1997).

La pyruvate déshydrogénase PDH est l'enzyme catalysant la formation d'Acétyl CoA à partir du pyruvate. Cette enzyme est activée par sa déphosphorylation par la PDH phosphatase et inactivé par sa phosphorylation par la PDH kinase.

La navette glycérol 3-phosphate est relativement abondante dans le foie et se compose de deux glycérol 3-phosphate déshydrogénase. Le NADH réduit est transféré au dihydroacétone phosphate grâce à la glycérol 3-Phosphate déshydrogénase (G3PDH) cytosolique pour former du glycérol 3-Phosphate. Ensuite le glycérol 3-Phosphate est converti en dihydroacétone phosphate au niveau de la membrane mitochondriale externe par la G3PDH mitochondriale. Le glycérol 3-Phosphate mitochondrial est lié à un groupement FAD, ainsi les électrons peuvent être transférés au Coenzyme Q et entrent ensuite dans la chaîne de transport des électrons (Figure 4) (McKenna et al. 2006).

Dans ces deux cas, l'équilibre NADH/NAD⁺ cellulaire est donc lié à l'activité oxydative mitochondriale. En absence d'oxygène, mais également en cas de diminution ou de dysfonction de la chaîne respiratoire, ces navettes ne permettent plus un recyclage du NADH suffisant, et celui-ci va de plus en plus reposer sur l'activité de la lactate déshydrogénase ou LDH au niveau du cytosol. La LDH est une enzyme ubiquitaire qui converti le pyruvate en L-lactate couplée à l'oxydation du NADH. Dans ce cas, le recyclage du NADH est indépendant de l'activité mitochondriale, on parle alors de glycolyse anaérobie ou métabolisme glycolytique. Cette conversion du pyruvate par la LDH est réversible et joue un rôle essentiel dans le maintien du ratio NAD⁺/NADH cytosolique (Figure 2). Ce ratio est assez constant dans le cytosol, de ce fait, la rapport Lactate/Pyruvate augmente ou diminue selon la conversion du NADH en NAD⁺.

De même que le maintien de l'équilibre NADH/NAD⁺ et la réoxydation du NADH sont couplés soit à un métabolisme dit glycolytique ou soit au métabolisme oxydatif, le pyruvate peut donc être converti en lactate au niveau cytosolique, ou être transporté au sein de la matrice mitochondriale grâce à des transporteurs spécifiques (MPC 1 et 2 : Mitochondrial Pyruvate Carrier) (McCommis et Finck 2015). Il sera décarboxylé en acétyl-CoA grâce à la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour alimenter le cycle de Krebs et, ainsi, la production d'ATP mitochondriale : on parle alors de glycolyse aérobie ou métabolisme oxydatif. L'activité catalytique de ce complexe est finement régulée par les pyruvates déshydrogénases kinases (PDH kinase) et les pyruvates déshydrogénases phosphatases (PDH phosphatase). Les PDH Kinases sont capables de phosphoryler la PDH conduisant à son inhibition tandis que les PDH phosphates vont déphosphoryler la PDH permettant son activation (figure 5). En présence d'une concentration élevée en NADH et/ou acétyl CoA, la phosphorylation de la PDH par la PDH kinase inhibe l'entrée de pyruvate au sein de la mitochondrie, Inversement, une concentration élevée en ADP et/ou en pyruvate conduit à la déphosphorylation de la PDH par la PDH phosphatase, ce qui permet l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie. Ainsi, cette régulation de la PDH permet une adaptation fine du devenir du pyruvate et du métabolisme énergétique selon les statuts réductant (NADH/NAD⁺) et énergétique (ADP/ATP) cellulaires.

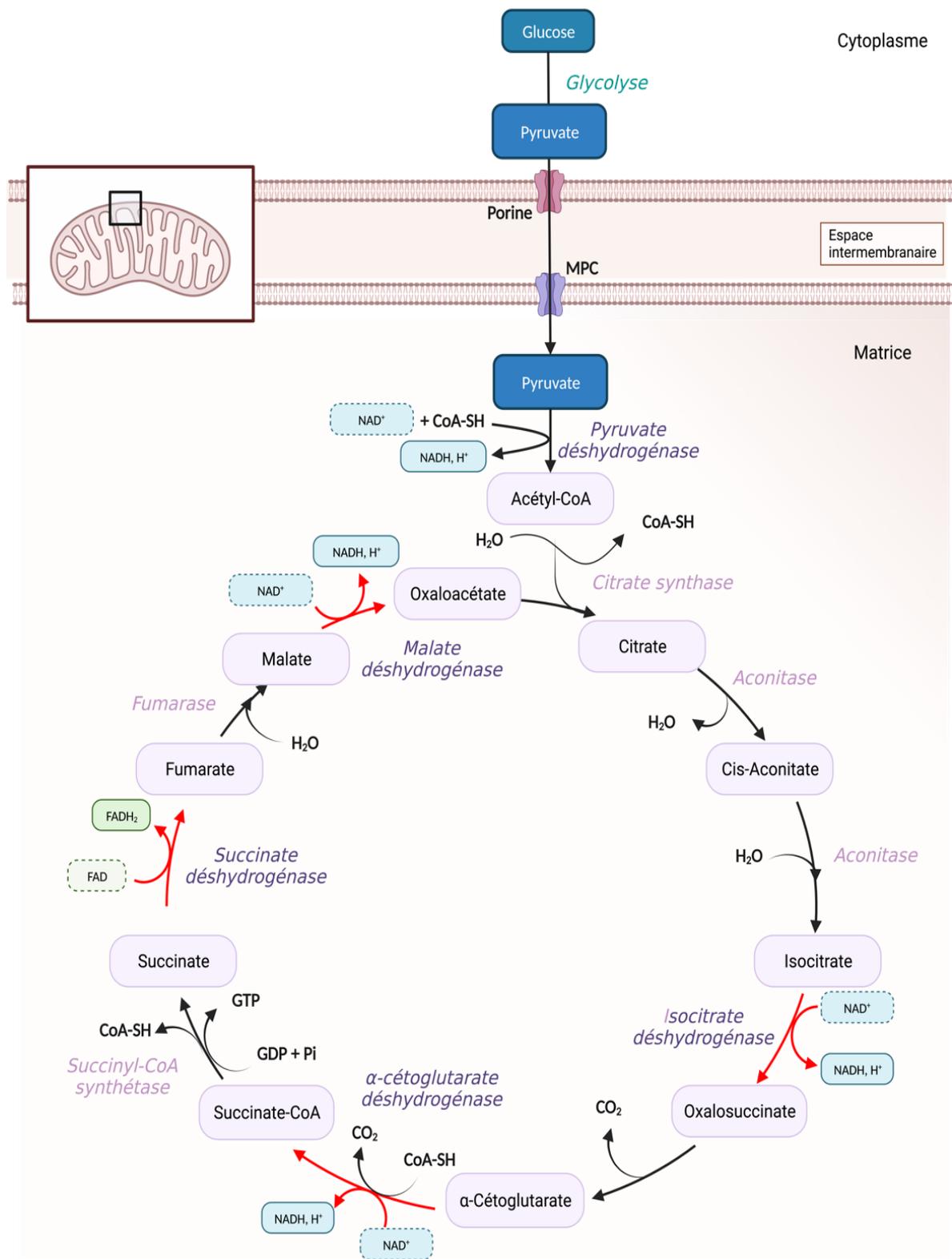


Figure 6 : Les différentes réactions du cycle de Krebs (Martínez-Reyes et Chandel 2020).

Le cycle de Krebs est un ensemble de 10 réactions biochimiques successives permettant la production d'une molécule de GTP, de 3 molécules de NADH et d'une molécule de FADH₂. MPC : mitochondrial pyruvate carrier.

2.2. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (Martínez-Reyes et Chandel 2020) est une voie métabolique localisée dans la matrice mitochondriale, indispensable pour la réduction des composés NAD^+ et FAD^+ en NADH et FADH_2 (Figure 3). Ces cofacteurs sont primordiaux pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Il est initié par la condensation de l'acétyl-CoA, produit à partir du pyruvate, et de l'oxaloacétate pour former du citrate grâce à la citrate synthase. Par la suite, 9 réactions biochimiques vont successivement s'enchaîner (Figure 6) libérant ainsi les cofacteurs réduits que sont le NADH et le FADH_2 . Au final, cet ensemble de réactions biochimiques permet la formation d'une molécule de GTP, 3 molécules de NADH et une molécule de FADH_2 , auxquelles s'ajoute un NADH généré par la PDH. Ces cofacteurs réduits sont ensuite oxydés par la chaîne respiratoire lors de la synthèse d'ATP.

2.3. La phosphorylation oxydative ou OXPHOS

2.3.1. Fonctionnement

La principale fonction des mitochondries est donc la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi). Sa production se fait par un ensemble de réactions biochimiques d'oxydo-réduction au niveau de la chaîne respiratoire enchâssée au sein des crêtes, couplé à la phosphorylation de l'ADP + Pi par l'ATP synthase, ce couplage est appelé phosphorylation oxydative (OXPHOS, figure 7).

La chaîne de transfert d'électrons (ETC) comprend 4 complexes, chacun composé de multiples sous-unités, intégrées à la membrane mitochondriale interne. Ces complexes sont fonctionnellement et physiquement liés entre eux : le complexe I (CI, NADH Ubiquinone réductase), le complexe II (CII, succinate ubiquinone réductase), le complexe III (CIII, ubiquinol cytochrome c réductase) et le complexe IV (CIV, cytochrome c oxydase). L'ETC transfère le potentiel énergétique des électrons issus du NADH/NAD^+ et FADH_2/FAD , essentiellement apportés aux complexes de la chaîne respiratoire par le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras, en une force proto-motrice (Δp). Ce processus implique une série de transfert séquentiel des électrons le long de l'ETC d'un état réduit à un état oxydé : les coenzymes réduits NADH et FADH_2 vont respectivement être réduits par les complexes I et II, et transférés par le coenzyme Q10 au complexe III. Un cytochrome, le cytochrome c, permet ensuite le transfert des électrons entre les complexes III et IV, pour finalement réduire l'oxygène moléculaire en une molécule d'eau (Figure 7).

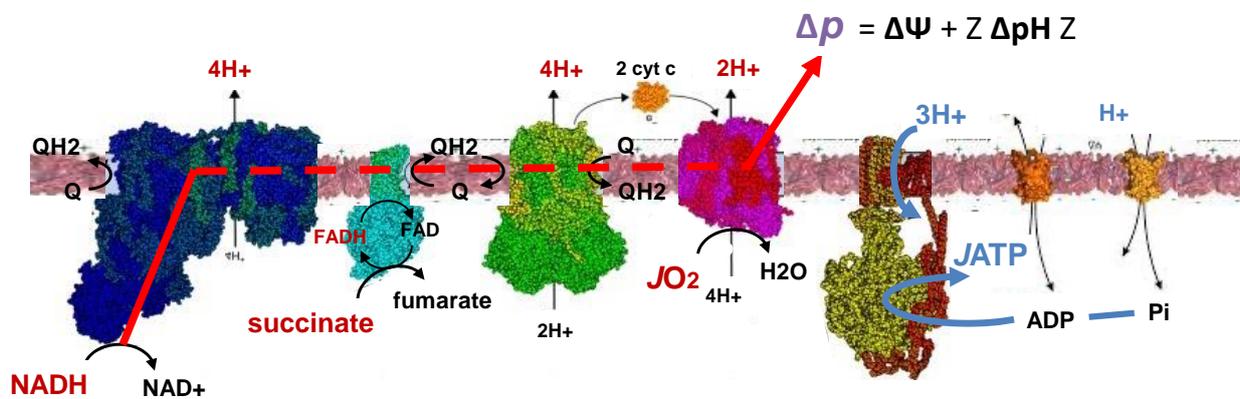


Figure 7 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative.

La chaîne respiratoire est constituée des complexes I à IV, dont l'activité est étroitement associée à celle du complexe de l'ATP synthase : les coenzymes réduits NADH et FADH₂ fournissent les électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces électrons sont ainsi transportés du complexe I (NADH) ou du complexe II (FADH₂) jusqu'au complexe IV pour réduire l'oxygène en eau (oxydation, ou respiration). Ce transport d'électrons s'accompagne d'un pompage de protons H⁺ par les complexes I, III et IV de la matrice vers l'espace intra-crête. Ceci permet de créer un gradient de proton, ou force protomotrice nécessaire à l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP (phosphorylation). On parle donc de couplage Oxydation-PHOSphorylation.

La libération d'énergie libre pendant le transfert d'électrons permet un pompage de protons (H^+) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV, ce qui génère un gradient électrochimique de protons, ou Δp . Le Δp est constitué de deux composantes : une composante de charge ou potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$, généralement compris entre -150 et -180 mV) et une composante chimique ou gradient de pH (ΔpH). Plusieurs autres oxydoréductases de l'ETC sont incapables de pomper les protons, en particulier le complexe II, la glycérol phosphate déshydrogénase et la quinone oxydoréductase (ETF), flavoprotéine de transfert des électrons liée à la β -oxydation des acides gras. Ainsi, dix protons sont extrudés pour chaque paire d'électrons transférée du NADH à l'oxygène, ou six protons pour chaque paire d'électrons transférée du $FADH_2$ à l' O_2 (Brand, 2005).

L'énergie disponible dans ces deux forces constituant le Δp permet la synthèse de l'ATP, lorsque le flux de H^+ retourne à la matrice au travers de l'ATP synthase (Mitchell 1961) (Figure 7). Le module de synthèse de l'ATP comprend, en plus de l'ATP synthétase, l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) pour l'échange ADP/ATP et le transporteur de phosphate inorganique (P_iC). Dans la plupart des circonstances, le flux de protons est étroitement couplé à la phosphorylation. Cependant, le Δp peut également être dissipé par des processus de fuite de protons (Divakaruni et Brand, 2011), dans laquelle les protons retournent dans la matrice indépendamment de la synthèse d'ATP, diminuant l'efficacité du couplage OXPHOS. Le Δp peut également être utilisé pour des transports à travers la membrane interne mitochondriale tels que des transports de métabolites, d'ions ou de calcium (De Stefani, Rizzuto, Pozzan, 2016).

Le Δp , et particulièrement sa composante $\Delta\psi_m$, est donc central aux fonctions physiologiques des mitochondries, reliant le module de synthèse de l'ATP à l'oxydation des substrats. Il a été montré qu'en dessous d'un potentiel d'environ -120mV, la synthèse d'ATP ne peut plus être catalysée. Un $\Delta\psi_m$ minimal est également une force motrice indispensable pour le transport d'ions et métabolites et de protéines nécessaires au bon fonctionnement des mitochondries. Le $\Delta\psi_m$ joue donc un rôle clé dans l'homéostasie mitochondriale, déterminant la viabilité des mitochondries ou participant à l'élimination sélective des mitochondries dysfonctionnelles (cf paragraphe 3.4 ci-dessous).

En condition physiologique, le niveau de $\Delta\psi_m$ dans la cellule est donc maintenu relativement stable, bien que des fluctuations limitées puissent se produire, reflétant les variations de l'activité cellulaire. En effet, le flux total de protons est à l'équilibre : le pompage des protons (activité de l'ETC) est équivalent à leur retour à la matrice (synthèse d'ATP \pm fuite de protons). Autrement dit, toute augmentation de synthèse en ATP, en diminuant le Δp , est suivie d'une augmentation en retour du transfert d'électrons et du pompage de protons, et *vice versa*. L'activité de l'ATP synthase est donc un déterminant majeur du $\Delta\psi_m$, de l'activité de la chaîne respiratoire et, plus en amont, du catabolisme des glucides et acides gras permettant l'apport en substrat.

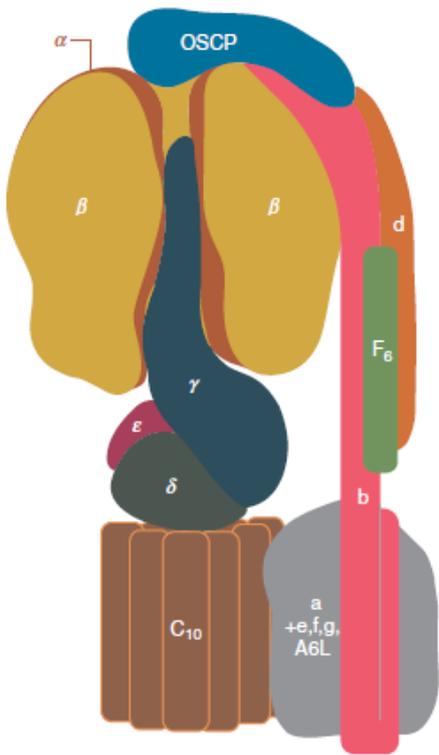


Figure 8 : Organisation des sous unités de la F1F0-ATP synthase mitochondriale (Devenish, Prescott, et Rodgers 2008)

Le domaine globulaire F1 est composé des sous-unités α et β et de trois sous-unités de la tige centrale : γ , δ et ϵ . Le domaine F0 est composé de la sous-unité c en 8 copies, de la sous-unité a et des sous-unités de la tige périphérique : b, d, f et OSCP

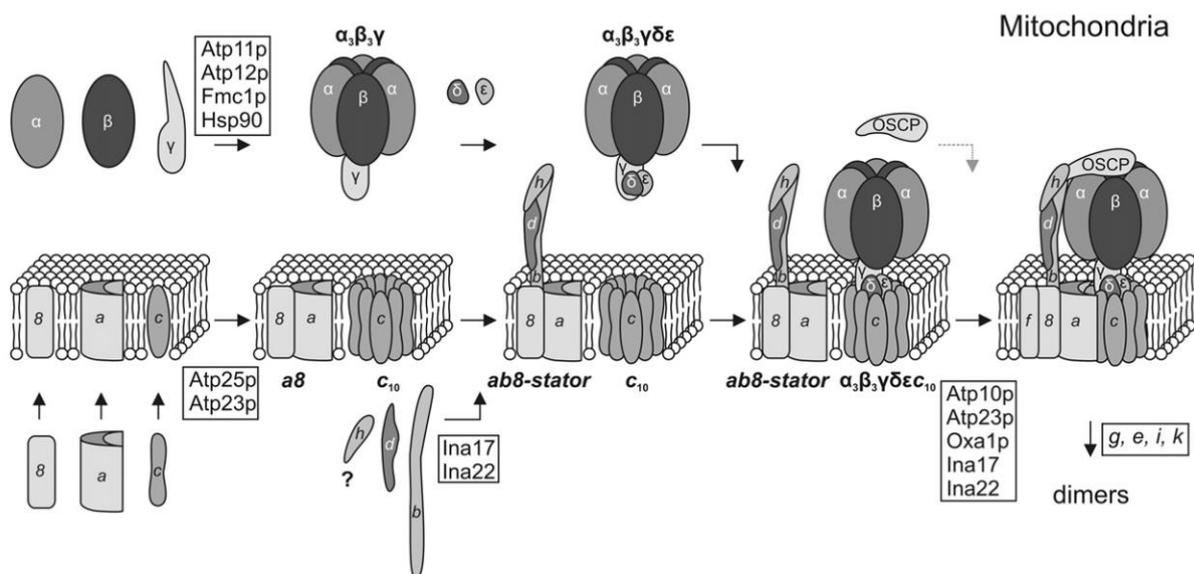


Figure 9 : Représentation schématique de l'assemblage de l'ATP synthase mitochondriale (Rühle et Leister 2015)

Le module F1 soluble ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) s'assemble indépendamment du F0 et du module stator. L'anneau c (c8) représente un deuxième module d'assemblage. Le troisième module précurseur est composé des deux sous-unités F0 a et 8 intégrées à la membrane (a8), est également assemblé séparément des autres composés F0 et semble former un complexe transitoire avec au moins deux sous-unités stator (ab8-stator).

2.3.2. L'ATP synthase ou F₀F₁-ATP synthase

a) Structure

L'ATP synthase mitochondriale, ou F₀F₁-ATP synthase, est l'enzyme clé de la phosphorylation oxydative. Cette enzyme de 597 kDa est composée de 15 sous-unités protéiques dont deux sont codées par le génome mitochondrial (MT-ATP6 et MT-ATP8) (Anderson et al. 1981). Sa structure chez le mammifère a été élucidée notamment grâce aux travaux de l'équipe de Sir John E. Walker (Abrahams et al. 1994). Elle est formée grossièrement de deux domaines : un domaine F₀ enchâssée dans la membrane interne mitochondriale et une tête globulaire ou domaine F₁, hydrosoluble et matriciel (Figure 8). Ces deux domaines sont reliés par une tige périphérique (stator) qui fait structurellement partie du domaine F₀, et une tige centrale, qui est associée au secteur F₁ (Walker 2013).

Le domaine F₀ est composé d'un rotor constitué, chez les mammifères, d'une répétition de 8 copies de la sous-unité c, de deux copies de la sous-unité b au niveau de la tige périphérique (stator) et d'une copie de la sous-unité a (MT-ATP6) intégrée dans la membrane. Cette sous-unité a forme deux semi-canaux à l'interface des sous-unités c à travers lesquels les H⁺ circulent. Le secteur F₀ eucaryote est constitué de plus des sous-unités accessoires IF₁, A6L, e, f et g et, chez les vertébrés, de 2 sous-unités supplémentaires, DAPIT et 6.8PL. La partie distale du stator eucaryote est constituée d'une copie des sous-unités b, F₆, d et OSCP (Devenish, Prescott, et Rodgers 2008; Guo et Rubinstein 2022; He et al. 2018; Kühlbrandt 2019).

Le domaine catalytique F₁ est composé de 3 dimères des protéines α et β entourant la tige centrale constituée des protéines γ , δ et ϵ (Guo et Rubinstein 2022). Les sites de liaison des nucléotides catalytiques (ADP, ATP) sont situés au niveau des trois sous-unités β aux interfaces avec les trois sous-unités α respectives.

b) Assemblage

Le complexe V s'assemble à partir de trois modules déjà préformés correspondant à : la particule F₁, l'anneau c8 et la tige périphérique (Figure 9) (Jonckheere, Smeitink, et Rodenburg 2012). Les sous-unités α et β du module F₁ sont assemblées ensemble grâce à l'assistance des molécules chaperons ATP11 et ATP12 (Ackerman et Tzagoloff 1990; Wang et al. 2000; Wang, White, et Ackerman 2001; Wang et Ackerman 2000). Il a été montré qu'en l'absence de l'un des chaperons, l'hexamère $3\alpha 3\beta$ ne se forme pas et les sous unités α et β s'agrègent en complexes insolubles (Lefebvre-Legendre et al. 2005). L'assemblage de l'anneau c8 est probablement la première étape de l'assemblage F₀ et se produit indépendamment de F₁. L'anneau c8 est codé par ATPG1, ATPG2 et ATP5G3 et assemblé dans la membrane interne, cependant, les mécanismes ne sont pas encore totalement connus. Récemment, l'étude de Bahri (Bahri et al. 2021) a démontré l'implication de TMEM70 et Su.c dans l'assemblage de l'anneau c8. La tige périphérique est le dernier module à s'assembler.

Une fois la réunion de l'anneau c8 et du module F1, la tige périphérique est incorporée en 2 étapes : d'abord les sous unités b, d, f et OSCP/ATP50, puis des sous unités e, g et f. La tige périphérique peut également s'assembler au module F1 en l'absence de l'anneau c8 (He et al. 2017, 2018). Pour terminer l'assemblage de l'ATP synthase, les sous unités DAPIT et 6.8PL sont incorporées (He et al. 2018).

c) Super-structure

Chez les eucaryotes, l'ATP synthase est organisée en dimère, en tétramère et parfois en hexamère (Mühleip et al. 2021). Les dimères de l'ATP synthase ont été découverts par Blue Native-PAGE lors de l'étude des complexes protéiques de la membrane mitochondriale interne (Arnold et al. 1998). Les connaissances sur la structure et le fonctionnement de l'ATP synthase ont pu être approfondies grâce aux études par cryo-EM chez la levure et les mammifères (Baker et al. 2012; Hahn et al. 2016). L'interface du dimère est formée principalement par les deux domaines F0 de façon que les deux monomères de l'ATP synthase forment un angle de $\approx 40^\circ$. Les résidus chargés et polaires en C-terminal de la sous-unité f (chez le mammifère) semblent responsables de l'interaction entre monomères, tandis que les sous-unités e et g, spécifiques du dimère, stabiliseraient celui-ci (Hahn et al. 2016). En effet, des expériences de liaison disulfure ont montré que les interactions entre les sous-unités e-g ou e-e/g-g augmentent la stabilité des dimères et oligomères de la F1FO-ATPase, respectivement, dans des extraits mitochondriaux traités à la digitonine (Bustos et Velours 2005; Nesci et al. 2021). Les oligomères semblent s'assembler spontanément à partir des dimères F0F1 à l'apex des crêtes mitochondriales.

De plus, ces études montrent que l'ATP synthase et son regroupement en dimères suffisent à induire la courbure de la membrane interne. Ainsi, les sous-unités e et g interagissent sous forme d'hétéromères, chacun avec un angle d'environ 50° chez la levure (Hahn et al. 2016), créant entre monomères de l'ATP synthase un sous-domaine qui plie la membrane mitochondriale interne. Ainsi, deux ATP synthases en contact via leurs sous-unités e et g plieraient une bicouche lipidique selon un angle de $\sim 86^\circ$ chez le bovin (Baker et al., 2012) à 100° (Hahn et al. 2016). L'étude de Paumard et al. (Paumard et al. 2002) suggère que les sous-unités e et g sont indispensables pour la formation des crêtes mitochondriales. En effet, leurs résultats sur *S. Cerevisiae* montrent une organisation interne des mitochondries altérée en l'absence de ces sous-unités. De plus, en l'absence de dimérisation de l'ATP synthase, la structure interne des mitochondries est également altérée. Les résultats de Minauro-Sanmiguel et al. (Minauro-Sanmiguel, Wilkens, et García 2005) confirment que l'angle entre les monomères de l'ATP synthase déterminerait la courbure observée au sein des crêtes mitochondriales (Anselmi, Davies, et Faraldo-Gómez 2018). En effet, ces dimères s'assemblent en forme de V et en une longue rangée d'oligomères ou en court ruban sur les bords des crêtes mitochondriales, leur donnant leur courbure finale (Kühlbrandt 2019).

L'oligomérisation de l'ATP synthase ne permettrait pas seulement de maintenir la morphologie de la membrane interne, mais permettrait de plus l'efficacité catalytique élevée de la F0F1-ATP synthase (Bisetto et al. 2008). En effet, les travaux de Strauss, Hofhaus, (Strauss et al. 2008) suggèrent que les crêtes agiraient

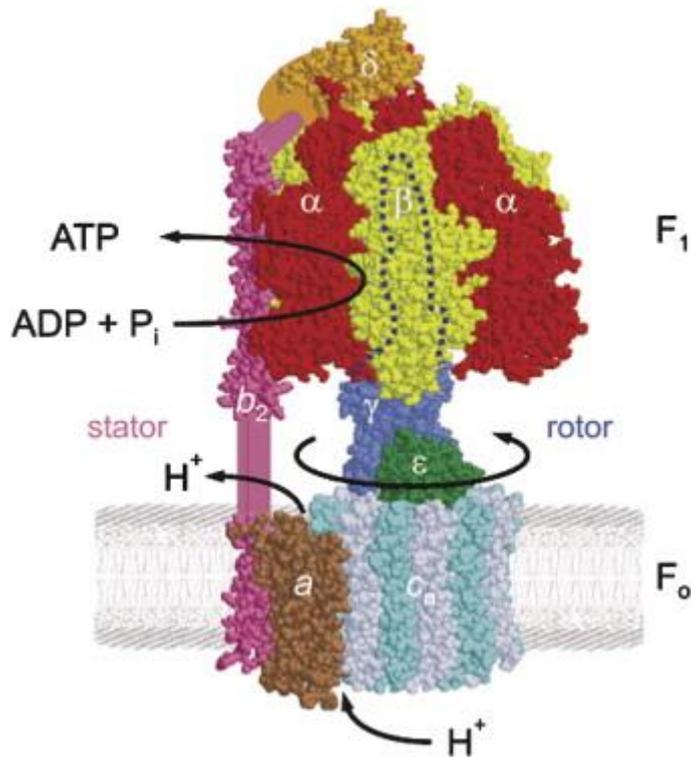


Figure 10 : Représentation schématique des activités catalytiques de l'ATP synthase (Y. Q. Gao, Yang, et Karplus 2005).

Le passage des H^+ dans le canal à l'interface de la sous-unité a et des sous-unités c induit la rotation de cet anneau c et de la tige γ , fournissant l'énergie mécanique nécessaire à la phosphorylation de l'ADP + P_i en ATP.

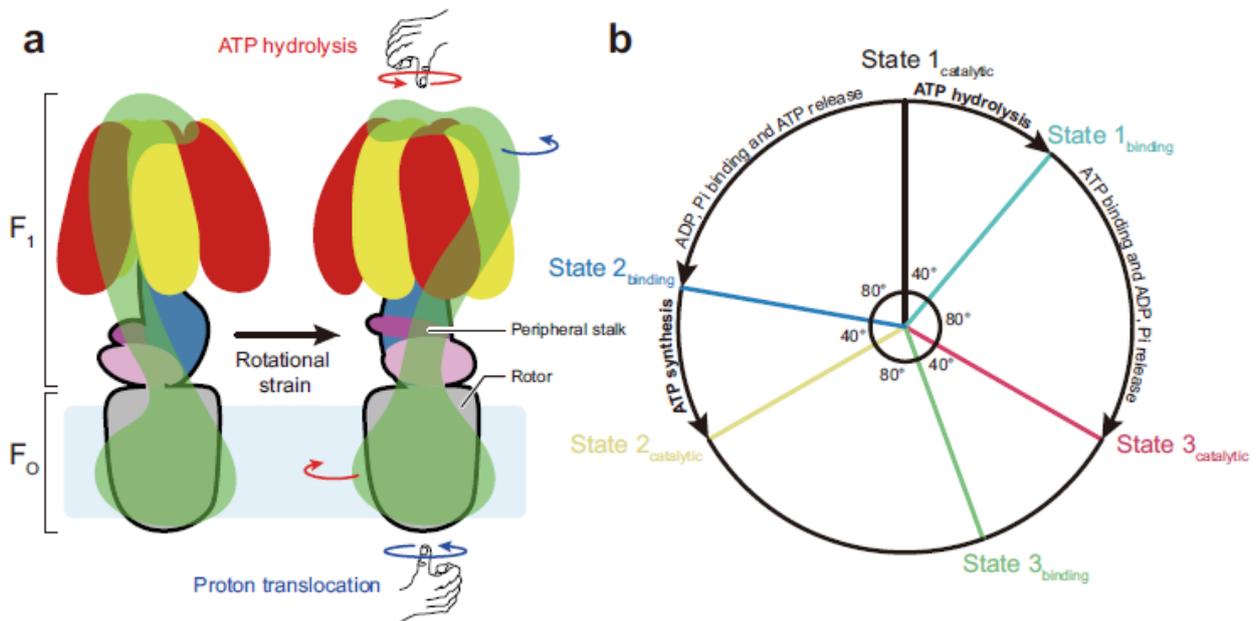


Figure 11 : Rotation de l'ATP synthase d'après (H. Guo et Rubinstein 2022, 22).

(a) La rotation entraînée par la translocation de protons dans le domaine F_0 (à gauche) ou la rotation opposée entraînée par l'hydrolyse de l'ATP dans la région F_1 (à droite) induit une courbure de la tige périphérique. (b) La synthèse ou l'hydrolyse de l'ATP dans le domaine F_1 nécessite 3 étapes de rotation (noir, jaune, rouge) et trois conformations de liaison (bleu clair, bleu et vert).

comme des « pièges » à protons, favorisant ainsi une synthèse efficace de l'ATP par l'ATP synthase localisée à l'apex, en particulier dans des conditions de limitation du flux de protons. Ces auteurs ont donc proposé que l'ATP synthase mitochondriale s'organiserait en dimères et oligomères pour optimiser ses propres performances, via la structuration des crêtes mitochondriales. Inversement, une altération de la morphologie des membranes affecte l'oligomérisation de l'ATP synthase. C'est notamment le cas dans le syndrome de Barth où le défaut de synthèse des cardiolipines conduit à l'altération des membranes internes, des crêtes mitochondriales et de la phosphorylation oxydative (Zegallai et Hatch 2021).

d) Fonctionnement

L'ATP synthase génère de l'ATP à partir d'ADP + Pi. Cette réaction enzymatique se situe au niveau du domaine F1 et nécessite la force protomotrice (Δp) générée grâce au passage des protons dans le domaine F0 (Figure 10). La synthèse d'ATP est donc réalisée grâce à l'activité de deux moteurs rotatifs que sont le domaine F1 et le domaine F0. En situation physiologique, le gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne favorise le retour des protons vers la matrice à travers le canal du domaine F0 entre la sous-unité a et l'anneau de la sous-unité c. Le passage du proton de l'espace intra-crête à la matrice libère de l'énergie ce qui provoque la rotation de l'anneau c ainsi que de la sous-unité γ à laquelle il est attaché. La rotation de la sous-unité γ au sein de l'hexamère F1 $\alpha_3\beta_3$ fournit l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP. Chaque site de liaison au niveau des sous-unités β et α passe par des changements de conformation par coopération dans lesquelles l'ADP et le Pi se lient, l'ATP est formé, puis libéré. Ce phénomène est appelé " catalyse rotative ". (Devenish et al. 2008).

Lors de la synthèse d'ATP, l'équipe de Yasuda et al, 2001 (Yasuda et al. 2001) a montré que la rotation de l'ATP synthase se déroule en 3 étapes, chaque étape est associée à un état de rotation de la partie F0 contre la tête F1. Pour chaque étape, la partie rotative tourne d'environ 120° auquel s'ajoute un tour complet de 360° (Martin et al. 2018). L'équipe de Shimabukuro et al, en 2003 (Shimabukuro et al. 2003) a détaillé plus précisément ce mécanisme : la liaison de l'ATP provoque une rotation de 80° en moins de 0.1ms, qui est suivie d'une hydrolyse durant 2ms, puis suivie d'une autre rotation de 40° (Figure 11). La corrélation entre le flux de protons et la rotation du rotor a été confirmée par la mesure du rapport H^+/ATP . Chez le mammifère, la stœchiométrie H^+/ATP a été établie à 2,7 (Watt et al. 2010). Ce couplage est perturbé par l'oligomycine, un antibiotique, qui se lie à l'anneau c, l'empêchant de tourner dans les deux sens, inhibant aussi bien la synthèse d'ATP que son hydrolyse (Symersky et al. 2012).

En effet, la réaction catalysée par l'ATP synthase est une réaction entièrement réversible, ainsi, en présence notamment d'un faible gradient de protons, l'ATP synthase est capable d'hydrolyser l'ATP matriciel. L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi entraîne la rotation opposée de la sous-unité γ et de l'anneau c, provoquant ainsi le pompage des protons vers l'espace inter-crête (Guo et Rubinstein 2022). Ce flux permettrait de maintenir un potentiel de membrane mitochondrial stable lorsque le $\Delta\Psi_m$ ne peut pas être maintenu par le

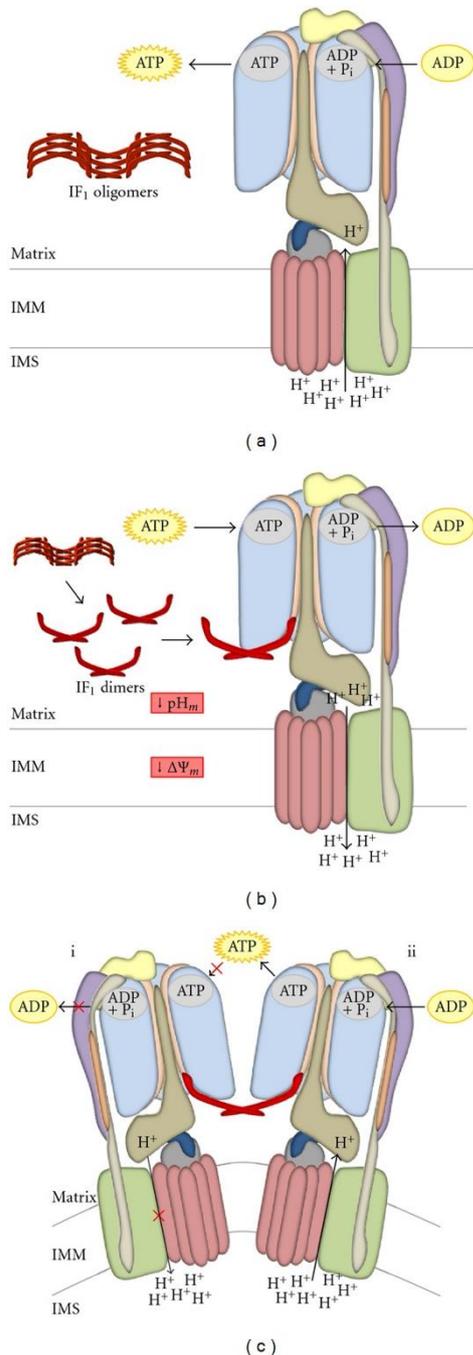


Figure 12 : Interaction de IF1 avec la F1Fo-ATPsynthase (Danilo Faccenda et Campanella 2012).

(A) En condition physiologique, i.e. en présence d'un gradient de protons suffisant, la F₀F₁-ATPsynthase synthétise de l'ATP; dans cette situation, le pH de la matrice est légèrement basique, et IF1 est principalement présent sous sa forme oligomérique inactive.

(B) En condition de chute importante du gradient de protons, la F₁F₀-ATPase commence à hydrolyser l'ATP importé du cytosol pour rétablir le Δψ_m. En parallèle, l'augmentation de [H⁺] dans la matrice induit une chute de pH, déstabilisant les oligomères d'IF1 et libérant les dimères actifs.

(C) La liaison des dimères IF1 à l'interface entre les sous-unités α- et β du domaine F1 est responsable de l'inhibition sélective de l'hydrolyse de l'ATP (c-i), alors que sa synthèse n'est pas affectée (c-ii). IF1 sous sa forme active est capable d'interagir avec deux domaines F1 en même temps, induisant la dimérisation de la F₁F₀-ATPsynthase.

fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, néanmoins, au prix d'une consommation d'énergie. C'est le fonctionnement reverse ou activité ATPase (Devenish et al. 2008).

e) Régulation de l'activité ATPase

L'ATP synthase est donc un moteur moléculaire entièrement réversible, dans lequel le sens de rotation change en fonction du Δp et du statut énergétique ATP/ADP (Kubo, Niina, et Takada 2020). Cette enzyme doit donc être régulée afin d'éviter une hydrolyse incontrôlée de l'ATP. Plusieurs niveaux de mécanismes régulent l'expression et l'activité de la F1Fo-ATP synthase : (a) une régulation transcriptionnelle (Grover et Malm 2008); (b) un contrôle traductionnel (Willers et Cuezva 2011); (c) des modifications post-traductionnelles (Long, Yang, et Yang 2015), cependant ces mécanismes ne régulent pas spécifiquement l'activité ATPase de cette enzyme. Différentes hypothèses ont émergé quant à la régulation de l'ATPase, faisant intervenir différentes sous-unités accessoires ou de petites protéines (Gibbons et al. 2000). En 1963 Pullman et Monroy (Pullman et Monroy 1963) découvrent que l'hydrolyse de l'ATP peut être bloquée par une petite protéine appelée IF1 (inhibit factor 1) (Figure 12).

Cette protéine de 106 acides aminés est codée par le gène *ATPIF1* localisé sur le chromosome 1 (Uniprot Q9UII2). L'inhibition de l'activité ATPase par IF1 se fait de manière réversible et pH dépendante (Van Heeke et al. 1993). La région riche en histidine (résidus 48-70) de IF1, entre autre, serait impliquée dans le mécanisme de détection du pH chez le bovin, et subit des changements de conformation en fonction de l'acidité ou de l'alcalinité de l'environnement (Green et Grover 2000). En effet, IF1 existe sous deux formes : la forme active de IF1 est un dimère formé dans des conditions acides (pH<6.5) (Cabezón et al. 2000). A des valeurs de pH plus élevées, IF1 s'associe en tétramère ce qui empêche sa liaison au domaine F1 et la rend inactive (Cabezón et al. 2001). L'étude par rayon X de la structure du complexe F1-IF1 bovin a permis de montrer que IF1 se lie au motif DELSEED chargé négativement près de l'extrémité C de la sous-unité β (Cabezón et al. 2003). Ainsi, lors d'un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial, la matrice devient plus acide favorisant la forme active de IF1 qui empêche l'hydrolyse de l'ATP.

En plus du pH, IF1 peut être régulée par phosphorylation/déphosphorylation. En effet, les études de Garcia-Bermudez montrent que chez des mutants IF1, sa phosphorylation en sérine 39 entraîne son incapacité à se lier à l'ATP synthase et conduit à une augmentation de l'activité enzymatique. En revanche, la déphosphorylation de la sérine 39 de IF1 lui permet de se lier à l'ATP synthase (García-Bermúdez et al. 2015; García-Bermúdez et Cuezva 2016). Néanmoins, le statut de phosphorylation d'IF1 dépendrait du type de cellule analysé. Par exemple, dans les cellules stimulées par la voie de l'AMPc/PKA, IF1 est principalement phosphorylée, à l'inverse suite à l'inhibition de la PKA, IF1 se trouve déphosphorylée.

Lors d'une ischémie, il a été montré que l'ATP synthase fonctionnait en mode reverse afin de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial. Ainsi les mitochondries consomment l'ATP ce qui permet de retarder l'effondrement du potentiel de membrane mitochondrial et protège la cellule de l'apoptose. IF1 ne semble donc pas essentielle à la survie cellulaire en situation physiologique, mais peut être cruciale dans des conditions

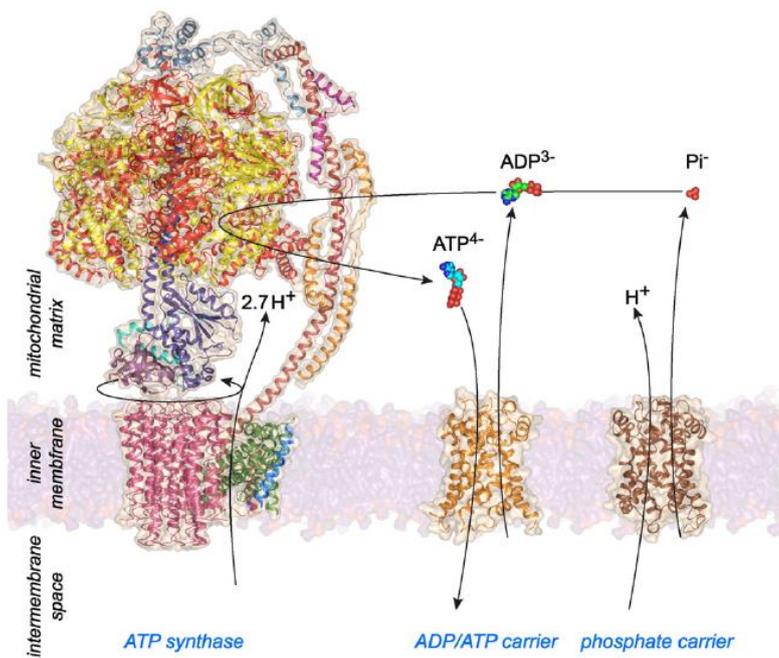


Figure 13 : L'ATP synthase et les transporteurs ADP/ATP et de phosphate mitochondriaux (Kunji et al. 2016).

Les transporteurs ADP/ATP et de phosphate sont représentés respectivement en orange et marron. L'ATP synthase est représentée sous la forme d'un modèle poly-alanine. Les étapes clés du transport sont indiquées par des flèches.

pathologiques ou de stress (Faccenda et al. 2013, 2013), comme le suggère sa surexpression associée à la diminution de l'OXPPOS dans de nombreux types de cancer (Esparza-Moltó et Cuezva 2018). Ainsi, des niveaux élevés d'IF1 dans un certain nombre de cancers ont été liés à une augmentation de la glycolyse (Solaini, Sgarbi, et Baracca 2021). Chez les mammifères, Luciakova et Kuzela ont été les premiers à observer que les mitochondries des cellules tumorales contenaient 2 à 3 fois plus de IF1 que ces cellules de foie ou de cœur de rat (Luciaková et Kuzela 1984). Par la suite, d'autres études ont confirmé ces résultats (Bravo et al. 2004; Capuano, Guerrieri, et Papa 1997).

De façon intéressante, la protéine IF1 modulerait non seulement l'activité de l'ATP synthase, mais également sa multimérisation et ainsi, la structure des crêtes mitochondriales. Ainsi, Garcia et al. (García et al. 2006) et Campanella et al. (2008) ont montré par analyse en BN-PAGE et analyses densitométriques, dans les mitochondries d'hépatomes, cellules Hela et C2C12, qu'une sous-expression d'IF1 était corrélée à une diminution du rapport Dimères/Monomères de l'ATP synthase et sa surexpression à une augmentation du rapport D/M. Cette surexpression de IF1 préserverait la structure des crêtes mitochondriales lors de l'induction de l'apoptose par traitement à la staurosporine (Faccenda et al. 2013, 2013).

Enfin, Weissert et al. (Weissert et al. 2021) ont étudié l'effet d'une surexpression de IF1 constitutionnellement active sur l'organisation spatio-temporelle de l'ATP synthase. Leurs résultats indiquent une modification dans la localisation et la mobilité de l'ATP synthase et de l'ultrastructure mitochondriale. Cette dernière observation semblait liée à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, induisant en contre-partie une stimulation de la respiration. Cette étude souligne la connexion entre activité et structure du complexe V et ultrastructure des crêtes.

L'ATP synthase participe à une série d'autres structures supramoléculaires, la plus importante étant l'ATP synthasome, qui serait composée de l'ATP synthase, du transporteur de phosphate inorganique (PiC) et de l'adénine nucléotide translocase (ANT)(Nůsková et al. 2015).

2.3.3. Adénine nucléotide translocase ou ANT

La membrane interne mitochondriale étant relativement imperméable, il existe dans les organismes eucaryotes un transporteur spécifique ADP/ATP, l'adénine nucléotide translocase (ANT). Ce transporteur a été découvert au début des années 1960 par les laboratoires Klingenberg (Heldt, Jacobs, et Klingenberg 1965; Pfaff, Klingenberg, et Heldt 1965) et Vignais (Duce et Vignais 1965) suite à des études sur l'inhibiteur spécifique atractyloside (ATR), connu pour inhiber la respiration (Bruni et Luciani 1962). Ce transporteur assure la première et la dernière étape de transport dans la phosphorylation oxydative, en effet, il importe dans la mitochondrie l'ADP nécessaire à la synthèse d'ATP et exporte l'ATP synthétisé hors de la mitochondrie (Figure 13).

On considère que notre propre poids corporel en ADP et en ATP est transporté chaque jour par ces transporteurs (M.J. Buono, et F.W. Kolkhorst 2001). Suite à ces études, il a été montré l'ANT est contrôlé par le gradient électrochimique de proton généré par la chaîne de transport des électrons (Pfaff et Klingenberg 1968). En effet, une molécule d'ATP a quatre charges négatives (ATP^{4-}), est échangée contre une molécule d'ADP à trois charges négatives (ADP^{3-}). Du fait du déséquilibre de charge nette, l'échange équimolaire est ainsi entraîné par le $\Delta\Psi_m$. Cet échange est cependant là encore réversible, et la direction du transport dépend de l'énergie chimique du gradient d'ADP et d'ATP et du $\Delta\Psi_m$. Il a été suggéré que l'échange électrogène de ATP^{4-} contre ADP^{3-} par l'ANT pourrait jouer un rôle dans le maintien du $\Delta\Psi_m$, mais au détriment du pool d'ATP cytosolique. Dans des situations pathologiques où la phosphorylation oxydative n'est plus fonctionnelle et que l'ATP synthase fonctionne en mode reverse, l'ANT inverserait également son activité afin de fournir l'ATP cytosolique à la matrice mitochondriale (Belous et al. 2003).

Ainsi, dans les cellules dépourvues d'ADN mitochondrial (cellules ρ^0), qui utilisent la glycolyse comme seule source d'ATP, ce potentiel de membrane proviendrait de l'échange réverse d' ATP^{4-} / ADP^{3-} par l'ANT, couplé à une F0F1-ATPase incomplète dépourvue des deux sous-unités codées par l'ADNmt. Ce système réverse consommerait jusqu'à environ 15% de l'ATP synthétisé par la glycolyse (Appleby et al. 1999).

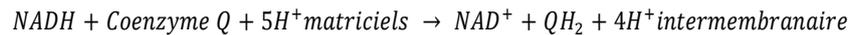
Le système de phosphorylation, ATP synthase et ANT, est donc un système clé du métabolisme énergétique. De ce fait, le potentiel de membrane mitochondrial dépend de son activité : une demande énergétique accrue stimule l'activité ATP synthase, ce qui augmente le retour des protons à la matrice et en retour l'activité de la chaîne respiratoire. A l'inverse, la chute du potentiel de membrane peut induire l'activité réverse de ce système pour permettre le maintien du $\Delta\Psi_m$, notamment en cas de dysfonction de la chaîne respiratoire.

2.3.4. La composition de la chaîne respiratoire

Le gradient de protons est en effet établi par la respiration, ou le transfert des électrons à l'oxygène au niveau de l'ETC est accompagné d'un pompage des protons. Cette chaîne respiratoire est composée de 4 complexes. On y retrouve plus de quatre-vingts protéines différentes dont seules 13 sont codées par l'ADNmt. Les sous-unités codées par le génome nucléaire sont importées à la mitochondrie par un système complexe de prise en charge au niveau cytosolique et de transporteurs membranaires mitochondriaux, le système TIM/TOM, selon la localisation mitochondriale, matrice, membrane mitochondriale externe ou interne.

a) Complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase)

Le complexe I (NADH Ubiquinone Réductase, [EC 7.1.1.2](#)) est le premier complexe et le plus important de la chaîne respiratoire, il compte 44 sous unités protéiques structurales dont 7 sont codées par l'ADNmt (Carroll et al. 2006). Le complexe I catalyse le transfert hybride de deux électrons issus de l'oxydation du NADH, H⁺ à l'ubiquinone couplé à un transfert de 4 protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, il est le principal point d'entrée des électrons au sein de la chaîne respiratoire :



Structurellement, il est divisé en deux domaines, le domaine membranaire hydrophobe et le domaine matriciel hydrophile. Cette structure en forme de L est enchâssée dans la membrane et regroupe 3 modules fonctionnels principaux : le N-module ou le module déshydrogénase, responsable de l'oxydation du NADH en NAD⁺, le Q-module ou le module quinone-hydrogénase, responsable du transfert d'électrons le long de sept centres fer-soufre jusqu'à l'accepteur final l'ubiquinone et le P-module ou le module de translocation de protons, qui constitue la majeure partie du bras membranaire et comprend les sous-unités ND codées par l'ADNmt (Signes et Fernandez-Vizarra 2018).

Le NADH se lie dans une cavité de la sous-unité NDUFV1 (chez l'homme) du N-Module (Berrisford et Sazanov 2009) face au cofacteur FMN contenu dans cette même sous-unité, son oxydation s'effectue par transfert hybride des 2 électrons du NADH vers l'atome N5 de la FMN (Birrell, King, et Hirst 2011). Le site de fixation de la quinone reste incomplètement caractérisé, mais se situe à l'interface entre les bras hydrophile et hydrophobe au niveau du Q module, dans un environnement formé des sous-unités ND1, NDUFS2, NDUFS7, NDUFS8. Les sous-unités NDUFS7 (aussi appelée PSST) et NDUFS2 seraient le lieu de la fixation et de la réduction de la quinone. (Kashani-Poor, Kerscher, et al. 2001; Kashani-Poor, Zwicker, et al. 2001).

La roténone est l'un des inhibiteurs le plus puissant du complexe I. Il est issu des roténoïdes, une famille d'isoflavonoïdes extraits de plantes Leguminosae. La roténone agit à proximité du site de réduction de l'ubiquinone, et bloque le transfert final des 2 électrons à cet accepteur (Ueno et al. 1994).

b) Complexe II ou succinate ubiquinone oxydoréductase

Le complexe II (succinate Ubiquinone Reductase, [EC 1.3.5.1](#)) est le deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Le complexe II catalyse l'oxydation du succinate en fumarate en réduisant le Coenzyme Q. :



Cette réaction libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH. Ce complexe d'environ 200 kDa est connecté au cycle de Krebs par son activité Succinate Déshydrogénase et n'a aucune activité de pompage de

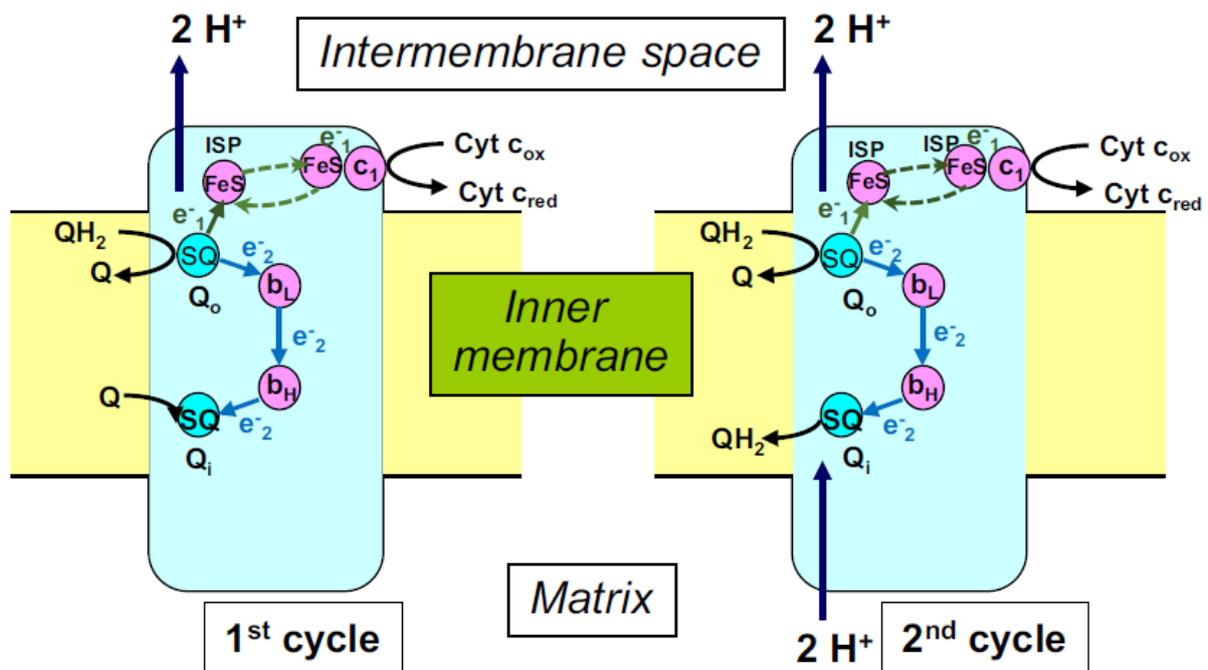


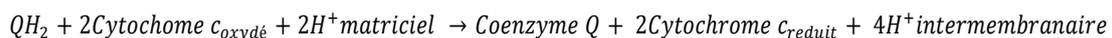
Figure 14 : Cycle Q dans le complexe III (Mazat, Devin, et Ransac 2020).

Le mécanisme du cycle Q modifié implique la déviation de deux électrons dans Q_o . Le premier électron (voie verte) réduit le centre Fer-souffre qui se déplace vers de cytochrome c_1 (flèches vertes en pointillées). Le deuxième électron (voie bleue) est transféré pour former une semi-quinone (SQ) dans le site Q_i . Un deuxième site d'oxydation est nécessaire afin de réduire complètement la semi-quinone en une nouvelle molécule de QH_2 .

protons. Il est composé de 4 sous unités codées exclusivement par le génome nucléaire. Les deux sous-unités catalytiques hydrophiles sont SDHA et SDHB. La flavoprotéine SDHA contient le site de fixation du succinate. L'oxydation du succinate permet de transférer deux électrons premièrement au cofacteur Flavin Adénine Dinucleotide (FAD) qui est lié de manière covalente à la sous unité SDHA, puis aux trois différents groupes Fe - S de la sous-unité SDHB et enfin au Coenzyme Q (CoQ) (Yankovskaya et al. 2003). Le site de liaison du CoQ est situé dans un espace à l'interface des sous-unités SDHB, SDHC et SDHD. Ces deux sous-unités hydrophobes SDHC et SDHD constituent l'ancrage à la membrane interne (Signes et Fernandez-Vizarrá 2018) et contiennent l'hème b, responsable du transfert terminal des électrons au CoQ.

c) Complexe III ou ubiquinol cytochrome c oxydoréductase

Le complexe III (Ubiquinol Cytochrome c Réductase, [EC 1.10.2.2](#)) d'environ 500 kDa est composé de 11 sous-unités protéiques. Présent sous forme de dimères intégrés à la membrane, il catalyse l'oxydation d'une molécule d'Ubiquinol ou QH₂ et la réduction de deux molécules de cytochrome c :



Du fait qu'un seul électron puisse être transféré par l'ubiquinol au Cytochrome c, les réactions du complexe III se déroulent en deux étapes formant ce que l'on nomme cycle des quinones (Figure 14). Premièrement, les deux électrons provenant de la molécule QH₂ liée au site Q_o sont déviés l'un de l'autre. Le premier électron est transféré à la protéine Fer-souffre puis au cytochrome c₁ qui sera réduit et le second à l'hème b_L. Ensuite, ce deuxième électron se déplace au niveau du cytochrome b afin de réduire l'hème b_H, qui à son tour réduit une quinone fixée au niveau du site Q_i, formant ainsi une semiquinone (SQ). Un deuxième cycle est donc nécessaire pour réduire totalement cette semiquinone en QH₂ (Mazat, Devin, et Ransac 2020). Ainsi, 2 protons sont pompés de la matrice, et un total de 4 protons sont transférés vers l'espace intermembranaire.

Ce cycle des quinones peut être inhibé par l'Antimycine A, qui est un composé chimique produit à partir de *Streptomyces*. L'Antimycine A se lie en amont du site Q_i et bloque ainsi l'oxydation des hèmes du cytochrome b et limite ainsi la ré-oxydation de la semi quinone dans le site Q_o (Huang et al. 2005). Complexe IV ou cytochrome c oxydase

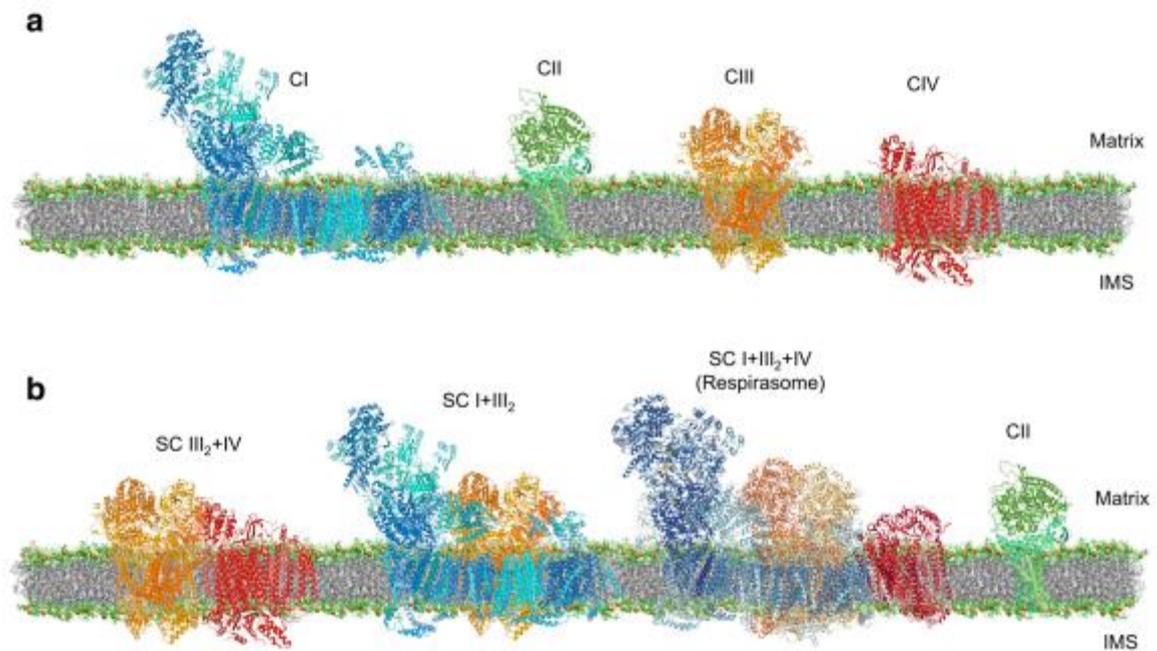
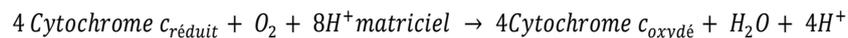


Figure 15 : Organisation structurale des complexes de la chaîne de transport des électrons (ETC) (Javadov et al. 2021)

(a) Modèle à l'état de fluide (ou collision aléatoire) **(b)** Modèle à l'état solide.

d) Complexe IV ou cytochrome c oxydase

Le complexe IV (Cytochrome c Oxydase, [EC 1.9.3.1](#)) d'environ 200 kDa est composé de 13 sous-unités protéiques, 10 sous-unités protéiques sont codées par le génome nucléaire et sont impliquées dans la stabilisation et la régulation du complexe et 3 sous-unités protéiques sont codées par l'ADNmt (COX I à III), elles sont responsables du transfert des électrons du cytochrome c à l'oxygène, accompagné d'un pompage de quatre protons dans l'espace intermembranaire, aboutissant à la réduction de l'oxygène en eau :



e) Les Supercomplexes

Dès le début des années 1960, des études suggèrent la capacité de la chaîne respiratoire à former des entités fonctionnelles qui pourraient faciliter le transfert des électrons et la synthèse d'ATP. C'est seulement depuis les années 2000 qu'il a été démontré que les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire interagissent ensemble en formant des structures appelées Supercomplexes ou Respirasomes ou Mégacomplexes (Dudkina et al. 2005; Guo et al. 2017; Hirst 2018). Ainsi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native (Blue Native-Page), plusieurs compositions de Supercomplexes ont été identifiées : I₁III₂, III₂IV₁₋₂, I₁III₂IV₁₋₂ (supercomplexe), et I₂III₂IV₂ (mégacomplexe) (Figure 15).

Le Supercomplexe I₁III₂ est le premier à avoir été mis en évidence par cristallographie chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Dudkina et al., 2005). Il résulte d'un assemblage entre la partie membranaire du complexe I replié autour d'un dimère du complexe III. Le Supercomplexe III₂IV₁₋₂ a lui été découvert chez la levure, il est composé de deux monomères du complexe IV associés à un dimère du complexe III. Enfin le Supercomplexe I₁III₂IV₁₋₂ a été visualisé pour la première fois à partir de mitochondries isolées de cœur de bœuf. Il est composé de l'association du complexe I replié sur le dimère du complexe III auquel vient s'ajouter le complexe IV au niveau de l'extrémité de la partie membranaire du complexe I. Le complexe IV peut également interagir avec le dimère du complexe III ce qui stabiliserait la structure.

Plusieurs hypothèses ont été avancées et restent très débattues sur les avantages structurels ou fonctionnels de ces associations de complexes. Parmi celles-ci, il a été suggéré que les Supercomplexes, notamment le respirasome (I₁III₂IV₁₋₂), amélioreraient le transfert des électrons à travers la chaîne respiratoire et faciliteraient l'apport des substrats. Le respirasome (I₁III₂IV₁₋₂) maintiendrait l'intégrité structurelle des complexes de la chaîne respiratoire et éviterait l'agrégation des protéines dans la membrane mitochondriale interne. Enfin, le respirasome (I₁III₂IV₁₋₂) pourrait également réduire la « fuite » des électrons et ainsi la génération de ROS mitochondriaux (Javadov 2022).

2.4. La production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS

La mitochondrie est généralement considérée comme la principale source de molécules dérivées de l'oxygène hautement réactives (ROS), qui comprennent les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène ou encore le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Lors du transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire, des électrons peuvent réagir avec l'oxygène, générant ainsi des ROS. Les sites de production des ROS ont été mis en avant en utilisant différents inhibiteurs spécifiques, tels que la roténone ou l'antimycine, inhibant le flux d'électrons, et en faisant varier les substrats de la chaîne respiratoire (Brand 2016). L'équipe de Martin Brand a ainsi identifié 11 sites distincts associés ou non aux complexes de la chaîne respiratoire (Brand 2016). Au niveau de la chaîne respiratoire, les ROS seraient produits principalement par les complexes I et III sous forme de superoxydes (Boveris et Chance 1973; Cino et Del Maestro 1989) (Figure 16)

2.4.1. Génération de ROS par le complexe I

Le complexe I est décrit comme le principal site mitochondrial de production de ROS. Des études ont montré que chez les mammifères, le complexe I produit majoritairement des anions superoxydes vers l'espace matriciel (Grivennikova et Vinogradov 2013; Hirst, King, et Pryde 2008). Du fait de la complexité de sa structure, avec de très nombreuses sous-unités, et de son fonctionnement, les sites de ce complexe générant les ROS ont longtemps été débattus. Les principaux sites producteurs connus sont la flavine mononucléotide (FMN) également nommée IF, et le site réducteur de l'ubiquinone (IQ) (Jezek et Hlavatá 2005) (Figure 16). Le site IF est généralement considéré comme le principal site producteur de ROS du complexe I (Hirst et al. 2008; Kussmaul et Hirst 2006). Lors de l'oxydation du NADH, les électrons sont transférés à la FMN, qui passe alors par un état semi-quinone, de type FMNH⁻ ou totalement réduite de type FMNH₂. Ces deux types d'états peuvent interagir avec l'oxygène pour former un anion superoxyde. Cependant, seule la FMN réduite libre est accessible aux molécules d'oxygène, ainsi la présence de NAD⁺ ferme complètement l'accès de la FMN à l'O₂. Le taux de production de ROS dépend donc : du ratio NADH/ NAD⁺, qui détermine l'état de réduction de la FMN, de son occupation par le NAD⁺ (concentration en NAD⁺ matricielle) et du turnover de réoxydation de ce groupement FMN (Birrell and Hirst 2013).

Cette production de ROS correspond à une production dans le sens « normal » d'activité catalytique du complexe I. Cependant, son activité est réversible, et il a été démontré que des anions superoxydes peuvent être générés par transfert inverse d'électrons, nommé RET (Reverse Electron Transfer) (Jezek et Hlavatá 2005) (Brand 2010). Lors du RET, les électrons issus de l'oxydation du succinate par le complexe II sont préférentiellement réorientés vers le complexe I au lieu du complexe III du fait d'un rapport élevé entre QH₂/Q et d'une force protomotrice élevée. Aussi, le RET et la production de ROS pendant le transport inverse des électrons dépendent fortement de la force protomotrice (Korshunov, Skulachev, et Starkov 1997; Lambert et Brand 2004a, 2004b). Plusieurs équipes soutiennent que cette production de ROS serait liée à un deuxième site, le site de réduction de la quinone, ou site IQ (Jezek et Hlavatá 2005) (Brand 2010). Cependant, ces

résultats restent débattus et la production de superoxyde pourrait également être liée au site IF FMN (Hirst et al. 2008).

En condition physiologique, la production ROS par le complexe I est relativement faible puisque le ratio NADH/NAD⁺ est bas et que le NAD⁺ intra-mitochondrial est élevé. Néanmoins cette production peut augmenter de façon drastique en cas d'inhibition ou de dysfonction du complexe I. Le flux d'électron est alors ralenti ce qui augmente le ratio NADH/NAD⁺. C'est le cas par exemple lorsque la roténone inhibe le complexe I.

2.4.2. Génération de ROS par le complexe II

Le complexe II a été tardivement reconnu comme un site producteur de ROS puisque dans la majorité des études cette production de ROS était en fait générée par le complexe I lors du flux réverse d'électrons (Hansford, Hogue, et Mildaziene 1997). L'équipe de Brand en 2002 (St-Pierre et al. 2002) a effectivement montré sur mitochondries de mammifères isolées que le complexe II dans des conditions physiologiques ne produit que peu de ROS. Cette production de ROS par ce complexe ne se ferait que dans de rares cas et sous deux conditions : le succinate doit réduire la flavine et le site IIF doit être libre pour permettre l'accès à l'oxygène (Quinlan et al. 2012) (Figure 16).

2.4.3. Génération de ROS par le complexe III

Le(s) site(s) de production de superoxyde par le complexe III a (ont) été étudié(s) par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques qui se lient aux deux sites distincts de liaison de l'ubiquinone, Q_o et Q_i (Dröse et Brandt 2008; Muller, Crofts, et Kramer 2002; Quinlan et al. 2011; Turrens, Alexandre, et Lehninger 1985). Ces études ont permis de démontrer que cette production de superoxyde par le complexe III est liée au site Q_o et donc principalement dirigée vers l'espace intermembranaire. La génération de superoxyde au site Q_o est intrinsèquement liée au mécanisme de bifurcation des électrons pendant l'oxydation de l'ubiquinol (Cycle des quinones, cf figure 14). Le premier électron est transféré directement au cytochrome c via le groupement Fe/S, formant un radical SQ[•] hautement instable au site Q_o. Celui-ci transfère très rapidement le deuxième électron à l'hème b_L puis à l'hème b_H pour générer une semi-quinone SQ[•] stable au site Q_i. En condition physiologique, ce transfert est pratiquement instantané (Kramer et al. 2004). Si le débat reste toujours actif quant au mécanisme exact de formation des superoxydes (Forquer et al. 2006; Swierczek et al. 2010), ce mécanisme implique un ralentissement du transfert de ce deuxième électron, favorisant la stabilisation de cette SQ[•] en Q_o et permettant ainsi le transfert d'électron à l'oxygène.

Ainsi, la production de superoxyde au niveau du complexe III est augmentée par l'ajout d'antimycine A, un inhibiteur du site Q_i inhibant le transfert du deuxième électron. Rottenberg et ses collègues (Rottenberg, Covian, et Trumpower 2009) ont également mis en évidence que la formation de superoxyde dépendrait fortement du potentiel de membrane. En effet, le taux de génération de superoxyde augmenterait de manière

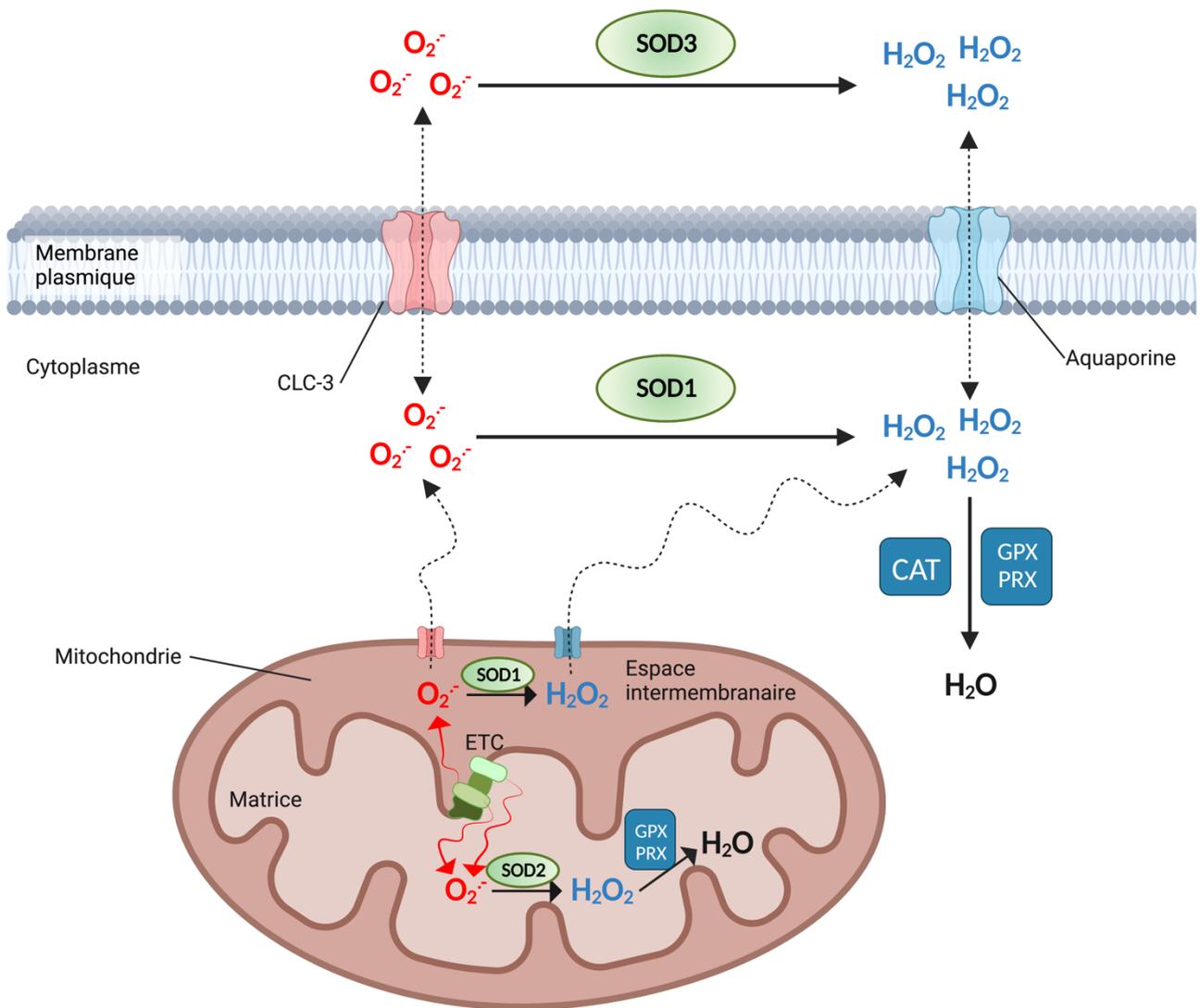


Figure 17 : Détoxification des ROS dans des cellules de mammifères.

Les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) peuvent être réduits en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par différents antioxydants comme les superoxydes dismutases (SOD1, SOD2 et SOD3). Les H_2O_2 sont ensuite détoxifiés par la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) ainsi que la peroxiredoxine (PRX) pour aboutir à la production d' H_2O

exponentielle avec le potentiel de membrane, un potentiel de membrane élevé ralentissant fortement le transfert d'électrons de l'hème b_L à l'hème b_H , favorisant un état plus réduit de l'hème b_L et la stabilisation d'une semi-quinone en Q_o . Enfin, l'état redox (QH_2/Q) du pool de quinone est également un paramètre ayant un impact majeur sur la production de superoxyde au niveau du site Q_o en affectant les états de réduction des cytochromes b_L et b_H (Quinlan et al. 2011).

2.4.4. La détoxification mitochondriale des ROS

Bien que $O_2^{\cdot-}$ ne soit pas une molécule fortement oxydante, il reste néanmoins potentiellement toxique. En particulier, $O_2^{\cdot-}$ peut oxyder les clusters fer-soufre contenus notamment dans les complexes de l'ETC et au sein de l'aconitase, ce qui entraîne la dégradation du cluster et donc de l'activité enzymatique (Imlay 2003; Liochev et Fridovich 1999). De plus, l'atome de fer libéré dans ce processus peut directement réduire H_2O_2 pour générer le radical hydroxyle OH^{\cdot} (Liochev et Fridovich 1999), qui est lui hautement toxique. Un excès de ROS est donc associé à des niveaux accrus de dommages oxydatifs, ou stress oxydant, tels que la peroxydation des lipides membranaires, la carbonylation des protéines ou des dommages à l'ADN (Dukan et Nyström 1999; Elchuri et al. 2005; Van Remmen et al. 2003; Yang et al. 2007). Le stress oxydatif est l'ensemble des dommages causés par ces ROS aux cellules. Il résulte d'un déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes des cellules.

L'homéostasie des ROS est donc essentielle pour la survie mitochondriale et cellulaire en limitant ces dommages. Cette homéostasie passe par la détoxification des ROS qui peut être réalisée par des antioxydants non enzymatiques ou enzymatiques. Les antioxydants non enzymatiques sont le glutathion, les flavonoïdes, la vitamine A et la vitamine E (Calabrese, Morgan, et Riemer 2017). Les antioxydants enzymatiques sont les superoxydes dismutases (MnSOD et Cu,ZnSOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPX), la glutathione réductase, la peroxiredoxine (PRX) et la thiorédoxine (TRX) (Moloney et Cotter 2018). Les antioxydants jouent un rôle important dans la dégradation des $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 puis en H_2O (Figure 17).

Les SOD sont des métalloenzymes situées dans divers compartiments cellulaires qui convertissent rapidement les $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Il existe différentes SOD : La SOD1 (Cu/ZnSOD) est située dans le cytosol et l'espace intermembranaire mitochondrial, la SOD2 (MnSOD) dans la matrice mitochondriale et la SOD3 (Cu/ZnSOD) est extracellulaire. Les SOD utilisent des ions métalliques, tels que le cuivre (Cu^{2+}), le fer (Fe^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) comme cofacteurs (Fukai et Ushio-Fukai 2011). Ensuite, certains antioxydants sont impliqués dans la réduction de H_2O_2 en H_2O , comme la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), les peroxiredoxines (PRX) et la thiorédoxine (TRX). La catalase est principalement située dans le cytosol et ne nécessite aucun cofacteur pour réduire H_2O_2 en H_2O . Le système de détoxification par les glutathions nécessite le glutathion (GSH), la glutathion réductase, la glutathion peroxydase (GPX) et la glutathion-s-transférase (GST). Ce système se retrouve de façon importante dans les mitochondries, où il joue un rôle essentiel de détoxification de H_2O_2 .

Les ROS ont longtemps été uniquement considérées comme des molécules toxiques, associées au principe du stress oxydatif, qui suggère que les ROS induisent diverses pathologies telles que le diabète, les pathologies neurodégénératives ou le cancer (Panieri et Santoro 2016). Ces ROS sont également impliquées dans le vieillissement (Schieber et Chandel 2014). Cependant, il est maintenant reconnu que les ROS sont également des molécules de signalisation, qui maintiennent les fonctions physiologiques cellulaires (Schieber et Chandel 2014; Shadel et Horvath 2015), en particulier l'espèce la plus stable : le peroxyde d'hydrogène. Ces voies de signalisation par l' H_2O_2 impliquent notamment l'oxydation de cystéines clés dans des protéines qui possèdent des fonctions de régulation (Finkel 2011). Ainsi, par modification redox, l' H_2O_2 régule l'activité de nombreuses kinases telles que Src, les protéines kinases MAPK, AMPK et Akt (Corcoran et Cotter 2013; Nakashima et al. 2002), ou de facteurs de transcription tels que NRF2, NF- κ B, H1F-1a ou p53 dont les sites actifs contiennent des résidus cystéine (Brandes et al., 2009).

Il a ainsi été montré que les ROS peuvent réguler la biogénèse mitochondriale. L'étude de Lee et al (Lee et al. 2015), a mis en évidence chez les mammifères que la production accrue de ROS induite par le sulfate d'indoxyle conduit à une diminution de la biogénèse mitochondriale. Cet effet peut être contrecarré grâce à des anti-oxydants comme le N-acétylcystéine (NAC). Plus récemment, des études ont suggéré que la production d' H_2O_2 régulait la morphologie ou dynamique mitochondriale (Jendrach et al. 2008). Il a été démontré que de fortes concentrations d' H_2O_2 exogènes induisent une fragmentation mitochondriale dose-dépendante et augmentent également l'expression d'un certain nombre de gènes de fission et de fusion mitochondriale.

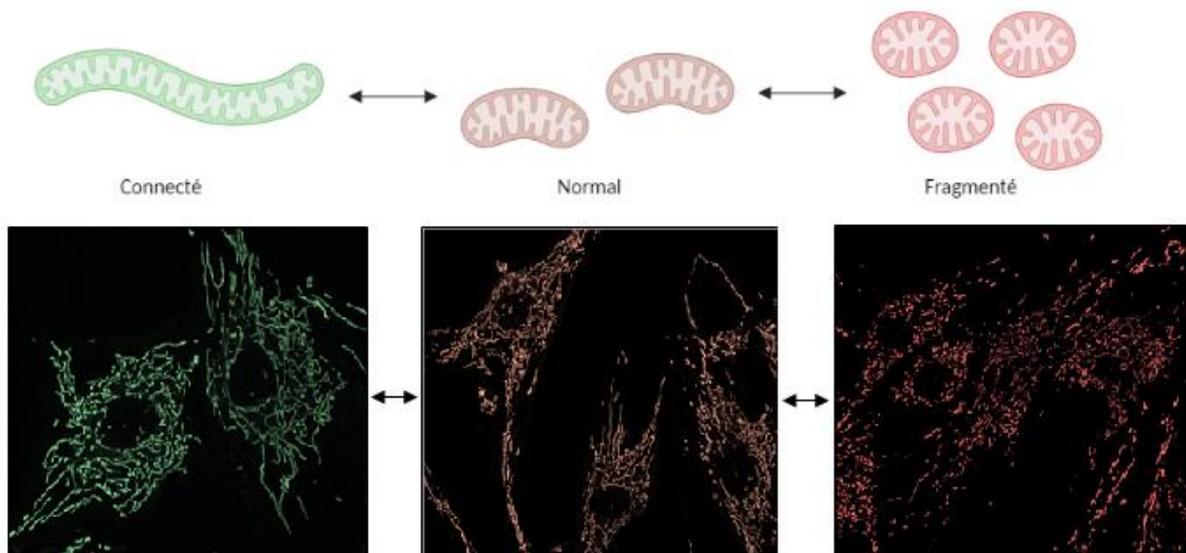


Figure 19 : Morphologie du réseau mitochondrial.

La morphologie des mitochondries peut varier de manière significative et est influencée par des stimuli métaboliques. A gauche en vert les mitochondries sont hyper-fusionnées, tandis qu'à droite en rouge les mitochondries sont hyper-fragmentées.

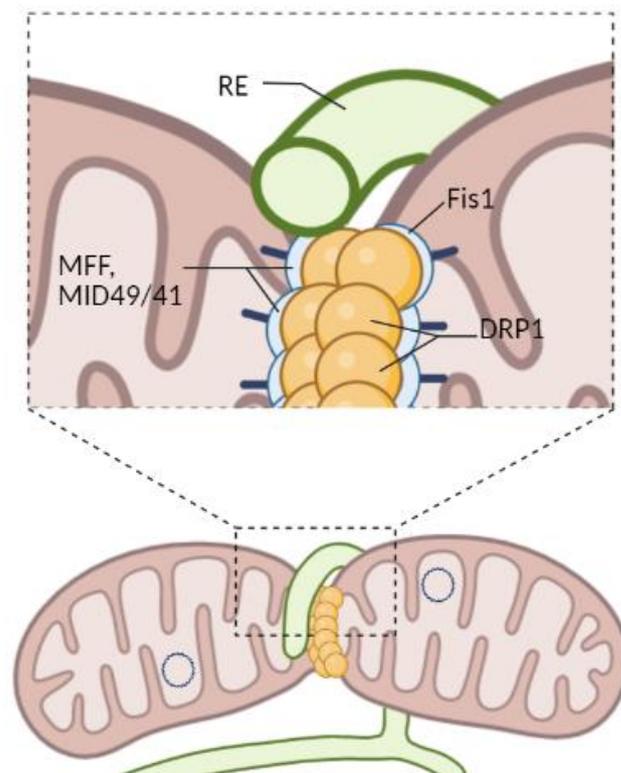


Figure 18 : Acteurs de la fission mitochondriale (inspiré de (Giacomello et al. 2020)).

La fission est principalement organisée par la protéine DRP1. La constriction est induite par le réticulum endoplasmique (RE) et d'autres facteurs. Ceci permet l'activation des récepteurs membranaires tels que Fis1, MFF, MID49/41 qui recrute DRP1 à la mitochondrie.

3. La dynamique mitochondriale

Au sein des cellules, les mitochondries ne sont pas des organites isolés, mais forment un vaste réseau qualifié de dynamique. Ce réseau est en perpétuel remodelage grâce à des phénomènes de fusion et de fission très régulés. Les rôles exacts de cette dynamique mitochondriale restent encore incomplètement compris, mais ces événements contrôlant l'organisation des mitochondries au sein du cytoplasme permettraient notamment de répondre à aux besoins métaboliques, d'assurer la maintenance du génome mitochondrial et d'éliminer les mitochondries endommagées via la mitophagie (Karbowski et Youle 2003). La dynamique des membranes externe et interne est ainsi modifiée en fonction de l'activité cellulaire, des besoins énergétiques ou du cycle cellulaire (Hoppins, Lackner, et Nunnari 2007a). Un équilibre est donc nécessaire entre la fusion et la fission, lorsque cet équilibre est en faveur de la fission, les mitochondries présentent un réseau fragmenté, au contraire, lorsque cet équilibre est en faveur de la fusion, les mitochondries présentent un réseau connecté (Figure 18).

Les acteurs et mécanismes régulant cette dynamique ne sont pas totalement identifiés à l'heure actuelle, néanmoins, la machinerie de fission repose essentiellement sur un système d'ancrage d'une protéine, DRP1, sur des récepteurs de la membrane externe (Cf paragraphe 3.1) et la fusion des mitochondries repose sur deux systèmes, les protéines MFN1 et MFN2 pour la fusion des membranes externes (Cf paragraphe 3.2) et OPA1 pour la fusion des membranes internes (Cf paragraphe 3.3).

3.1. La protéine de fission mitochondriale : DRP1 (DMN1L)

La fission mitochondriale est indispensable à de nombreux mécanismes cellulaires telles que la biogénèse mitochondriale, l'élimination des mitochondries via la mitophagie ou encore la répartition des ADN mitochondriaux ou nucléoïdes. Chez les mammifères, les principaux acteurs participant au mécanisme de la fission mitochondriale sont les protéines DNM1L (Dynamin 1-like), aussi appelée DRP1 (Dynamin related protein 1) (Smirnova et al. 2001a), GDAP1 (Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1) (Niemann et al. 2005), Fis1 (Mitochondrial fission 1 protein) (James et al. 2003), MFF (Mitochondrial Fission Factor) (Otera et al. 2010), et MID49/51 (mitochondrial dynamics protein 49kD/51kD) (Palmer et al. 2011) (figure 19).

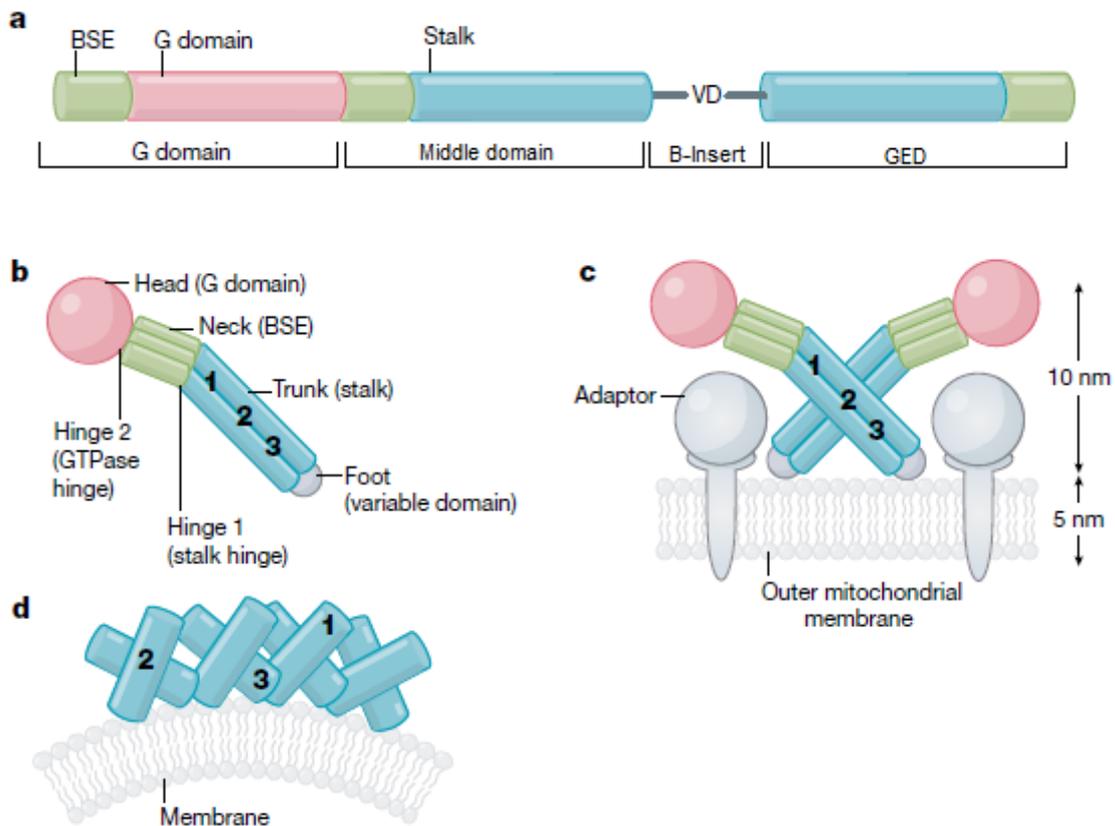


Figure 20 : Structure et organisation de DRP1 (Kraus et al. 2021).

a. Organisation des domaines de DRP1. b. Organisation des domaines du monomère de DRP1 replié. c. Organisation présumée de DRP1 sur la ME, en contact des protéines adaptatrices. d. DRP1 auto-assemblée sur la ME. Figure modifiée à partir de Kraus 2021. BSE : bundle signalling elements, stalk : région « tige », VD : domaine variable, GED : domaine GTPase effecteur, Hinge : région charnière.

3.1.1. Structure et fonction de DRP1

La protéine DRP1 est hautement conservée au cours de l'évolution et son rôle dans la fission mitochondriale a initialement été décrit chez *Caenorhabditis elegans* (Labrousse et al. 1999) et la levure (Bleazard et al. 1999) avant d'être étudiée chez les mammifères (Smirnova et al. 2001a). DRP1 est codée par le gène nucléaire *DNML1* qui est localisé en 12p11.21 (Uniprot O00429). C'est une protéine de 736 acides aminés pour sa forme conique, appartenant à la famille des dynamines. Elle est constituée de quatre domaines distincts, dont un domaine GTPase (G domain) en N-terminal, un domaine central (Middle domain), un domaine variable (B-insert), et enfin un domaine GTPase effecteur (GED) en C-terminal.

Ce dernier domaine régule l'hydrolyse du GTP. DRP1 contient également d'autres régions comme les BSE (bundle signalling elements) et les régions « tige » (stalk) (Figure 20a). Dans les années 2010, des études aux rayons X ont été menées afin de déterminer la structure des protéines de la famille des dynamines (Faelber et al. 2011; Ford, Jenni, et Nunnari 2011; Reubold et al. 2015). De ce fait, il a été montré que le monomère de la protéine DRP1 est capable de se replier, comme les dynamines « classiques ». Les régions tiges vont ainsi s'assembler formant « le tronc » (trunk) à 3 interfaces (1-2-3), permettant de stabiliser la protéine DRP1 et de faciliter son oligomérisation (Figure 20b-c). Les interfaces 1, 2 et 3 du tronc déterminent l'auto-assemblage des monomères. Les monomères se lient les uns aux autres afin de former un dimère par le biais de l'interface 2. Ensuite les dimères se lient entre eux à travers l'interface 1 formant des oligomères, et enfin, les oligomères de la protéine DRP1 se lient à la membrane externe grâce à des interactions via l'interface 3 (Figure 20d) (Kraus et al. 2021). Dans les cellules, DRP1 a besoin de protéines adaptatrices spécifiques afin d'entrer en contact avec la membrane mitochondriale externe. Ces protéines font intégralement partie de la machinerie de fission, la perte d'un de ces adaptateurs entraîne en majeure partie des défauts dans la fission mitochondriale (Archer 2013).

3.1.2. Les protéines adaptatrices de DRP1

La protéine DRP1 est principalement localisée dans le cytoplasme, où elle pourra être recrutée aux niveaux des peroxysomes et des futurs sites de fission de la membrane mitochondriale externe (Smirnova et al. 2001a). Le signal de recrutement de DRP1 à la membrane externe reste encore à ce jour mal connu. Chez la levure, la protéine Dnm1, qui est l'homologue de la protéine DRP1 est recrutée par une protéine membranaire hautement conservée : Fis1 et les protéines adaptatrices Mdv1 et Caf4 (Koirala et al. 2013; Lackner, Horner, et Nunnari 2009). Des études poussées montrent que la protéine Dnm1, chez la levure, forme des oligomères très ordonnés avec un diamètre extérieur moyen de 120nm (Mears et al. 2011).

Cependant, chez les mammifères, seules les protéines Fis1 et DRP1 sont conservées, les protéines adaptatrices, elles, n'ont pas été identifiées. Fis1 est codé par le gène *FIS* localisé en 7q22.1. C'est une petite protéine de 152 acides aminés, constituée d'un domaine transmembranaire en C-terminal fixé dans la membrane externe et d'un domaine N-terminal tourné vers le cytoplasme composé de 6 hélices α antiparallèles avec 2 domaines tétratricopeptides (TPR) (Figure 21). Ce domaine TPR serait impliqué dans le recrutement de

(A) Fission Factors

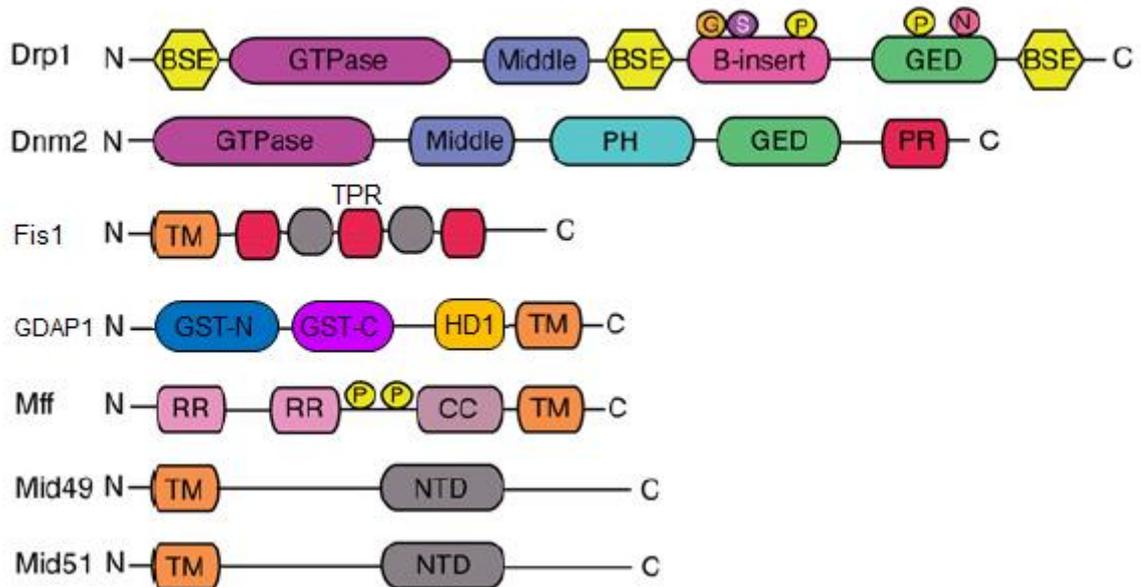


Figure 21 : Représentation schématique des éléments structuraux des protéines de fission et de leurs modifications post-traductionnelles associées (modifié d'après (Tilokani 2018)).

Illustration des protéines de la machinerie centrale impliquées dans (A) la fission mitochondriale. Les domaines sont représentés dans des couleurs différentes. Les emplacements identifiés par des modifications post-traductionnelles sont indiqués par P (Phosphorylation), N (S-nitrosylation), S (SUMOylation), G (O-GlcNAcylation), ou U (Ubiquitination) ; BSE : bundle signalling elements ; CC : coil-coil ; GED : domaine effecteur de GTPase ; TRP : domaine tétratricopeptide ; GST : glutathion S-transferase ; NTD : domaines de nucléotidyl transférase domaines ; PH : domaine Pleckstrin homology ; PR : Proline rich ; RR : region repeat ; TM : domaine transmembranaire.

DRP1. Néanmoins, la fonction réelle de Fis1 chez les mammifères n'est pas claire. En effet, l'étude d'un modèle déplété en Fis1 (KO-Fis1) dans des cellules de carcinomes du côlon a révélé que cela n'empêchait pas la protéine DRP1 d'être recrutée à la membrane externe (Lee et al. 2004; Suzuki et al. 2003). Chez les mammifères, les protéines réceptrices nécessaires à la fission seraient la protéine MFF et les protéines MID49/51.

MFF est codée par le gène *MFF* localisé en 2q36.3 (Uniprot Q9GZY8). C'est une protéine de 342 acides aminés, constituée de 2 motifs de répétition en N-terminal (RR), suivie d'un domaine en superhélice (CC) et d'un domaine transmembranaire en C-terminal (Figure 21). MFF est présente sous 8 isoformes, leur expression dépend de la présence ou de l'absence de l'exon 1 (Gandre-Babbe et van der Blik 2008). L'extinction de ces isoformes par ARNi induit une élongation des mitochondries (Otera et al. 2010). A l'inverse une surexpression de MFF induit une fragmentation du réseau mitochondrial avec un recrutement accru de DRP1 à la mitochondrie. Ces études suggèrent donc l'implication de cette protéine dans la fission mitochondriale (Gandre-Babbe et van der Blik 2008; Otera et al. 2010). Des études montrent également que Mff interagit de manière transitoire avec DRP1 via son extrémité N-terminal. MFF et DRP1 ont de plus été co-localisées ensemble, au niveau de la membrane externe (Otera et al. 2010). En l'absence de DRP1, MFF se trouve dispersée sur la membrane externe, ce qui suggère que MFF fonctionne comme un récepteur pour la protéine DRP1. MFF n'est cependant pas le seul récepteur membranaire de DRP1.

MID49, aussi connue sous le nom de MIEF2, est codée par le gène *MIEF2* localisé en 17p11.2 (Uniprot Q96C03). C'est une protéine de 454 acides aminés constituée d'un domaine transmembranaire en N-terminal et d'un domaine nucléotidyltransférase. MID51 est également connue sous le nom de MIEF1, elle est codée par le gène *MIEF1* localisé en 22q13.1 (Uniprot Q9NQG6). C'est une protéine de 463 acides aminés. MID51 possède 45% d'homologie avec la protéine MID49, ainsi, elle est également constituée d'un domaine transmembranaire en N-terminal et d'un domaine nucléotidyltransférase (Figure 21). L'étude de Palmer et al 2011, montre que ces deux protéines sont ancrées dans la membrane externe par leur extrémité N-terminal, leur extrémité C-terminal étant dans le cytoplasme (Palmer et al. 2011). Elle indique également qu'une surexpression de ces protéines conduit à une élongation des mitochondries due à la séquestration de DRP1. Le KO de MID49 et MID51 reproduit le même phénotype que le KO de MFF, c'est-à-dire une hyper-fusion du réseau mitochondrial et un défaut de recrutement de DRP1 à la mitochondrie, ce qui suggère l'implication de ces deux protéines dans la fission mitochondriale (Palmer et al. 2011). De par leur domaine nucléotidyltransférase, MID49/51 ont besoin d'ADP comme cofacteur pour stimuler l'oligomérisation de DRP1 et son activité GTPase (Zhao et al. 2011). L'étude de D. Osellame, montre que MID51 est capable d'inhiber l'activité GTPase de DRP1 (Osellame et al. 2016). Par conséquent, il a été supposé que MID49/51 ont des rôles différents de MFF mais complémentaires dans la fission mitochondriale. Ainsi, MFF recruterait les oligomères de DRP1, tandis que MID49/51 recruterait la protéine DRP1 liée au GTP pour faciliter son oligomérisation.

La protéine GDAP1 est codée par le gène *GDAP1* localisé en 8q21.11 (Uniprot Q8TB36). C'est une protéine de 358 acides aminés constituée de deux domaines caractéristiques de la famille glutathion S-transférase (GST-N et GST-C) en N-terminal et un domaine hydrophobe (HD1), qui sont orientés vers le

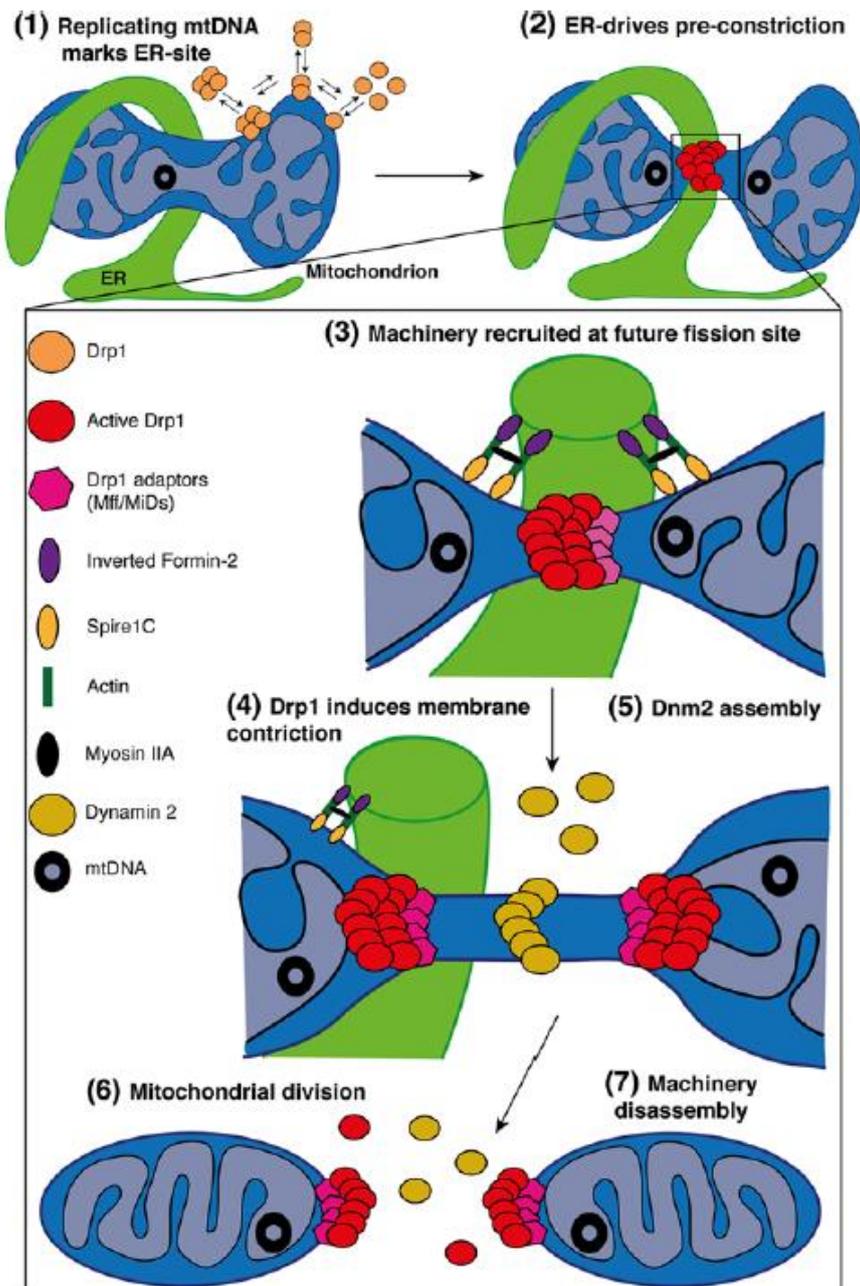


Figure 22 : Représentation schématique des processus de la fission mitochondriale (Tilokani 2018).

(1) Dans la matrice, la réplication de l'ADNmt marque le site pour le recrutement du RE. En parallèle, les oligomères Drp1 sont en équilibre constants entre le cytosol et les mitochondries. **(2)** Les formes oligomères de Drp1 s'accumulent aux sites du RE où la pré-constriction de la membrane a été initiée. **(3)** L'INF2 lié au RE et le Spire1C mitochondrial induisent la nucléation et la polymérisation de l'actine aux sites de contact entre la mitochondrie et le RE. La Myosine IIA peut assurer la contraction du câble d'actine, fournissant la force mécanique nécessaire à la pré-constriction des mitochondries. À ces sites, MFF et MID49/51 recrutent Drp1 où elle s'oligomérisse dans une structure en forme d'anneau et **(4)** L'hydrolyse du GTP entraîne un changement de conformation, renforçant la constriction mitochondriale préexistante. **(5)** Ensuite, Dnm2 est recrutée au niveau du col de constriction mitochondrial médié par Drp1 où il s'assemble et termine la scission de la membrane, **(6)** conduisant à deux mitochondries filles.

cytosol. Entre le domaine GST-C et HD1 se trouve une région riche en acides aminés basiques, permettant à GDAP1 d'être localisée à la membrane externe et d'intervenir dans la fission mitochondriale (Wagner et al. 2009). Elle est également constituée d'un domaine transmembranaire en C-terminal permettant son ancrage à la membrane externe (Figure 21). On ne sait pas exactement comment GDAP1 est impliquée dans la fission mitochondriale (Niemann et al. 2005). Néanmoins, une surexpression de cette protéine induit une fragmentation du réseau mitochondrial, qui peut être inhibée par un KO de DRP1 ou l'expression d'un mutant dominant négatif (Niemann et al. 2005). GDAP1 est exprimée principalement dans les cellules de Schwann myélinisées et les neurones moteurs et sensoriels. Les mutations de GDAP1 conduisent à des neuropathies périphériques comme Charcot-Marie-Tooth (CMT) (OMIM # 606598) (Pedrola et al. 2005).

3.1.3. Mécanisme de la fission mitochondriale

En 2011, l'équipe de Jonathan R. Friedman a montré grâce à des images haute résolution et reconstruites en 3D que les tubules du réticulum endoplasmique (RE) sont capables d'entrer en contact avec les mitochondries, mais également de les entourer afin d'entraîner une constriction des mitochondries (Friedman et al. 2011). C'est l'étape initiale de la fission mitochondriale. Elle est nécessaire afin de réduire le diamètre des mitochondries à 150nm au lieu de 300-500nm. Cette pré-constriction serait indispensable au recrutement de DRP1. De même que les autres protéines de la famille des dynamines GTPase, DRP1 est capable d'hydrolyser le GTP permettant la constriction et la scission des membranes (Figure 22). Cette machinerie de fission a été largement étudiée chez les dynamines-GTPases classiques qui sont impliquées dans la constriction et la libération de vésicules d'endocytose clathrine-dépendante. En effet, il a été montré que suite à l'hydrolyse du GTP, les dynamines induisent un étirement du cou de la vésicule suivie d'une fission des membranes (Smirnova et al. 1999).

Néanmoins, bien que le rôle joué par DRP1 dans la constriction des membranes soit largement décrit, sa fonction exclusive dans leur scission a été remise en question. En effet, les études mécaniques sur des nanotubes membranaires montrent des résultats contradictoires : Roy et al, 2022 (Roy et Pucadyil 2022) ont observé en imagerie time-lapse une constriction et une scission de ces nanotubes membranaires exposés à DRP1 en présence de GTP, quant au contraire, Mahajan et al, n'observent qu'une constriction mais sans scission (Mahajan et al. 2021). Ces données contradictoires pourraient s'expliquer par des différences techniques de toxicité d'excitation des sondes, mais il n'est pas donc pas encore établi si DRP1 est suffisant en lui-même pour catalyser la fission. De plus, l'étude de Fujioka (Fujioka, Tandler, et Hoppel 2012) a montré dans des cardiomyocytes de rat la présence d'une constriction de la membrane interne mitochondriale en absence de DRP1, ce qui suggère que d'autres acteurs interviendraient dans cette constriction. Récemment, l'étude de Cho en 2017 (Cho et al. 2017) a proposé un mécanisme sous-jacent à la fission mitochondriale. Cette étude suggère que la constriction de la membrane interne est dépendante du taux de Ca^{2+} et s'initie au niveau des sites de contact entre la mitochondrie et le RE. En effet, l'utilisation d'un indicateur fluorescent du taux de Ca^{2+} , CEPIAmt (calcium-measuring organelle-entrapped protein indicators), a permis de montrer que l'inhibition par le 2-ABP du récepteur IP3, libérant le Ca^{2+} du RE, diminue les constriction de la membrane

mitochondriale interne. De même, la déplétion par shARN de l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU) diminue les constriction de la membrane mitochondriale interne.

3.1.4. Les autres protéines acteurs de la fission

D'autres études suggèrent que la protéine DRP1 seule ne peut conduire à la fission du réseau mitochondrial. En effet, elles montrent l'importance du cytosquelette d'actine dans la régulation de la dynamique mitochondriale. L'actine régule notamment la mobilité mitochondriale ainsi que l'équilibre entre la fusion et la fission (De Vos et al. 2005). Son rôle principal est étroitement lié à la formation des zones de contacts entre le RE et la mitochondrie. Ces sites de contact représentent ainsi une plate-forme de signalisation pour l'échange de métabolites facilitant le remodelage de la membrane externe et la fission mitochondriale. INF2 (inverted-formin 2), qui est liée au RE, serait ainsi associée à la protéine Spire1C elle-même ancrée à la mitochondrie (Korobova, Ramabhadran, et Higgs 2013; Manor et al. 2015). Ces protéines sont toutes deux des protéines de « nucléation » de l'actine. La polymérisation de la F-actine conduirait ainsi à la pré-constriction de la mitochondrie sous l'action conjointe du RE, de l'actine et de la myosine II. De plus, la myosine II est capable d'effectuer la contraction des filaments d'actine fournissant la force mécanique pour la formation du site de pré-constriction (Korobova, Gauvin, et Higgs 2014). Il a également été démontré que d'autres protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine régulent la fission mitochondriale. On retrouve notamment la cofiline (Rehklau et al. 2017), la cortactine, Arp2/3 (S et al. 2015) et Septin 2 (Pagliuso et al. 2016). Enfin, la F-actine peut se lier à DRP1, stimulant son oligomérisation et son activité GTPase (Ji et al. 2017). L'action du RE et la polymérisation d'actine ont donc été identifiées comme des régulateurs majeurs de la fission mitochondriale. La fission mitochondriale est donc un phénomène complexe nécessitant de nombreux acteurs. Depuis des années ces acteurs font l'objet de nombreuses études et leur rôle dans la fission mitochondriale est de mieux en mieux caractérisé. Cependant, quelques points restent mal compris, notamment les signaux cellulaires à l'origine de ce processus.

3.1.5. Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de DRP1

La fission mitochondriale est nécessaire à de nombreux mécanismes cellulaires tels que la division cellulaire, la régulation du métabolisme, la mitophagie ou l'apoptose et est donc finement régulée (Kraus et al. 2021). Ceci implique notamment une régulation complexe de DRP1, essentiellement au niveau post-transcriptionnel et post-traductionnel.

a) Régulation par épissage alternatif

Jusqu'à 10 isoformes de DRP1 peuvent être produites par épissage alternatif. Chez l'humain, celui-ci concerne essentiellement les exons 3 (codant le « A-insert », insertion de 13 acides aminés (AA) dans le domaine GTPase), 16 et 17 (B-insert, une région de 37 AA dans le domaine variable). Le A-insert est présent dans les

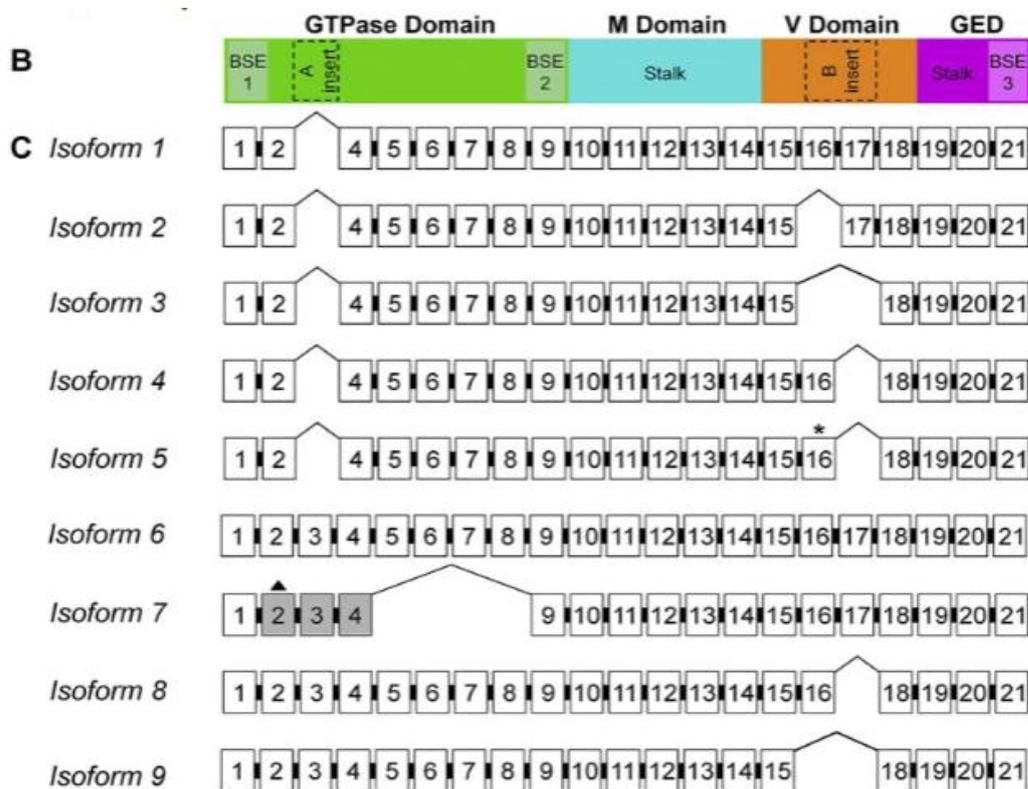


Figure 23 : Structure et région codante des isoformes humaine de DRP1 (Modifié d'après (Rosdah et al. 2020)).

(B) Structure du domaine de DRP1. (C) Région codante de l'isoforme humaine 1 à 9 de DRP1. Le domaine GTPase est codé par l'exon 1 à 9, le Middle domaine par l'exon 10 à 14, le domaine variable par l'exon 15 à 18 et le domaine GED par l'exon 19 à 21. Les boîtes rectangulaires blanches avec des numéros représentent des exons ; ^ représente un exon manquant ; * représente un exon partiellement traduit ; ▲ représente un codon de départ alternatif et les boîtes rectangulaires grisées son des séquences d'acides aminés alternés.

ISOFORME TAILLE (ACIDES AMINES) AUTO-ASSEMBLAGE ACTIVITE GTPASE REFERENCES

ISOFORME	TAILLE (ACIDES AMINES)	AUTO-ASSEMBLAGE	ACTIVITE GTPASE	REFERENCES
1	736	Prédominance de tétramères	Comparable à l'isoforme 3 humaine	(Clinton et al. 2016; Macdonald et al. 2016)
2	710	N/A	N/A	
3	699	Dimères, tétramères, hexamères	Comparable à l'isoforme 1 humaine	(Clinton et al. 2016; Macdonald et al. 2014)
4	725	N/A	N/A	
5	710	N/A	N/A	
6	749	Prédominance de tétramères	Plus faible que l'isoforme 3 humaine	(Macdonald et al. 2016)
7	533	N/A	N/A	
8	738	N/A	N/A	
9	712	N/A	Plus faible que l'isoforme 3 humaine	(Macdonald et al. 2016)

Tableau 1 : Auto-assemblage et activité GTPase des différentes isoformes humaines de DRP1. N/A : Pas d'information disponible (inspiré de (Rosdah et al., 2020)).

isoformes 6, 8 et 9, concernant le B-insert les isoformes 1, 6 et 7 contiennent les 37 AA, les isoformes 3 et 9 n'en contiennent aucun et les autres isoformes ont un nombre plus faible de ces AA (Rosdah et al., 2020) (Figure 23).

Bien que les fonctions biochimiques et biologiques de ces différentes isoformes restent mal connues, les variations du domaine GTPase et du domaine variable semble moduler par effet allostérique la courbure préférentielle et l'activité GTPase des polymères de DRP1 (MacDonald et al., 2016). Ainsi, les isoformes ne présentant pas les inserts A et B démontrent l'activité GTPase la plus élevée, et l'isoforme 3 (qui ne contient aucun des deux inserts) restaure complètement la fission mitochondriale dans des cellules MEF DRP1-KO, tandis que les isoformes contenant ces deux inserts ne le font que de façon très modérée. Ces isoformes montrent également une spécificité d'interaction avec les organelles intracellulaires ou le cytosquelette et de distribution tissulaire (Itoh et al., 2018 ; MacDonald et al., 2016 ; Rosdah et al., 2020). L'isoforme la plus courte est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que les isoformes plus longues contenant l'exon 3 sont préférentiellement exprimées dans les cellules neuronales (Hogarth et al., 2018, MacDonald et al., 2016) (Tableau 1). Si les études actuelles, encore limitées, montrent des rôles à la fois distincts et redondant de ces différentes isoformes dans le contrôle de la fission mitochondriale, leurs propriétés biochimiques et implications patho-physiologiques restent très mal connues.

b) Régulation post-traductionnelle

Au cours de ces 10 dernières années, les modifications post-traductionnelles des protéines de la dynamique mitochondriale ont largement été étudiées et mises en corrélation avec les événements de fission ou de résistance à la fission (Tableau 2). Les principaux signaux permettant de réguler la fission mitochondriale opèrent sur la protéine DRP1 afin de réguler sa localisation et son activité GTPase (Figure 24)

Phosphorylation de DRP1

La phosphorylation de DRP1 a été largement étudiée au cours des années, notamment les phosphorylations de la sérine 616 (Ser616) et celle de la sérine 637 (Ser637). Elles sont respectivement considérées comme des formes de pro-fission et pro-fusion. Pendant la mitose, DRP1 est activée par la phosphorylation de la Ser616 médiée par Cdk1/Cycline B dans le domaine variable. Cette phosphorylation incite la fission mitochondrie DRP1-dépendante. De ce fait, elle facilite la répartition et la ségrégation des mitochondries dans les cellules filles (Taguchi et al. 2007). Cdk1/Cycline B sont eux même régulés par de petites GTPase de type Ras RALA dont l'effecteur est RALBP1 et la kinase mitotique Aurora A (Kashatus et al. 2011). Pendant la métaphase, Aurora phosphoryle la serine 194 de RALA, ce qui permet au complexe RALA/RALBP1 d'être délocalisé à la mitochondrie, stimulant l'activité de la kinase Cdk1/Cycline B. Par ailleurs, l'étude de Kashatus en 2011 (Kashatus et al. 2011) montre que l'inhibition par ARNi de MFF diminue le recrutement de RALA/RALBP1 et DRP1.

PROTEINE	MODIFICATION	EFFET BIOLOGIQUE	REFERENCES
DRP1	Phosphorylation (Ser616) par CDK1/Cycline B	Promeut la fission mitochondriale dans les cellules en phase mitotique	(Kashatus et al. 2011; Taguchi et al. 2007)
	Phosphorylation (Ser637) par PKA	Inhibe la fission mitochondriale en bloquant l'activité GTPase de DRP1	(Chang et Blackstone 2007; Cribbs et Strack 2007)
	Phosphorylation (Ser 600) par CaMKI α	Active la fission	(Chang et Blackstone 2007)
	Déphosphorylation par la calcineurine	Active la fission	(Cribbs et Strack 2007)
	Ubiquitination par MARCH5	Diminue la fission en ciblant DRP1 qui est dégradée par le protéasome	(Nakamura et al. 2006; Yonashiro et al. 2006)
	SUMOylation (Lys532, Lys535, Lys558, Lys568, Lys594, Lys606, Lys608) par MAPL	Régule positivement la fission mitochondriale	(Wasiak, Zunino, et McBride 2007)
	S-Nitrosylation (Cys644)	Augmente la dimérisation de DRP1 et la fission mitochondriale	(Cho et al. 2009)
FIS1	O-GlucNAcylation (Thr-585 et Thr-586)	Favorise la relocalisation de DRP1 à la mitochondrie et la fission mitochondriale	(Gawlowski et al. 2012)
	Ubiquitination par MARCH5	Diminue la fission en ciblant FIS1 qui est dégradée par le protéasome	(Yonashiro et al. 2006)
GDAP1	Ubiquitination par Parkin (Lys50, Lys172, Lys173, Lys188, Lys190, Lys203, Lys206, Lys207, Lys214)	Diminue la fission en ciblant GDAP1 qui est dégradée par le protéasome	(Yonashiro et al. 2006)

Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles clés des protéines de la fission mitochondriale

En opposition, la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc (adénosine 3',5'monophosphate cyclique), est recrutée aux mitochondries par l'intermédiaire de AKAP1 (protéine 1 d'ancrage de la kinase A), et phosphoryle chez l'humain la Ser637 dans le domaine GED de DRP1 (selon les espèces, on retrouve également dans la littérature une phosphorylation en Ser600, 617 ou 656). Cette phosphorylation inhibe la fission mitochondriale par l'inhibition de l'interaction entre le domaine GED et le domaine GTPase et donc de l'activité GTPase de DRP1, bloquant ainsi son recrutement à la mitochondrie (Chang et Blackstone 2007; Cribbs et Strack 2007). Au cours de l'apoptose, la Ser637 peut-être déphosphorylée par la calcineurine, une phosphatase calcium-dépendante (Cribbs et Strack 2007), tandis que PGAM5 déphosphoryle la Ser637 pendant la nécrose (Wang et al. 2012).

Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, couplée aux protéines à la suite de l'action concertée de trois enzymes E1 (ubiquitin-activating enzyme, UBC) et E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) en coordination avec une protéine E3 (ubiquitin protein-ligase). Plusieurs travaux montrent que DRP1 subit des ubiquitinations capables de réguler son activité. MARCH5 aussi connue sous le nom de MITOL est une ubiquitine ligase E3 ancrée à la membrane mitochondriale externe qui serait responsable de l'ubiquitination de DRP1. En effet, la surexpression de MARCH5 conduit à la formation d'un réseau mitochondrial tubulaire, tandis que le KO de MARCH5 ou la surexpression d'un mutant avec un défaut d'activité d'ubiquitination conduisent à la fragmentation de ce réseau. Ces résultats suggèrent que l'ubiquitination de DRP1 favorise sa dégradation par le protéasome et ainsi l'inhibition de la fission mitochondriale (Nakamura et al. 2006; Yonashiro et al. 2006). MARCH5 joue un rôle plus large dans le contrôle qualité mitochondrial en ubiquitinant les protéines mitochondriales endommagées, mutées ou mal repliées, ces protéines ubiquitinées s'accumulent alors au niveau de la membrane externe (Sugiura et al. 2011; Yonashiro et al. 2009) et participent aux recrutements des autophagosomes pour une élimination mitophagique (Yonashiro et al. 2012).

SUMOylation

La SUMOylation consiste en l'ajout d'une "Small Ubiquitin-related MOdifier protein" (SUMO) de ~100 acides aminés. Comme pour l'ubiquitination, les résidus SUMO sont toujours fixés de manière covalente à d'autres protéines grâce aux activités des membres d'une cascade enzymatique (ligases E1-E2-E3). Au cours de l'apoptose, les protéines bax/bak interviendraient dans le recrutement de DRP1 (Maes et al. 2019). Il a été montré que la surexpression de la protéine SUMO1 stabilise DRP1 au niveau des sites de contact de manière Bax/Bak dépendante, conduisant à la fission mitochondriale (Wasiak et al. 2007). D'autres études ont également montré l'implication de la ligase E3 SUMO mitochondriale : MALP (Mitochondrial-anchored protein ligase) dans la fission mitochondriale. En effet, dans des cellules HeLa, la surexpression de MALP stabilise aussi DRP1 au cours de l'apoptose et serait essentielle pour la libération du cytochrome c (Braschi, Zunino, et McBride 2009). A l'inverse, la surexpression de la protéase SUMO SENP5 diminue le SUMOylation de DRP1 induite par SUMO1 et prévient ainsi de la fission mitochondriale (Zunino et al. 2007). De manière intéressante,

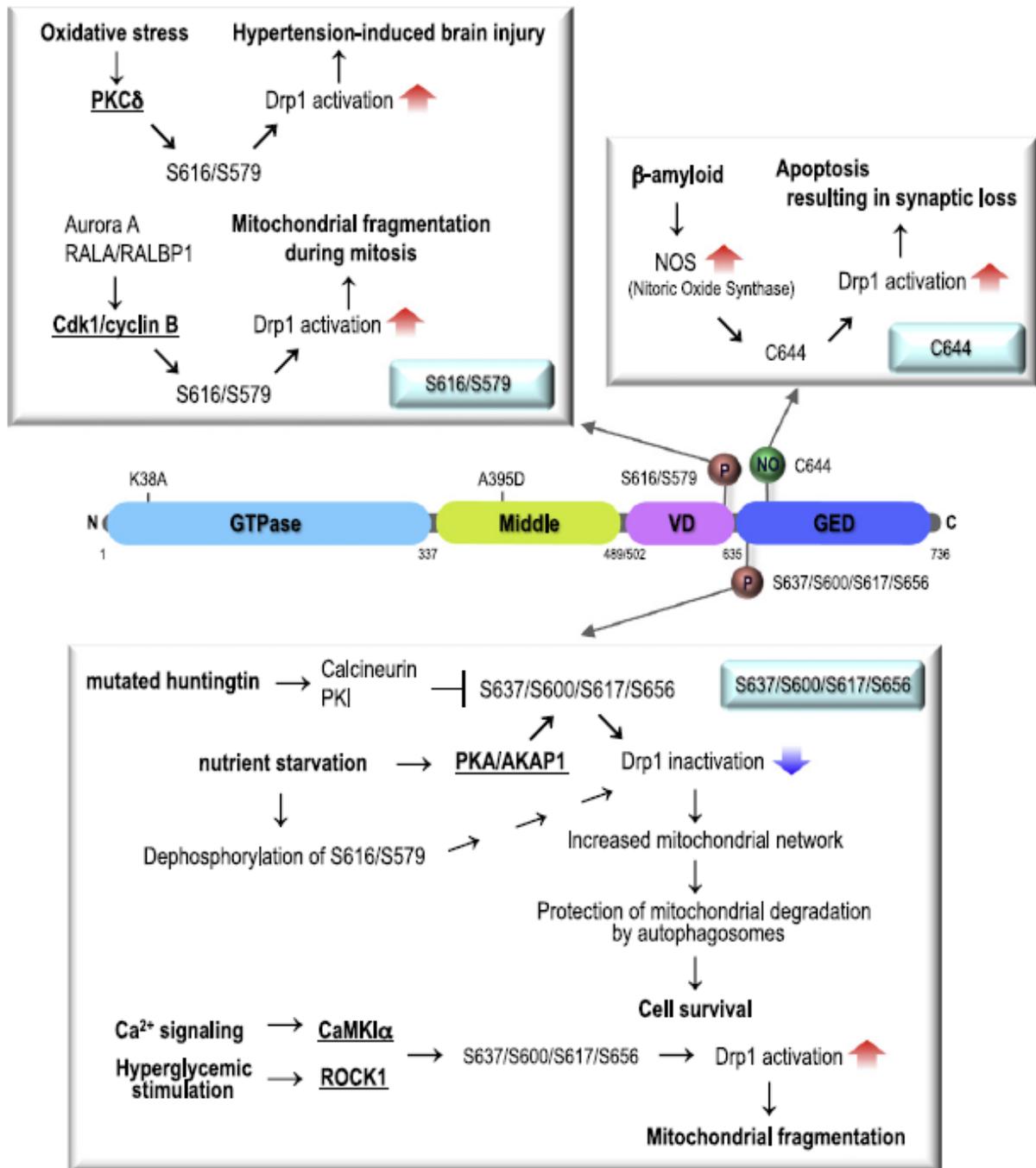


Figure 24 : L'activité de DRP1 est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles (Otéra 2020).

La numérotation des acides aminés est basée sur toutes les variantes d'épissage de Drp1 chez l'homme et le rat. VD, domaine variable (également appelé insert-B) ; GED : domaine effecteur de la GTPase ; P : phosphate ; NO : oxyde nitrique ; NOS : NO synthase.

cette protéase SENP5 est impliquée dans le cycle cellulaire : en phase G2/M, SENP5 localisée dans le nucléole est transloquée à la mitochondrie pour désSUMOyler DRP1 et induire la fission des mitochondries. La déplétion en SENP5 bloque le cycle cellulaire en phase G2/M et la fission des mitochondries (Zunino et al. 2009)

S-Nitrosylation

La S-nitrosylation est une modification post-traductionnelle permettant la régulation des protéines grâce à la fixation d'un groupement NO (oxyde nitrique) au niveau de résidus cystéines afin de former un S-nitrosothiol. Dans des cellules N2a ou N2a/APP695, un modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer, il a été découvert que la protéine β -amyloïde stimule la production de NO, induisant la S-nitrosylation de la Cys644 (cystéine 644) dans le domaine GED de DRP1 ce qui augmente l'activité GTPase, la formation d'oligomères de DRP1 et la fragmentation du réseau mitochondrial (Cho et al. 2009). Ce mécanisme a été impliqué dans les hypothèses physiopathologiques du développement de la maladie d'Alzheimer, avec la perte de connexions entre les synapses et l'altération neuronale.

O-GlucNAcylation

La O-GlucNAcylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un résidu unique de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) des protéines. Il a récemment été démontré dans des cardiomyocytes de rat que DRP1 peut subir une O-GlucNAcylation au niveau de la Thr-585 et la Thr-586 du domaine variable (Figure 24) Cette modification favorise la relocalisation de DRP1 actif à la mitochondrie et induit la fission mitochondriale. Il a été observé en parallèle une diminution de la phosphorylation Ser637, cependant ces études restent à confirmer (Gawlowski et al. 2012).

3.1.6. Les signaux cellulaires régulant la fission mitochondriale

Bien que la régulation de la fission mitochondriale par des modifications post-traductionnelles ou post-transcriptionnelles de DRP1 soit bien décrite, les signaux cellulaires à l'origine de la fission mitochondriale restent à approfondir. Ainsi, au cours de ces dernières années, plusieurs séries de signaux cellulaires pouvant conduire à la fission mitochondriale ont été découverts, comme le stress oxydant, la signalisation calcique ou encore les variations d'activité métabolique cellulaire. Nous détaillerons cette partie dans le paragraphe 4.2.

(B) Fusion Factors

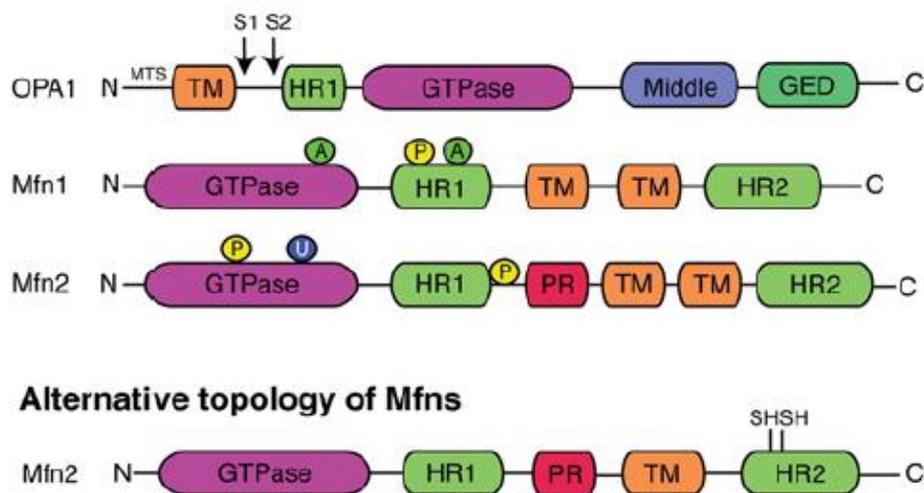


Figure 25 : Représentation schématique des éléments structurels des protéines de fusion et de leurs modifications post-traductionnelles associées (Tilokani 2018).

Illustration des protéines de la machinerie centrale impliquées dans (B) la fusion mitochondriale. Les domaines sont représentés dans des couleurs différentes. Les emplacements identifiés des modifications post-traductionnelles sont indiqués par P (Phosphorylation), A (Acétylation), ou U (Ubiquitination) ; GED : domaine effecteur de GTPase ; MTS : séquence de ciblage mitochondrial ; PR : Proline rich ; HR : heptad repeat ; TM : domaine transmembranaire

3.2. Les protéines de fusion : MFN1/2

La fusion mitochondriale est nécessaire à la maintenance du génome mitochondrial, elle participe ainsi au contrôle qualité mitochondrial. Maintenir une structure mitochondriale fusionnée protège de l'apoptose (Frezza et al. 2006). Chez les mammifères, la fusion mitochondriale a lieu en 2 temps. Premièrement, une fusion des membranes externes par l'interaction des mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) suivie d'une fusion des membranes internes par l'action des protéines OPA1.

3.2.1. Structure et fonction de MFN1/2

Les protéines MFN1 et 2 sont hautement conservées de la levure à l'homme. Elles ont initialement été décrites chez *drosophila melanogaster* sous le nom de Fzo1 (fuzzy onion) où elles assurent la fusion des membranes externes. Chez l'homme, elles sont codées par les gènes nucléaires *MFN1* et *MFN2*, qui sont localisées respectivement en 3q25-q26 (Uniprot Q8IWA4) et 1p36.22 (Uniprot O95140). MFN1 est une protéine de 741 acides aminés présentant 60% d'homologie avec la protéine MFN2, comportant 757 acides aminés. Tout comme la protéine DRP1, ces deux protéines appartiennent à la famille des dynamines GTPase. Elles sont constituées d'un domaine GTPase en N-terminal tourné vers le cytosol, de deux régions hydrophobes répétées HR1 et HR2 (heptad repeat) et de deux domaines transmembranaires nécessaires à la localisation mitochondriale (Figure 25).

Les protéines MFNs ont été identifiées comme des molécules en forme de V ancrées dans la ME par leurs deux domaines transmembranaires (Koshiba et al. 2004). L'ancrage du GTP au niveau des domaines GTPase permet le réarrangement des protéines MFNs afin d'initier la fusion des membranes externes mitochondriales (Cao et al. 2017). La surexpression de MFN1 et/ou MFN2 conduit à l'agrégation des mitochondries autour du noyau (Eura et al. 2003), tandis que la déplétion de MFN1 induit la fragmentation des mitochondries (Chen et al. 2003). Ces deux protéines semblent avoir des fonctions similaires, néanmoins, il a été mis en évidence que MFN1 est exprimée de façon ubiquitaire tandis que MFN2 est exprimée de façon tissu spécifique. De plus, MFN2 a un domaine GTPase plus petit que MFN1, de ce fait son activité GTPase est 20 fois moins importante que MFN1 (Li et al. 2019).

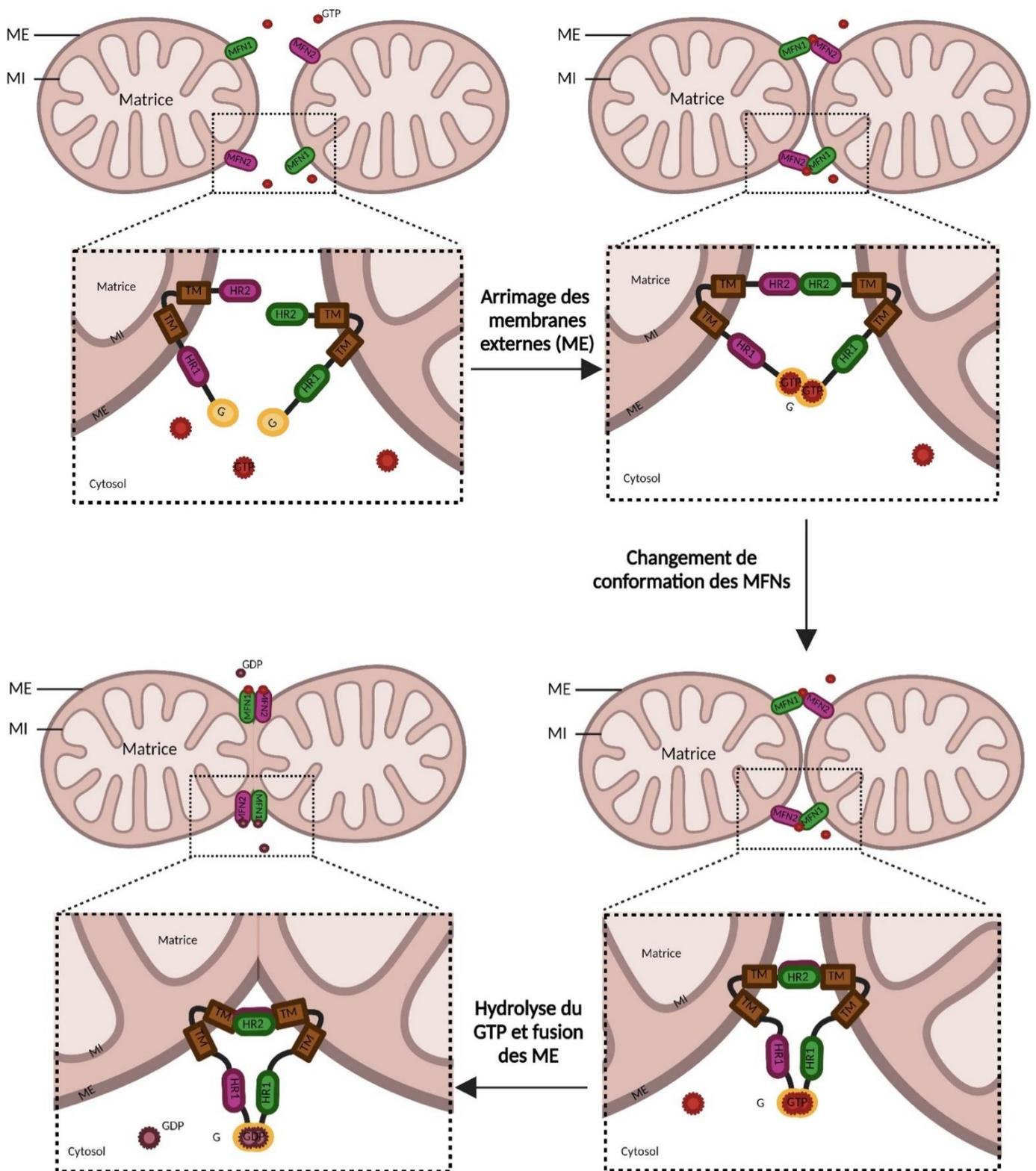


Figure 26 : Représentation schématique de la fusion des membranes mitochondriales externes (inspiré de (Tilokani et al. 2018; Giacomello et al. 2020; Gao et Hu 2021)).

(1) Les membranes mitochondriales externes sont assez proches l'une de l'autre pour la fusion mitochondriale, conduisant à l'amarrage mitochondrial et à une augmentation des sites de contact. (2) La membrane externe de deux mitochondries est attachée par l'interaction des domaines HR2 et/ou GTPase des MFNs. (3) La liaison ou/et l'hydrolyse du GTP induisent un changement de conformation de la MFNs. (4) Enfin, l'hydrolyse et l'oligomérisation dépendante du GTP assurent la fusion des membranes mitochondriales externes.

3.2.2. Mécanisme de la fusion des membranes externes

Au cours des 15 dernières années, il a été admis que la fusion des membranes mitochondriales externes se déroulait en trois temps : 1) l'arrimage des deux membranes externes, 2) le recrutement du GTP aux MFNs permettant le changement de conformation des protéines et rapprochant les membranes externes, 3) l'hydrolyse du GTP permettant la fusion des membranes externes (Figure 26) (Brandt et al. 2016). Chez les mammifères, il a été montré que les protéines MFNs établissent des complexes homo ou hétérotypiques. Récemment, il a été proposé que la queue en C-terminal de MFN1, qui abrite le domaine HR2, promeut la fusion mitochondriale.

3.2.3. Régulation de la fusion des membranes mitochondriales externes

La fusion des membranes mitochondriales externes établit des contacts entre mitochondries éloignées, réunit des compartiments distants et donc mélange des contenus biochimiques et ioniques différents. Ces événements sont nécessaires à de nombreux mécanismes tels que la division cellulaire, le métabolisme énergétique ou encore l'apoptose. Les principaux signaux permettant de réguler la fusion des membranes mitochondriales externes sont des interactions entre protéines, des modifications post-traductionnelles et des modifications lipidiques (Tableau 3). Néanmoins, l'étude de la régulation de la fusion des membranes externes mitochondriales reste à approfondir.

a) Phosphorylation

Les acteurs de la fusion MFN1 et MFN2 sont des cibles privilégiées de la régulation post-traductionnelle. MFN2 contiendrait ainsi un site de phosphorylation de la PKA sur la sérine 442 (Zhou et al. 2010), qui, phosphorylé, bloquerait l'activité fusogène et conduirait à la fission. De même, dans des conditions pro-apoptotiques, il a été mis en évidence que ERK peut phosphoryler MFN1 diminuant son oligomérisation et par extension, la fusion mitochondriale (Pyakurel et al. 2015).

b) Acétylation

L'acétylation est une modification chimique qui consiste à ajouter un groupement acétyle (COCH₃) sur une molécule. Dans le cas des MFNs, il a été montré que la déacétylation de MFN1/2 conduit à l'élongation des mitochondries. MFN1 et MFN2 peuvent être déacétylés par la Sirtuine cytosolique SIRT1 ou par l'histone déacétylase 6 (HDAC6) ce qui favorise l'hyper-fusion des mitochondries (Biel et al. 2016; Oanh, Park, et Cho 2017; Sooyeon, Go, et Kim 2016).

PROTEINE	MODIFICATION	EFFET BIOLOGIQUE	REFERENCES
MFN1	Ubiquitination par Parkin	Augmente la fission en ciblant MFN1 pour une dégradation protéasomique et active la mitophagie.	(Burchell et al. 2013)
	Ubiquitination par MARCH5	Favorise la fission	(Park et al. 2010)
	Ubiquitination par ERK (Thr526)	Favorise la fission	(Pyakurel et al. 2015)
MFN2	Phosphorylation par PKA (Ser442)	Favorise la fission	(Zhou et al. 2010)
	Ubiquitination par Parkin	Régule le niveau de MFN2 et la fusion mitochondriale	(Ziviani, Tao, et Whitworth 2010)
	Ubiquitination par MARCH5	Inhibe la fusion en ciblant MFN2 pour une dégradation par le protéasome.	(Nakamura et al. 2006)

Tableau 3 : Modifications post-traductionnelles des protéines de la fusion des membranes mitochondriales externes.

a) Ubiquitination

L'ubiquitination de MFN1 et 2 sur certains résidus favorise la fusion des membranes mitochondriales externes mais sur d'autres résidus empêche la fusion des membranes. Les premières études menées chez la levure ont montré que l'ubiquitine ligase E3 : Mdm30 est un important régulateur de la fusion mitochondriale. Chez les mammifères, de récentes études ont identifié plusieurs E3 ligase comme MGRN1 (Mahogunin Ring Finger-1) qui permettent l'ubiquitination des lysines K63 de MFN1 (Mukherjee et Chakrabarti 2016). Cette modification a pour conséquence de stabiliser les oligomères et favoriser la fusion.

D'autres E3 ligase comme MARCH5 (Sugiura et al. 2011), Parkin (Narendra et al. 2008; Tanaka et al. 2010), MAPL (MUL1) (Yun et al. 2014), HUWE1 (Leboucher et al. 2012) et Gp78 (Fu et al. 2013) conduisent à l'hyperubiquitylation des lysines et à la dégradation de MFN1/2 par le protéasome, ce qui inhibe la fusion mitochondriale.

b) Modification lipidique

De nombreuses fonctions membranaires sont régulées par des changements de la composition lipidique, le remodelage des membranes ne faisant pas exception. Les membranes mitochondriales contiennent de nombreuses classes de phospholipides comme les cardiolipines (CL) et l'acide phosphatidique (PA). Ces derniers ont la particularité de ne pas former de bicouche. De par cette propriété, ces lipides interviennent dans la réorganisation des autres lipides et facilitent aussi bien la fission que la fusion des membranes. Adachi et al 2016 (Adachi et al. 2016) ont montré que les phospholipases MitoPLD qui génèrent des PA régulent la fusion des membranes mitochondriales externes. La MitoPLD est ainsi indispensable à la courbure des membranes externes permettant leur rapprochement et leur fusion. De plus, les PA et la MitoPLD inhibe la fission mitochondriale. En effet, les PA en se liant à DRP1 inhibent l'activité GTPase de DRP1 (Adachi et al. 2016).

3.3. La protéine de fusion : OPA1

Une fois la fusion des membranes mitochondriales externes effectuée, les membranes mitochondriales internes doivent également fusionner. La protéine OPA1 est l'acteur majeur de cette étape. Le lien établi par l'équipe de C. Hamel en 2000 (Delettre et al. 2000), entre ce gène *OPA1* et le syndrome de Kjer, une maladie mitochondriale conduisant à une atrophie du nerf optique, a contribué à l'amplification des recherches sur cette protéine. De nombreux modèles murins et l'exploration d'échantillons et cellules de patients ont permis d'identifier d'autres rôles plus complexes de la protéine OPA1.

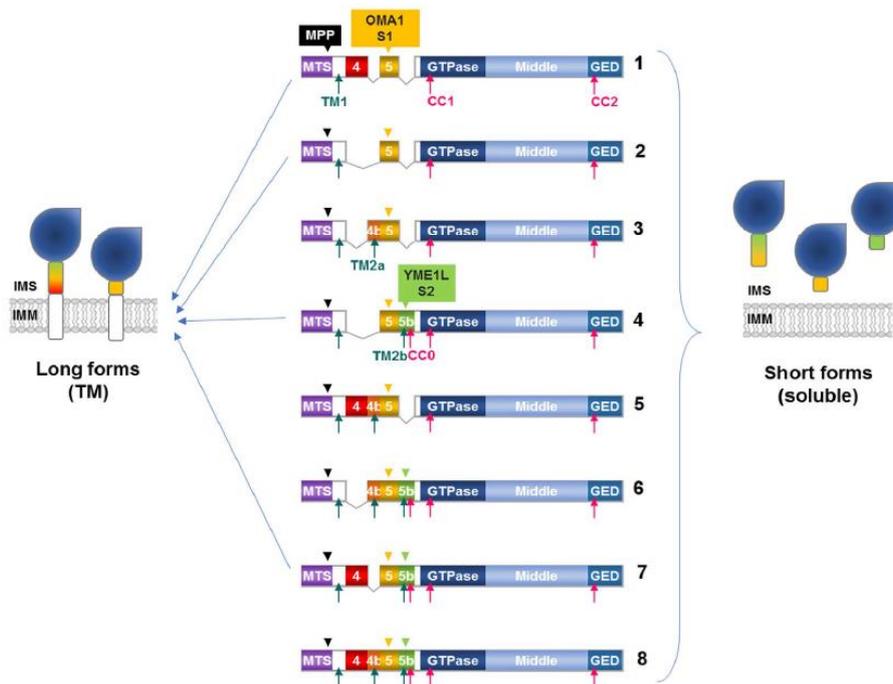


Figure 27 : Structure de la protéine OPA1, localisation des sites protéolytiques et structure des isoformes obtenues (Del Dotto et al. 2018)

3.3.1. Structure d'OPA1

La protéine OPA1 est une dynamine GTPase, codée par le gène nucléaire *OPA1*, localisée en 3q29 (Uniprot O60313). Chez l'homme, OPA1 est présente sous 8 isoformes qui proviennent d'un épissage alternatif des exons 4, 4b et 5b, codant pour des protéines de 924 à 1014 acides aminés. L'extrémité N-terminal comprend une séquence MTS (mitochondria targeting sequence) qui cible la mitochondrie, suivie d'un domaine transmembranaire TM et d'une séquence à structure coiled-coil. Les 3 domaines suivants de la protéine sont hautement conservés : le domaine GTPase, le domaine du milieu (middle) et le domaine effecteur de la GTPase (GED) en C-terminal (Figure 27). Les protéines OPA1 se localisent dans l'espace intermembranaire et les isoformes longues seraient ancrées à la membrane mitochondriale interne essentiellement au niveau des jonctions des crêtes. Les 8 isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire, néanmoins, elles sont présentes en quantité différente selon les tissus (Del Dotto et al. 2018), l'expression d'OPA1 est retrouvée de façon prédominante au niveau du cerveau, des muscles, de la rétine et des testicules.

3.3.2. Les différentes fonctions d'OPA1 dans ...

a) La fusion des membranes internes

La fonction principale d'OPA1 est la fusion des membranes mitochondriales internes. Cependant, son rôle est plus complexe, puisque les 8 isoformes de la protéine n'ont pas toutes la même fonction. Pour mieux comprendre le rôle de chaque isoforme d'OPA1, Olichon et al. ont réalisé sur cellules HeLa, l'extinction sélective de chacun des trois exons alternatifs : exon 4, 4b et 5b (A. Olichon et al. 2007). Il en résulte que l'exon 4 de la protéine OPA1 serait impliqué dans la fusion des mitochondries, que l'exon 4b participerait au maintien de l'ADNmt et que l'exon 5b pourrait maintenir la structure des crêtes (Del Dotto et al. 2018; A. Olichon et al. 2007). Néanmoins, cette approche expérimentale ne permet pas d'évaluer si une seule isoforme OPA1 est spécifiquement associée à une fonction mitochondriale définie.

Afin d'associer une isoforme à une fonction mitochondriale définie, une analyse moléculaire et biochimique détaillée a été réalisée dans des cellules OPA1^{-/-} où les différentes formes d'épissages individuelles d'OPA1 ont été exprimées de manière stable (OPA1-L ; OPA1-S et OPA1-L + OPA1-S) (Del Dotto et al. 2017). Ainsi, il a été suggéré que la forme longue (OPA1-L) était suffisante pour induire la fusion des membranes internes, tandis que l'expression de formes courtes uniquement (OPA1-S) conduit à inhiber la fusion des membranes internes et à l'apparition d'un phénotype fragmenté (Anand et al. 2014; Del Dotto et al. 2017; Wai et al. 2015). OPA1 aurait donc également un rôle dans la fission des mitochondries, ou, plus probablement, un défaut de fusion conduisant à la fission.

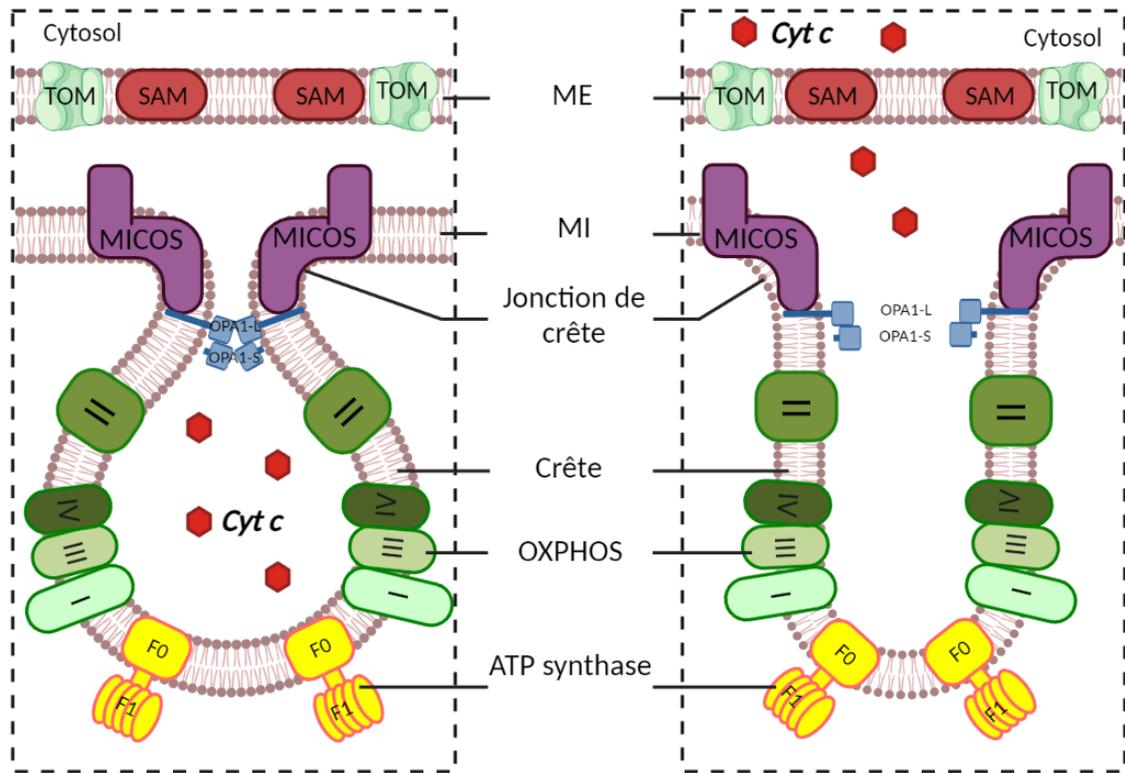


Figure 29 : Représentation schématique du remodelage des crêtes par OPA1 et MICOS lors du relargage du cytochrome c (cyt c) suite à l'induction apoptotique (inspiré de (Glytsou et al. 2016; van der Laan, Horvath, et Pfanner 2016)).

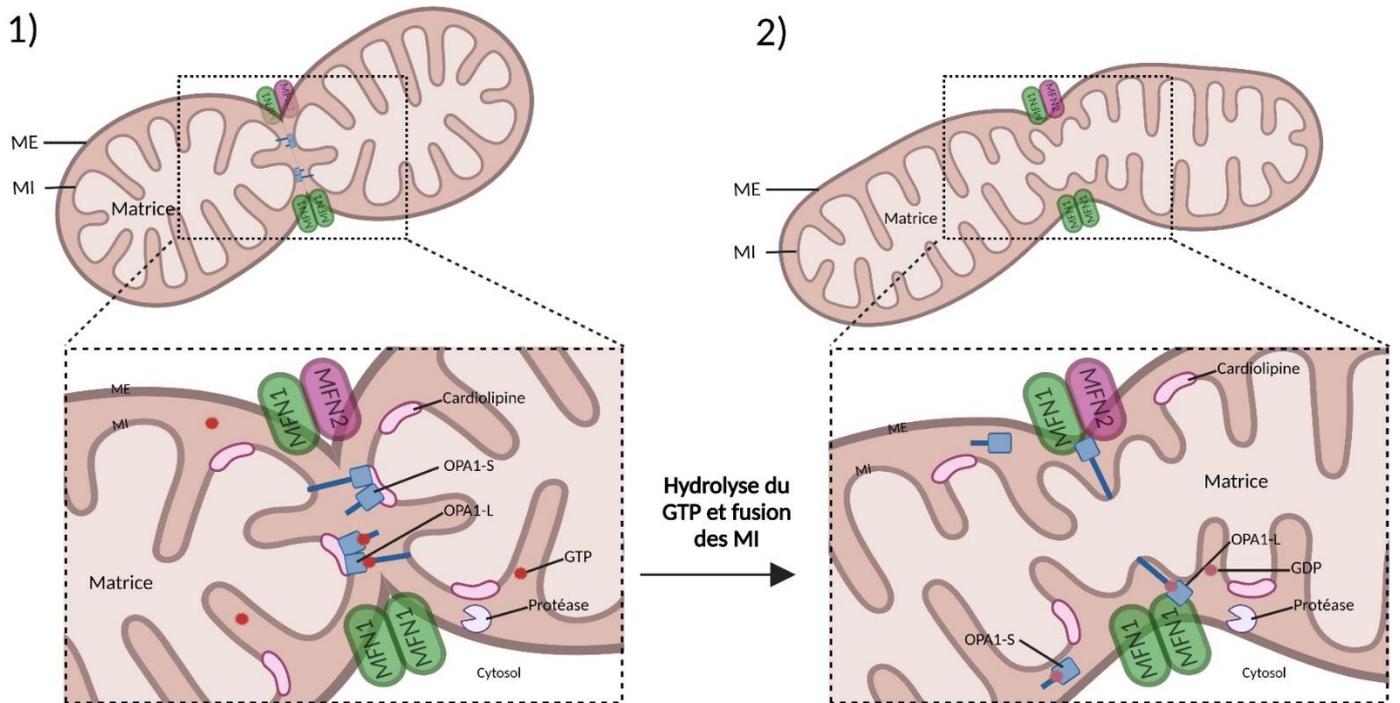


Figure 28 : Représentation schématique de la fusion des membranes mitochondriales internes (inspiré de (Tilokani et al. 2018; Giacomello et al. 2020; Gao et Hu 2021)).

(1) Après la fusion des membranes externes, OPA1 et les cardiolipines (CL) conduisent la fusion des membranes mitochondriales internes périphériques. **(2)** L'interaction entre OPA1 et CL de chaque côté de la membrane lie les deux membranes internes périphériques, qui fusionnent suite à l'hydrolyse du GTP de façon dépendant d'OPA1. Cette association est favorisée en présence d'OPA1-S la forme qui est générée par le clivage protéolytique d'OPA1-L.

b) La structuration des crêtes mitochondriales

OPA1 n'est pas seulement impliquée dans la fusion des membranes internes. En effet, des analyses par microscopie optique fluorescente et microscopie électronique à transmission ont montré que les cellules déplétées en OPA1 avaient non seulement un réseau mitochondrial fragmenté, mais également une altération des crêtes mitochondriales (Cipolat et al. 2006; Frezza et al. 2006). En effet, l'étude de Glytsou et al, (Glytsou et al. 2016) montre d'une part que OPA1 forme des oligomères (complexes OPA1) au niveau des jonctions de crêtes favorisant leur fermeture, et d'autre part que OPA1 s'associe en multimère à la sous-unité MIC60 du complexe MICOS, afin de maintenir la structure des jonctions de crêtes (Cogliati et al. 2013; Frezza et al. 2006; Glytsou et al. 2016) (Figure 28a).

c) L'Apoptose

Du fait que OPA1 soit impliquée dans la structuration des crêtes mitochondriales, OPA1 jouerait également un rôle dans l'apoptose. Ainsi, grâce au maintien de la structure des jonctions des crêtes, OPA1 séquestre le cytochrome c dans l'espace intra-crête (Frezza et al. 2006). Lors d'une induction apoptotique, les complexes OPA1 se dissocient ce qui relargue le cytochrome c vers l'espace intermembranaire puis dans le cytosol permettant l'activation de l'apoptosome (Figure 27b) (Landes et al. 2010). Il a ainsi été montré qu'une sous-expression d'OPA1 augmente la sensibilité des cellules à l'apoptose, tandis que sa surexpression protège les cellules du stress apoptotique (Olichon et al. 2003).

d) La maintenance de l'ADNmt

Enfin, il a été montré que l'inactivation d'OPA1 perturbe la distribution des nucléoïdes au sein des mitochondries et l'ancrage de l'ADNmt à la membrane mitochondriale interne. OPA1 serait donc essentielle à la maintenance et à la réplication de l'ADNmt (Elachouri et al. 2011).

3.3.3. Mécanisme de la fusion des membranes internes

L'organisation des membranes internes mitochondriales est plus complexe et difficile à étudier. Les données concernant le rôle d'OPA1 dans le remodelage des membranes mitochondriales internes et de la fusion sont de plus en plus riches. Comme nous venons de l'évoquer, la fusion des membranes internes dépend d'un équilibre fin entre la forme longue et la forme courte d'OPA1 (le mécanisme conduisant à la forme courte d'OPA1 sera détaillé ci-dessous). La forme longue d'OPA1 établirait deux types d'interactions : une interaction entre deux protéines OPA1-L, ce qui permet le maintien de la structure des jonctions de crête mais ne permet pas la fusion des membranes, et une interaction entre OPA1-L et les cardiolipines de la membrane interne, ce qui permet la fusion. De plus, l'ajout d'une protéine courte de OPA1 sur ce complexe OPA1-L/cardiolipines

NOM	NOM ALTERNATIF	LOCALISATION	POIDS MOLECULAIRE
MIC 60	Mitofiline	Membrane interne	88 à 90 kDa
MIC 10	MINOS	Membrane interne	8.8 kDa
MIC 19	CHCHD3	Membrane interne	26.2 kDa
MIC 25	CHCHD6	Membrane interne	26.5 kDa
MIC 23	APOO	Membrane interne	22.3 kDa
MIC 27	APOOL	Membrane interne	29.2 kDa
MIC 13	Qill	Membrane interne	13 kDa
MIC 14	CHCHD10	Membrane interne	14.1 kDa

Tableau 4 : Composition du complexe MICOS chez l'Homme (Kozjak-Pavlovic 2017).

améliore la fusion des membranes (Figure 29) (Giacomello et al. 2020). Néanmoins, le mécanisme précis du rapprochement des membranes internes pour leur fusion n'est pas connu.

3.3.4. Les protéines de maturation d'OPA1

a) YME1L

YME1L (Métalloprotéase à zinc dépendante de l'ATP YME1L1) (Uniprot Q96TA2) ou i-AAA est codée par le gène *YME1L1*. C'est une protéine de 773 acides aminés constituée d'un signal d'adressage à la mitochondrie, d'une partie N-terminal contenant deux domaines transmembranaires, d'un domaine AAA contenant deux motifs « walker » A et B et d'un domaine protéolytique en C-terminal (Ohba, MacVicar, et Langer 2020). Grâce à ces domaines transmembranaires, YME1L est liée à la membrane mitochondriale interne, où elle va former des complexes hexamériques en forme de cylindre permettant la protéolyse. YME1L est une protéase ATP-dépendante, ainsi lors de l'hydrolyse de l'ATP, les protéines transmembranaires sont extraites des membranes et placées dans la cavité interne de la protéase. Le rôle premier d'YME1L dans la dynamique mitochondriale est donc de réguler OPA1 par des processus protéolytiques au niveau du site S2 (Figure 27). Ces mécanismes seront détaillés dans le paragraphe 3.3.6.a).

b) OMA1

OMA1 (Metalloendopeptidase OMA1, mitochondrial) (Uniprot Q96E52) est codée par le gène *MPPR1*. C'est une protéine de 524 acides aminés appartenant à la famille M48C des métalloprotéases. Elle est constituée d'une région N-terminale spécifique aux eucaryotes, un domaine métallopeptidase M48, d'un domaine transmembranaire qui l'ancre à la membrane interne et d'un domaine catalytique de la protéase : HExxH. Les études par cristallographie montrent que son site actif est tourné vers l'espace intermembranaire (Levytskyy 2017). De plus, ces études suggèrent que OMA1 existe sous la forme de complexes homo-oligomériques. La fonction première de OMA1 est de réguler OPA1 par des processus protéolytiques au niveau du site S1 (Figure 27). Ces mécanismes seront détaillés dans le paragraphe 3.3.6.a)).

3.3.5. Les protéines interagissant avec OPA1

a) MICOS

Le complexe MICOS est un complexe multi protéique de 1279 kDa qui a été découvert dans les années 2005 lors de l'identification des partenaires de la mitofiline (protéine impliquée dans le maintien des crêtes mitochondriales). Chez les mammifères, il a actuellement été décrit 9 sous unités composant le complexe MICOS (Tableau 4). Localisé au niveau de la membrane mitochondriale interne, ce complexe a initialement été

PROTEINE	MODIFICATION	EFFET BIOLOGIQUE	REFERENCES
OPA1	Clivage par OMA1	Inhibe la fusion mitochondriale	(Head et al. 2009)
	Clivage par YME1L	Requis pour la fusion	(Song et al. 2007)
	Protéolyse par PARL	Requis pour générer un pool d'OPA1-S qui inhibe le remodelage des crêtes	(Cipolat et al. 2006)
	Acétylation (Lys936, Lys961)	Diminue l'activité GTPase d'OPA1	(Samant et al. 2014)
	O-liée β -N-acétyl-glucosaminylation (Résidus Ser/Thr non définis)	Augmente la fission mitochondriale	(Makino et al. 2011)

Tableau 5 : Modifications post-traductionnelles des protéines de la fusion des membranes mitochondriales internes

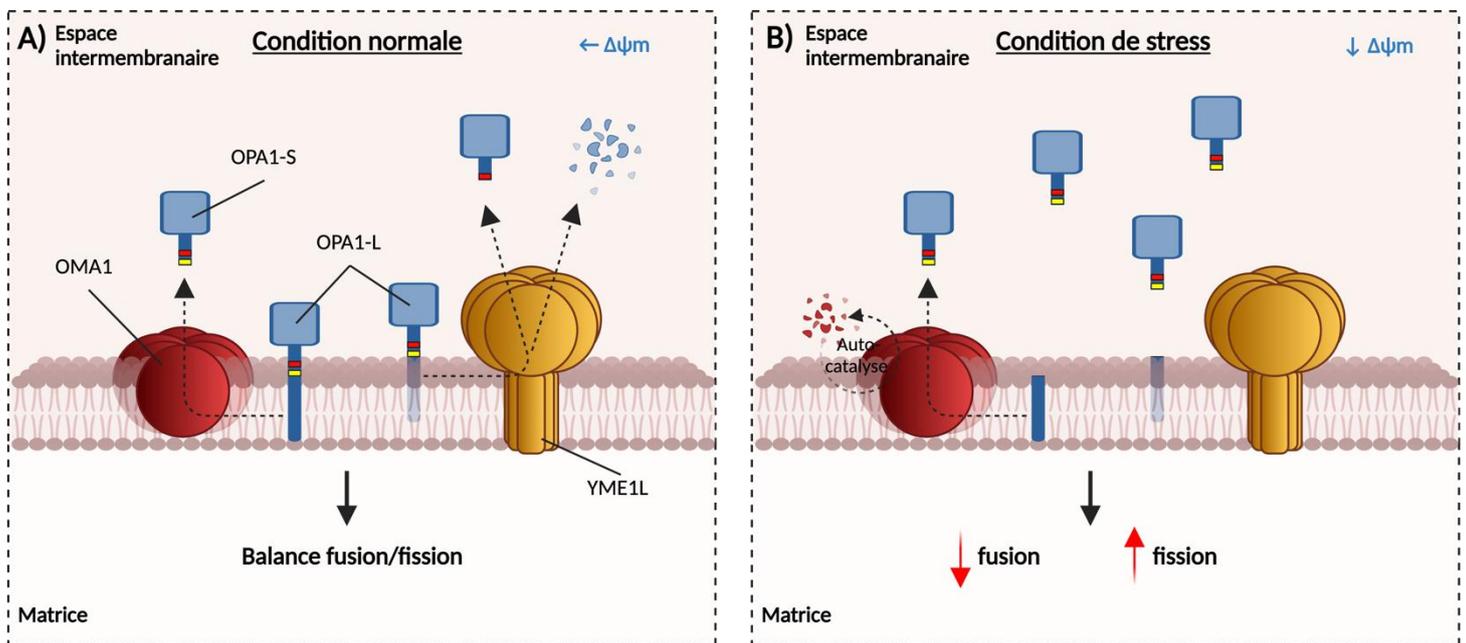


Figure 30 : Régulation protéolytique de OPA1.

A) Après l'importation de OPA1 à la mitochondrie, YME1L et/ou OMA1 convertissent les formes OPA1-L en OPA1-S. L'accumulation équilibrée des deux formes maintient un réseau mitochondrial tubulaire. **B)** En condition de stress, certains signaux métaboliques peuvent sur-activer OMA1 ou YME1L. L'accumulation de la forme OPA1-S conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial.

décrit comme étant nécessaire à la formation des jonctions de crêtes, et au maintien des crêtes mitochondriales. En 2016, l'étude de Glytsou et al., 2016 (Glytsou et al. 2016) met en avant qu'OPA1 et MICOS contrôlent ensemble les jonctions de crêtes lors de l'apoptose, cependant, leurs interactions restent à éclaircir.

b) ATP synthase

L'ATP synthase que l'on a décrit précédemment (paragraphe 2.3.2.c)) est connue pour définir la courbure des crêtes mitochondriales (Giraud et al. 2002; Paumard et al. 2002; Rampelt et al. 2017). Plus récemment, l'étude de Quintana-Cabrera (Quintana-Cabrera et al. 2018) a suggéré que OPA1 et les oligomères ATP synthase interagissent ensemble afin de préserver la fonction mitochondriale. Dans les cellules déplétées en OPA1, il a été constaté que les crêtes mitochondriales ainsi que l'oligomérisation de l'ATP synthase étaient affectées. Inversement, lorsque de la dimérisation de l'ATP synthase est génétiquement altéré, OPA1 ne parvient pas à maintenir la structure des crêtes. En revanche lors d'une surexpression de la protéine OPA1, il a été observé une meilleure ultrastructure des mitochondries ainsi que la stabilisation des oligomères de l'ATP synthase (Davies et al. 2012). Ceci indique une interaction réciproque fonctionnelle et structurelle entre OPA1 et l'ATP synthase.

3.3.6. Régulation de la fusion des membranes mitochondriales internes

Les 8 isoformes d'OPA1 sont exprimées de manière ubiquitaire, néanmoins, l'abondance de chaque variant est tissu dépendant. Au niveau protéique, les ratio d'OPA1-L et OPA1-S sont également variables en fonction des tissus (Akepati et al. 2008; Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000, 2001). Cette régulation se fait principalement grâce à des processus protéolytiques de OPA1 (Figure 30 ; Tableau 5).

a) Processus protéolytiques de OPA1

Après son importation à la mitochondrie grâce à sa séquence MTS, les 8 formes longues d'OPA1 qui sont ancrées à la membrane mitochondriale interne, peuvent être clivées par différentes protéases au niveau des sites S1 et S2 pour générer des formes courtes d'OPA1 (Ishihara et al. 2006a). Chez l'Homme, les 8 isoformes OPA1-L contiennent un site S1 et la moitié d'entre elles (isoformes 4, 6, 7 et 8) contiennent également un site S2 (Song 2007). En 2003, l'équipe de Thomas Langer découvre les deux protéases à l'origine des processus protéolytiques d'OPA1 : YME1L agissant au niveau du site S2 et OMA1 agissant au niveau du site S1 (Kaser et al. 2003). Par la suite, ce même groupe montre que chez des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), aucun clivage de la protéine OPA1 n'est observé lorsque les cellules sont déplétées à la fois de YME1L et de OMA1 (Anand et al. 2014). Ainsi, en condition physiologique, ces deux protéases établissent un équilibre entre les formes OPA1-L et OPA1-S. Cependant, ces deux formes d'OPA1 ne semblent pas jouer le même rôle dans la fusion mitochondriale. En effet, l'étude de KO YME1L et OMA1 suggère que OPA1-L est suffisante pour

induire la fusion, tandis que la surexpression de OPA1-S favoriserait la fission (Anand et al. 2014; Ishihara et al. 2006a).

On sait peu de chose sur le clivage d'OPA1 médié par YME1L. Son activité serait stimulée métaboliquement par une augmentation de l'activité OXPHOS dans des cellules cultivées en régime cétogène, c'est-à-dire par apport d'acétoacétate et de β -D-hydroxybutyrate, ce qui contourne la glycolyse et alimente directement les mitochondries (Mishra et al. 2014). De plus, l'activité de YME1L est inhibée dans des cellules pauvres en ATP (Rainbolt, Saunders, et Wiseman 2015), voire dégradée par le protéasome en condition de stress. Enfin, cette étude suggère que YME1L dégrade OMA1 dans des mitochondries dépolarisées mais contenant un niveau élevé en ATP (Rainbolt et al. 2015).

Contrairement à YME1L, il a été mis en évidence que OMA1 est activée en condition de stress, c'est-à-dire en condition de privation d'ATP, de chute du potentiel de membrane, de stress oxydant, de stimuli apoptotique... (Ehse et al. 2009; Garcia et al. 2018; Head et al. 2009; Rainbolt et al. 2015). En effet, suite à l'utilisation d'un découplant comme le CCCP, le potentiel de membrane s'effondre, permettant à OMA1 de s'auto-cliver au niveau de son extrémité C-terminale, ce qui augmente son activité catalytique (Figure 30) (Zhang, Li, et Song 2014). L'étude récente de Murata et al, (Murata et al. 2020) montre que des fluctuations localisées du $\Delta\Psi_m$, ou "scintillement", provoquent l'activation d'OMA1 en tant que réponse de stress protectrice contre l'hyperfusion mitochondriale. Ainsi, lors de la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial, OPA1 se trouve majoritairement sous forme OPA1-S conduisant à la fragmentation du réseau mitochondrial. De manière intéressante, l'auto-dégradation d'OMA1 par le protéasome permet de restaurer la morphologie du réseau mitochondrial (Baker et al. 2014) (Figure 30).

b) Autres régulations de OPA1

Bien que la régulation d'OPA1 médiée par les processus protéolytiques soit bien décrite, l'étude des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles reste peu approfondie. En effet, les mécanismes moléculaires régissant l'épissage alternatif de son ARNm ne sont pas connus. En 2010, Kar et al., (Kar et al. 2010) ont montré que OPA1 pouvait être ubiquitinylée au cours du cycle cellulaire par la ligase APC/CCDH1 ce qui contrôlerait son niveau d'expression. De plus, OPA1 peut être O-GlcNAcétylée durant l'hyperglycémie dans des cardiomyocytes néonataux, ce qui conduit notamment à la fragmentation du réseau mitochondrial (Makino et al. 2011).

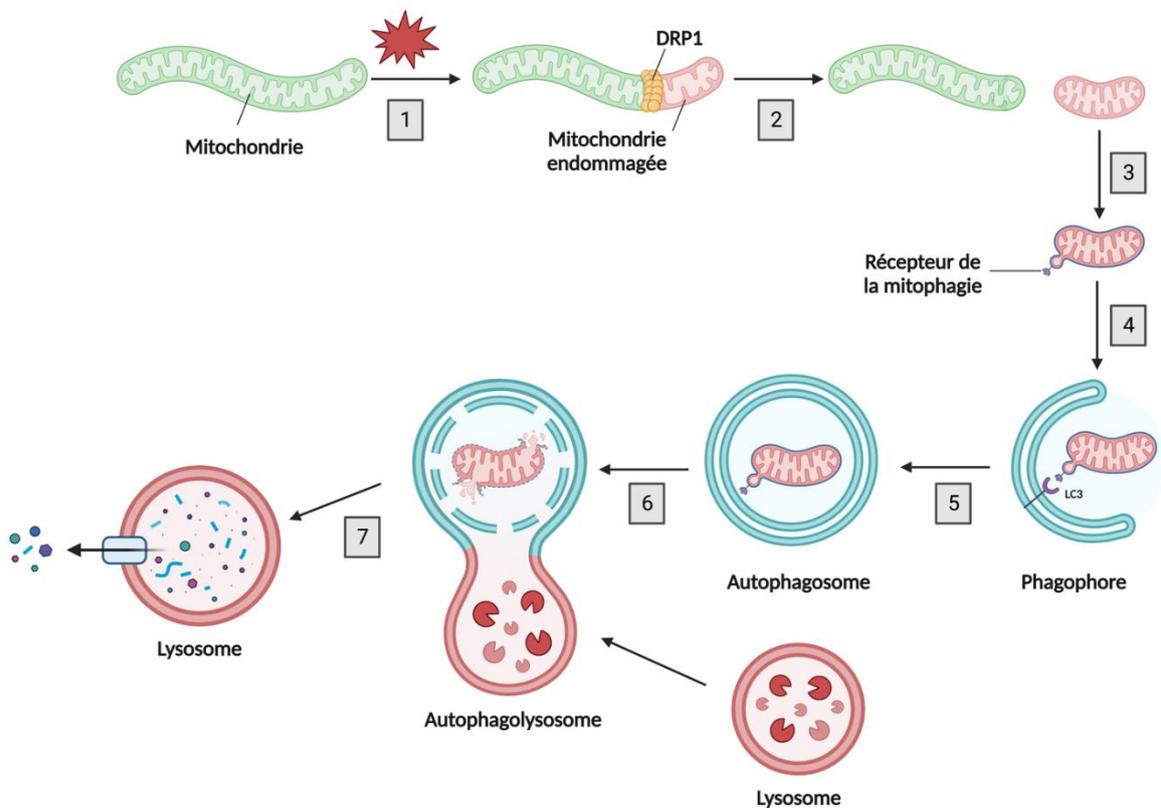


Figure 31 : La mitophagie (inspiré de (Onishi et al. 2021)).

(1) Mitochondries excédentaires ou endommagées par des ROS, des mutations de l'ADNmt, des composés chimiques... **(2)** Des signaux intra et extracellulaires favorisent l'isolement des mitochondries via la fragmentation des réseaux tubulaires. **(3)** Les récepteurs de mitophagie ou les adaptateurs d'ubiquitine-autophagie qui confèrent une sélectivité de dégradation sont recrutés et/ou activés à la surface des mitochondries. **(4)** Les principales protéines liées à l'autophagie se dirigent vers les mitochondries et génèrent la membrane d'isolement/phagophore entourant les mitochondries. **(5)** Les mitochondries ciblées sont enfermées et séquestrées par les autophagosomes. **(6)** Les autophagosomes sont transportés et fusionnés avec des lysosomes. **(7)** Les hydrolases lysosomales se déversent dans les autophagolysosomes pour dégrader les mitochondries, et le contenu sera recyclé.

3.4. Le contrôle qualité des mitochondries : la mitophagie

L'équilibre entre la fusion et la fission est particulièrement importante lors du contrôle-qualité des mitochondries. La fusion favorise le mélange des contenus de mitochondries saines ou partiellement dysfonctionnelles. La fission permet la distribution et la migration de nouvelles mitochondries, mais sépare également les parts endommagées des mitochondries. Le système autophagique cible ensuite ou conjointement les mitochondries altérées pour mieux les dégrader sous l'action des activités protéolytiques des phagolysosomes. Ce processus catabolique, appelé mitophagie, contribue à maintenir le contrôle de la qualité des mitochondries et la quantité mitochondriale dans de multiples types cellulaires (Onishi et al. 2021).

Ce qui caractérise une mitochondrie endommagée peut avoir plusieurs formes, mais un point concerne généralement l'atteinte des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale et la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial. Ceci a pour conséquence notamment de stabiliser, au niveau de la membrane mitochondriale externe, une sérine-thréonine kinase : PINK1. PINK1 recrute ensuite la E3 ubiquitin ligase PARKIN conduisant à l'ubiquitylation de protéines de la membrane externe telles que MFN2, VDAC ce qui empêche la fusion des mitochondries et l'accumulation de résidus Ubiquitine correspond à un signal indispensable au recrutement du phagophore. L'ubiquitylation permet le recrutement des protéines adaptatrices comme p62 ou OPTN (optineurin) grâce à leurs domaines de liaison à l'ubiquitine. Ces protéines seront ensuite reconnues par LC3 (light chain 3) contenue sur le phagophore. Une fois reconnues, les mitochondries sont séquestrées dans un complexe nommé autophagosome. Il fusionne ensuite avec des lysosomes pour former un autophagolysosome riche en hydrolases (Figure 31) (Ashrafi et Schwarz 2013; Onishi et al. 2021; Yoo et Jung 2018). Cette cascade d'évènements ou macro-mitophagie, impose donc une réduction de la longueur des mitochondries pour faciliter l'étape de phagocytose. La fission DRP1 dépendante est donc avancée comme une étape indispensable à la mitophagie. Cependant, d'autres processus de mitophagie existent, notamment par l'action de protéases en interne des mitochondries et/ou des micro-vésiculations, des bourgeonnements mitochondriaux libérant les contenus endommagés sans fission, ni phagocytose majeure.

4. La relation ambiguë entre la dynamique mitochondriale et le métabolisme

A première vue, les mécanismes de la dynamique mitochondriale semblent distincts des processus biochimiques et métaboliques de la mitochondrie. Néanmoins, la plupart des études bioénergétiques pionnières ont été réalisées sur des mitochondries isolées qui, du fait des procédures de fractionnement, ne conservent ni la morphologie du réseau, ni ses contacts étroits avec le cytosquelette et les autres organelles cellulaires, telles que le réticulum endoplasmique. De plus en plus d'études soulignent des corrélations plus ou moins étroites entre activité de la chaîne respiratoire, phosphorylation oxydative et organisation du réseau. Ainsi, de nombreuses études montrent que la morphologie du réseau peut également être modulée par plusieurs paramètres physiologiques, notamment la bioénergétique mitochondriale et, inversement, que la dynamique

Médiateurs	Fonction	Maladie associée	Morphologie du réseau des fibroblastes de patients	Défaut métabolique des fibroblastes de patients	Ref
DRP1	Fission des mitochondries	Fission Mitochondriale et Peroxysomale défectueuse 1 (EMPF1)	Connecté	??	(Gerber et al. 2017; Keller et al. 2021; Sheffer et al. 2016; Waterham et al. 2007)
MFN2	Fusion des membranes externes mitochondriales	Charcot-Marie-Tooth de type 2A	Agrégation majeure ou pas d'impact	+/- Diminution de l'oxydation du glucose et de OXPPOS	(Amiott et al. 2008; Detmer et al. 2008; Loiseau et al. 2007; Vielhaber et al. 2013)
OPA1	Fusion des membranes internes mitochondriales	Atrophie optique autosomique dominante	+/- Fragmenté	+/- Couplage des OXPPOS +/- Baisse potentiel de membrane mitochondrial	(Cretin et al. 2021; Kane et al. 2017; Aurélien Olichon et al. 2007)

Tableau 6 : Relation entre défaut de protéines de fusion/fission, morphologie du réseau mitochondrial et métabolisme.

mitochondriale peut influencer le métabolisme énergétique. Cependant, le lien direct entre les différents états du réseau et la bioénergétique mitochondriale, tout comme la régulation de ces possibles interrelations restent encore peu clairs.

4.1. Un défaut de fusion/fission influence t'il le métabolisme ?

Les premières indications d'un impact de la morphologie du réseau sur la bioénergétique mitochondriale sont venues de la découverte de mutations dans certains gènes impliqués dans les mécanismes du fusion/fission, responsables de maladies neurodégénératives associée à une dérégulation du métabolisme mitochondrial. Les principales maladies neurodégénératives liées à la dynamique mitochondriale impliquent des mutations dans les gènes codant pour les protéines *GDAP1*, *MFN2* et *OPA1*. Les mutations liées aux gènes *GDAP1* et *MFN2* sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (J. Cassereau et al. 2011; Julien Cassereau et al. 2011; Züchner et al. 2004) alors que les mutations liées au gène *OPA1* sont responsables d'atrophie optique autosomique dominante (AOAD) (Delettre et al. 2000) (Tableau 6).

4.1.1. Défaut de fission et métabolisme énergétique

a) **DRP1**

Diverses études ont montré que la déplétion de *DRP1* dans des cellules en culture est associée à une altération de la fission du réseau mitochondrial, à une inhibition de la prolifération cellulaire et une diminution de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Benard et al. 2007; Parone et al. 2008). Ainsi, l'extinction de l'expression de *DRP1* par siRNA dans des cellules Hela entraînait une augmentation du niveau de branchement et une hyper-tubulation du réseau mitochondrial et, conjointement, une diminution de la respiration phosphorylante (état III) et de la synthèse d'ATP maximale (Benard et al. 2007). Parone et al. (2008) ont confirmé ces résultats, toujours sur cellules Hela : la déplétion de *DRP1* par shRNA induisait également une diminution drastique de la respiration phosphorylante, mais également une probable augmentation de la fuite de protons (diminution du couplage OXPHOS et du potentiel de membrane). Une augmentation de la production de ROS et du stress oxydant étaient également observées, ainsi qu'une déplétion partielle de l'ADNmt. La séquence et la causalité de ces différents évènements n'est pas clairement établies par ces études, cependant, le défaut de fission (Benard et al. 2007) et de mitophagie (Parone et al. 2008) suggèrent que ces altérations pourraient être liées à un défaut de renouvellement des mitochondries et une accumulation de mitochondries « endommagées ».

De manière surprenante, le KO général de *DRP1* chez la souris démontre que celui-ci est indispensable pour le développement embryonnaire (Ishihara et al. 2009; Wakabayashi et al. 2009), notamment pour la formation des neurites et synapses, mais ne semble pas induire d'inhibition drastique du métabolisme

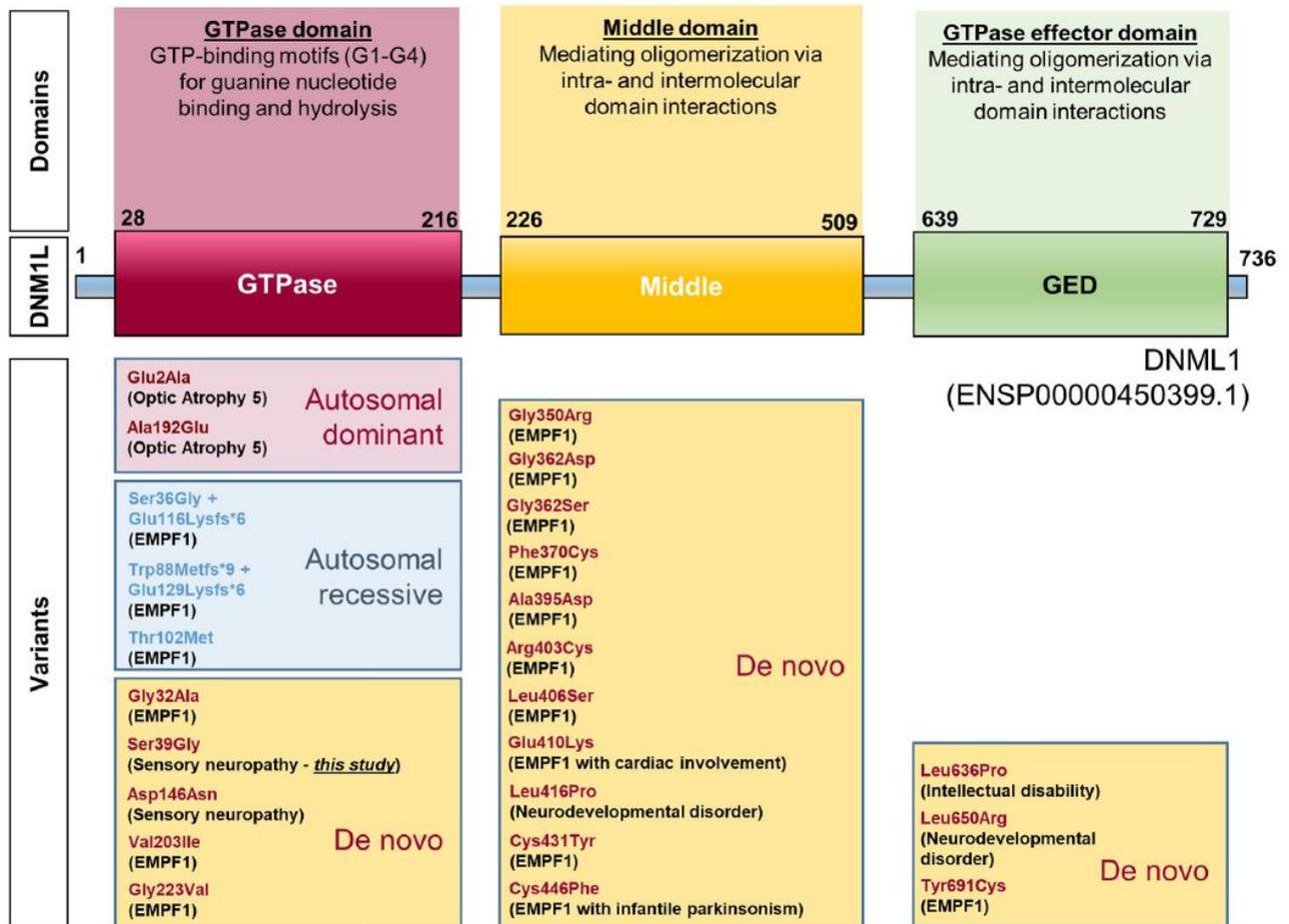


Figure 32 : Variants identifiés sur chaque domaine de DRP1 (Keller et al. 2021).

En haut : structure du domaine GTPase, du domaine médian et du domaine effecteur de la GTPase (GED). En bas : les variants identifiés et le phénotype consécutif de chaque variant pathogène signalé. (EMPF1 : Encéphalopathie due à une fission mitochondriale et peroxysomale défectueuse 1)

énergétique, puisque les niveaux d'ATP cellulaire ne semblent pas modifiés (Wakabayashi et al. 2009) . De même, dans un modèle de souris haploinsuffisante pour DRP1 (souris DRP1 +/-, (Bouche et al. 2021)), bien que la morphologie mitochondriale soit altérée, aucune altération notable de la respiration maximale en présence des substrats des complexes I et/ou II n'était retrouvée.

Chez l'homme, la protéine DRP1 est fortement exprimée dans le cerveau, et des variations pathogènes de sa séquence entraînent des déficiences neuronales et le plus souvent, la mort dans la petite enfance. Des variants pathogènes de DRP1 ont ainsi été décrits dans l'encéphalopathie complexes et sévères, autosomiques dominantes ou récessives, due à une Fission Mitochondriale et Peroxysomale défectueuse 1 (EMPF1, OMIM 614388), ainsi que dans l'Atrophie Optique de type 5, autosomique dominante isolée (OPA5, OMIM 610708) (Gerber et al. 2017; Keller et al. 2021; Sheffer et al. 2016; Waterham et al. 2007). A ce jour, un certain nombre de mutations dominantes négatives de novo dans DRP1 ont été identifiées comme altérant l'assemblage ou l'activité GTPase, et entraînent une EMPF1 (Figure 32). L'existence d'une grande variété de phénotypes délétères, dans différents types cellulaires, souligne l'importance primordiale du maintien de l'équilibre entre la fission et la fusion et d'un réseau mitochondrial dynamique. Cependant, à notre connaissance, il n'existe à l'heure actuelle pas de données sur l'effet des variants pathogènes de DRP1/DNM1L sur la phosphorylation oxydative ou le métabolisme énergétique.

4.1.2. Défaut de fusion et métabolisme énergétique

a) MFN2

Le niveau d'expression de la protéine MFN2 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie métabolique, notamment par la régulation du métabolisme mitochondrial, de métabolites/cofacteurs clés comme le coenzyme Q et le glucose, ainsi que dans la signalisation de l'insuline. En effet, la déplétion de MFN2 dans les lignées de myoblastes L6E9 conduit à une diminution de l'oxydation du glucose et du potentiel de membrane mitochondrial (Bach et al. 2003). Plus tard, une autre étude sur cette lignée a confirmé qu'une inhibition de 50% de l'expression de MFN2 induisait une réduction de l'oxydation du glucose, mais également du pyruvate et des acides gras, concomitante d'une stimulation du métabolisme glycolytique. Cette diminution du flux de substrat était accompagnée logiquement d'une diminution du potentiel de membrane. Cette diminution du métabolisme oxydatif était associée à une diminution d'expression de sous-unités des complexes I et III de la chaîne respiratoire. A l'inverse, une surexpression de MFN2 dans les cellules Hela augmentait l'oxydation du glucose et le $\Delta\Psi_m$ (Pich et al. 2005). Cependant, le lien entre modulation de la morphologie du réseau et réponse métabolique n'est pas évident dans cette étude : en effet, la surexpression d'une MFN2 tronquée en C-terminal (perte de la capacité d'induction de la fusion) entraînait les mêmes résultats, sans altération visible de la morphologie du réseau.

In vivo, dans des modèles de souris, il a été montré que la délétion de MFN2 entraîne une létalité embryonnaire (Chen, McCaffery, et Chan 2007). Sur un modèle murin de KO conditionnel MFN2, Chen et al. (2007) ont montré que la déplétion de MFN2 entraîne une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase (COX, complexe IV), ainsi qu'une augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH, complexe II) dans les cellules de Purkinje mutantes (Chen et al. 2010). L'étude de Mourier et al. (2015) également sur un modèle murin KO conditionnel MFN2, montre que la déplétion de MFN2 entraîne dans les cardiomyocytes une diminution de la capacité phosphorylante et maximale de la chaîne respiratoire, mais sans altération de l'activité des complexes. Les analyses protéomiques et métabolomiques réalisées suggéraient un défaut global de la voie de biosynthèse des terpénoïdes, conduisant à un déficit en coenzymes Q9 et Q10. Cependant, le lien entre fission ou défaut de fusion et déficit en CoQ est difficile à établir. En effet, la supplémentation en CoQ10 permettait la restauration de la respiration mitochondriale, accompagnée d'une restauration partielle de la morphologie du réseau ; mais à l'inverse, la normalisation de la morphologie de ce réseau induite par le KO de DRP1 dans les MEFS KO-Mfn2 n'était pas accompagnée d'une normalisation des niveaux de CoQ (Mourier et al. 2015). Ces données suggèrent donc que le défaut de synthèse du CoQ n'est pas directement lié à la morphologie du réseau mitochondrial.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) est une neuropathie périphérique autosomique dominante caractérisée par des déficits moteurs et sensoriels des membres distaux (Chan 2020), provoquée par des mutations de MFN2. La plupart des mutations MFN2 associées au CMT2A conduit à une agrégation des mitochondries dans des cellules en culture (Detmer et Chan 2007). Une étude du laboratoire (Loiseau et al. 2007) sur fibroblastes primaires issus de patients atteints de CMT2A a mis en évidence un défaut de couplage de la phosphorylation oxydative et une diminution du $\Delta\Psi_m$, sans altération remarquable du réseau. De façon globale, les études sur fibroblastes de patients atteints de CMT2A (Amiott et al. 2008; Loiseau et al. 2007; Vielhaber et al. 2013) ou surexprimant une MFN2 mutée (Larrea et al. 2019) rapportent des résultats extrêmement variables et souvent contradictoires concernant l'activité de la chaîne respiratoire et la capacité ou efficacité de la phosphorylation oxydative.

Au vu de l'ensemble de ces données, de plus en plus d'informations suggèrent un lien étroit entre le métabolisme glucidique et lipidique et niveau d'expression de MFN2, aussi bien sur cellules en culture (Bach et al. 2003; Pich et al. 2005) qu'*in vivo* (Dietrich, Liu, et Horvath 2013; Nasrallah et Horvath 2014; Wikstrom et al. 2014). Cependant, le lien avec une altération de la phosphorylation oxydative et surtout, le lien direct entre l'état de fusion du réseau mitochondrial et le métabolisme énergétique est beaucoup moins évident.

b) OPA1

La protéine OPA1 pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme énergétique puisque des études ont montré que la déplétion de OPA1 dans des cellules en culture et dans les tissus de souris, entraîne une diminution du contenu de l'ADNmt, une baisse du potentiel de membrane et une diminution du fonctionnement de la chaîne respiratoire (Chen et al. 2010; Chen, Chomyn, et Chan 2005; Rubén Quintana-

Cabrera et al. 2018). De plus l'inhibition de l'expression d'OPA1 par siRNA dans des cellules HeLa conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial, une déstructuration complète des crêtes mitochondriales et une baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon et al. 2003). Très récemment, l'analyse métabolique sur des cellules embryonnaires de souris KO OPA1 de Dai et al. (2022) suggère que les cellules déficientes OPA1 effectuent une reprogrammation métabolique du métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique et de la glutamine qui pourrait s'expliquer par la déstructuration des crêtes (Dai et al. 2022).

Dans des modèles de souris *in vivo*, il a été observé que la mutation $Opa1^{delTTAG}$ humaine entraîne un défaut de la cytochrome oxydase dans la rétine, le nerf optique et le muscle glycolytique, cependant, les muscles oxydatifs et le cœur ne sont pas affectés (Sarzi et al. 2012). Des études complémentaires montrent que le défaut de l'activité cytochrome oxydase serait due à une déstabilisation prématurée des supercomplexes de la chaîne respiratoire lié au vieillissement des souris (Acín-Pérez et al. 2008; Frenzel et al. 2010; Gómez et al. 2009). Dans ce modèle $Opa1^{delTTAG}$, il a également été rapporté une altération concomitante de la morphologie mitochondriale, ainsi qu'une mitophagie accrue. Alavi et al. (2007) ont montré que la mutation de l'exon 10 (mutation c.1065+5G→A) dans le domaine GTPase, conduit à une diminution de l'expression de 50% de la protéine OPA1 et une absence de la forme courte d'OPA1 (Alavi et al. 2007). L'analyse métabolique de ces souris suggère une altération du métabolisme, notamment de la sécrétion d'insuline, chez les souris âgées. Ces souris ne présenteraient cependant pas de déficit en COX (Alavi et al. 2009). Enfin, dans des modèles de souris $YME1L^{-/-}$, Wai et al. (2015) ont observé que la perte de la protéine YME1L dans les cardiomyocytes abolissait la formation de la forme d de OPA1-S et conduisait à l'accumulation des formes c et e de OPA1-S générée par OMA1, associées à une altération de la morphologie mitochondriale. Cependant, cette altération de la morphologie du réseau ne semble pas induire de défaut de la respiration mitochondriale, ni de l'assemblage des complexes ou des Supercomplexes de la chaîne respiratoire (Wai et al. 2015).

Chez l'homme, les mutations pathogènes du gène OPA1 sont responsables du développement d'une atrophie Optique autosomique Dominante (AOAD), une maladie dégénérative spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine entraînant la perte des axones qui forment le nerf optique. Cela s'accompagne également par une perte progressive de la vision centrale et une diminution de l'acuité visuelle (Chan 2020). Une atteinte plus large, multiviscérale (AOD+) est parfois retrouvée, notamment chez l'enfant (Yu-Wai-Man et al., 2010). Cependant, dans ces pathologies seules certaines formes mutantes d'OPA1 (mutation p.R445H, p.V903fsX905 et p.R733X) induisent une fragmentation du réseau mitochondrial (Cretin et al. 2021; Kane et al. 2017; Aurélien Olichon et al. 2007). L'analyse des constantes bioénergétiques dans des fibroblastes de patients atteints d'atrophie optique autosomique dominante, a montré un défaut de couplage de la phosphorylation oxydative (Chevrollier et al. 2008a), c'est-à-dire un défaut de la capacité à synthétiser de l'ATP par rapport à la quantité d'oxygène consommée (ATP/O). Cependant, tous les patients présentaient un défaut de ce couplage, plus ou moins prononcé, bien que seuls trois d'entre eux (mutations p.R445H, p.V903fsX905 et p.R733X) démontraient un réseau fragmenté. De plus, une diminution de l'activité du complexe IV était observée chez certains patients, sans lien évident avec l'état du réseau mitochondrial (Chevrollier et al. 2008a). Cette diminution de l'activité du complexe IV, qui pourrait être liée à un défaut de maintenance de l'ADNmt, a également été retrouvée dans les fibres musculaires de patients atteints d'AOD et AOD+, mais là encore,

seulement chez certains individus, sans qu'une corrélation évidente ne soit retrouvée avec le type de mutation ou le phénotype du patient (Yu-Wai-Man et al., 2010, 2011).

Là encore, les données de la littérature sur l'effet d'une altération de l'expression et de la fonction d'OPA1 sur le métabolisme énergétique restent donc relativement contradictoires. Ainsi, le lien entre fragmentation du réseau et altération bioénergétique n'est pas clair, puisque qu'une augmentation de la fragmentation peut être observée sans altération évidente de l'activité de l'ETC et inversement, des défauts d'activité retrouvés sans altération évidente de l'état du réseau.

4.2. Le métabolisme influence-t-il les processus de fusion/fission ?

Comme nous venons de l'évoquer, bien qu'un lien entre les processus de fusion/fission et le métabolisme mitochondrial soit fréquemment évoqué, ce lien est loin d'être évident. Cependant, à l'inverse, le métabolisme mitochondrial influence-t-il les processus de fusion/fission ?

4.2.1. Le métabolisme cellulaire module la fusion/fission

Chez la levure, les analyses de microscopie électronique ont révélé des liens entre le type de métabolisme énergétique, la structure du réseau mitochondrial et sa croissance. En effet, l'étude de Yotsuyanagi (Yotsuyanagi 1962) montre que lorsque les levures sont cultivées en milieu riche en glucose, les cellules ont une respiration faible (fermentation) et possèdent peu de mitochondries. A l'inverse quand elles sont cultivées en milieu pauvre en glucose, ces cellules augmentent leur capacité respiratoire et les mitochondries forment un réseau tubulaire et ramifié. D'autres études, chez la levure, confirment ces résultats : des conditions de culture forçant le métabolisme oxydatif stimule la fusion des mitochondries conduisant à l'élongation des mitochondries ; (Hoppins et al. 2011; Meeusen, McCaffery, et Nunnari 2004).

Chez le mammifère, de manière générale, il a été montré que les cellules présentant un réseau mitochondrial fragmenté étaient plus glycolytiques (Egner, Jakobs, et Hell 2002), tandis que celles présentant un réseau mitochondrial plus connecté étaient plus oxydatives (Sauvanet et al. 2010).

De la même façon, l'équilibre dynamique entre la fusion et la fission est important pour la reprogrammation métabolique des cellules spécialisées. Il a été observé que les cellules T proliférantes et les cellules cancéreuses passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique, même en présence d'oxygène (« effet Warburg ») afin de soutenir leur phase proliférative. Par exemple, les lymphocytes T effecteurs en prolifération sont hautement glycolytiques et ont un réseau mitochondrial fragmenté, en revanche les lymphocytes T mémoires ont un métabolisme oxydatif et leurs mitochondries présentent un réseau plus

Drogue	Cible	Lignée Cellulaire	Morphologie Du Réseau	Réf.
Déoxyglucose	Glycolyse	HeLa	Fragmentée	(Legros et al. 2002)
		143B	Fragmentée	(Malka et al. 2005)
		Fibroblastes	Filamenteuse	(Guillery et al. 2008)

Tableau 7 : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec du déoxyglucose (Sauvanet et al. 2010).

allongé (Buck et al. 2016). L'étude de Prieto et al. (2016) montre qu'au cours du processus de reprogrammation en cellules souches pluripotentes induites (iPS), les cellules somatiques passent du métabolisme oxydatif au métabolisme glycolytique. Dans ces cellules, DRP1 serait phosphorylée, entraînant la fragmentation des mitochondries. Cette phosphorylation serait dépendante des kinases ERK-1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2) (Prieto et al. 2016).

Cependant, à l'inverse, il a été constaté dans certaines cellules immortalisées en culture comme les HeLa (Legros et al. 2002) ou les 143B (Malka et al. 2005)(tableau 7), qu'une stimulation du métabolisme oxydatif, par déprivation en glucose ou remplacement de celui-ci par du galactose, conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial. L'inhibition directe de la glycolyse par le déoxyglucose induit également une fragmentation du réseau mitochondrial. Cependant, cela n'a pas été constaté dans des cellules primaires (Guillery et al. 2008), suggérant que la régulation de la morphologie mitochondriale par son activité métabolique est un phénomène complexe et/ou dépendant du type métabolique cellulaire.

Les données de la littérature suggèrent donc que le métabolisme cellulaire influence la fusion et la fission du réseau mitochondrial, cependant, les mécanismes mis en jeu semblent complexes, puisque cette influence semble surtout dépendre du type cellulaire. Si de nombreuses études ont fait le lien entre le métabolisme cellulaire et les voies de signalisations cytosoliques permettant le recrutement de DRP1 (Rambold et al. 2011; Wang et al. 2012), peu de ces études se sont intéressées aux mécanismes internes à la mitochondrie conduisant à la fission. Y-a-t'il un lien entre le fonctionnement de la phosphorylation oxydative et l'état du réseau mitochondrial ?

4.2.2. Le fonctionnement mitochondrial module la fusion/fission ?

Chez les mammifères, la plupart des études sur la dynamique et la morphologie des mitochondries sont réalisées sur des cellules en cultures traitées par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (tableau 8). L'utilisation de ces inhibiteurs est généralement regroupée sous le terme de « stress mitochondrial », bien que ceux-ci aient des cibles et des effets différents sur la phosphorylation oxydative. Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire inhibent le transport des électrons et le pompage des protons associés et, de ce fait, la synthèse d'ATP. La plupart des inhibiteurs des complexes de l'ETC, en ralentissant le flux de transfert des e⁻, induisent également une augmentation majeure de la production de ROS. Les inhibiteurs de l'ATP synthase eux, bloquent le retour des protons et la synthèse d'ATP, provoquant ainsi une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial, ce qui ralentit au final l'activité de la chaîne respiratoire. L'utilisation de découplant de la phosphorylation oxydative induit une baisse drastique du potentiel de membrane mitochondrial, stimulant en retour l'activité de la chaîne respiratoire à son maximum mais inhibant la synthèse d'ATP. Ainsi, ces inhibiteurs modulent différemment le $\Delta\Psi_m$, l'activité de la chaîne respiratoire, la production d'ATP, ainsi que la production de ROS. Ces différents paramètres sont cependant fortement intriqués, il est donc difficile de distinguer les effets exacts des inhibiteurs d'OXPHOS sur les constantes énergétiques mitochondriales.

Drogue	Cible	Lignée Cellulaire	Morphologie Du Réseau	Réf.
CCCP	$\Delta\Psi_m$	143B	En forme d'anneau	(Minamikawa et al. 1999)
		CV1-4A	En forme d'anneau	(De Vos et al. 2005)
		MEFs	En forme d'anneau	(De Vos et al. 2005)
		HeLa	Fragmentée	(Legros et al. 2002; Malka et al. 2005)
		143B	Fragmentée	(Malka et al. 2005)
FCCP	$\Delta\Psi_m$	Fibroblastes	Fragmentée	(Guillery et al. 2008)
		HeLa	Fragmentée	(Pletjushkina et al. 2006)
Valinomycine	$\Delta\Psi_m$	143B Et HeLa	Fragmentées, gonflées et groupées	(Malka et al. 2005)

Tableau 8 : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec divers inhibiteurs (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)).

a) La variation du $\Delta\Psi_m$

Comme nous avons vu précédemment, le potentiel de membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ est généré par les 3 pompes à protons que sont les complexes I, III et IV. Il est donc un composant essentiel du processus de phosphorylation oxydative, et plus largement de l'homéostasie mitochondriale en régulant l'activité de protéases mitochondriales ou encore l'initiation de la mitophagie. L'utilisation de découplants comme le CCCP ou le FCCP, effondrant le potentiel de membrane mitochondrial, est largement utilisé pour l'étude de la dynamique mitochondriale. Ceux-ci semblent effectivement conduire systématiquement à la fragmentation du réseau mitochondrial, que ce soit dans les cellules immortalisées que dans les cellules primaires de peau (De Vos et al. 2005; Guillery et al. 2008; Legros et al. 2002; Malka et al. 2005) (Tableau 8).

Il a été montré que la variation du métabolisme énergétique stimule les protéases YME1L et OMA1 afin de réguler l'activité de fusion de OPA1. Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe 3.3.6.a) YME1L est dépendant de l'ATP tandis que OMA1 serait plutôt dépendante du potentiel de membrane mitochondrial. Le clivage de la protéine OPA1 par YME1L stimule ainsi la fusion des membranes internes, en revanche, lorsque le potentiel de membrane se dissipe, la protéase OMA1 est suractivé conduisant au clivage massif de la protéine OPA1 et à la fragmentation du réseau mitochondrial (Anand et al. 2014; Ehses et al. 2009; Head et al. 2009; Ishihara et al. 2006a). Ces différentes études suggèrent que les protéases YME1L et OMA1 servent de senseur important reliant les conditions métaboliques au processus de fusion de la membrane interne.

Une diminution du potentiel de membrane est théoriquement attendue suite à une inhibition de l'activité de la chaîne respiratoire du fait de son activité de pompage des protons. Cependant, les données de la littérature sont plus contradictoires en ce qui concerne cette inhibition de la chaîne respiratoire.

b) Variation de l'activité de la chaîne respiratoire

Modulation de l'activité de la chaîne respiratoire induite par inhibitions pharmacologiques

De nombreuses études montrent que les inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire, en particulier les complexes I et III, provoquent une fragmentation importante du réseau mitochondrial dans les lignées cellulaires immortelles ou immortalisées (tableau 8). L'étude de Van der Stel (van der Stel et al. 2022) sur des cellules HepG2 en culture confirme également que la morphologie des mitochondries est altérée suite à une inhibition des différents complexes OXPHOS, qui induisent dans ces cellules une chute du potentiel de membrane.

Au niveau mécanistique, il a été constaté que l'inhibition des complexes I par la roténone ou III par l'antimycine sur des cellules d'osteosarcome active le senseur énergétique AMPK, laquelle phosphoryle ensuite des résidus sérines clés sur MFF, entraînant le recrutement de DRP1 et la fission mitochondriale. Ce mécanisme

Drogue	Cible	Lignée cellulaire	Morphologie du réseau	Réf.
Roténone	Complexe I	CV1-4A	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		MEFs	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		Neurones Corticaux	Fragmentée	(Barsoum et al. 2006)
		MRC5	Circulaire, En Forme De Donuts	(Benard et al. 2007)
		Fibroblastes	Fragmentée	
		Fibroblastes	Élongation	(Liot et al. 2009)
Piericidine A	Complexe I	Fibroblastes	Intermédiaire	(Guillery et al. 2008)
3-Nitropropionic Acid	Complexe II	Neurones Corticaux	Fragmentée	(Liot et al. 2009)
Antimycine A	Complexe III	CV1-4A	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		MEFs	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		Fibroblastes	Filaments Gonflés Et Nodaux	(Pham et al. 2004)
		Fibroblastes	Intermédiaire	(Guillery et al. 2008)
Myxothiazole	Complexe III	HeLa	Fragmentée	(Legros et al. 2002)
		CV1-4A	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
Cyanide	Complexe IV	Fibroblastes	Intermédiaire	(Guillery et al. 2008)
Oligomycine	ATP Synthase	HeLa	Fragmentée	(Legros et al. 2002)
		CV1-4A	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		MEFs	Fragmentée	(De Vos et al. 2005)
		Fibroblastes	Intermédiaire	(Guillery et al. 2008)
		CV-1	Fragmentée	(Pletjushkina et al. 2006)
Aurovertine B	ATP Synthase	CV-1	Filamenteuse	(Pletjushkina et al. 2006)

Tableau 9 : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec divers inhibiteurs (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)).

pourrait favoriser l'élimination des mitochondries endommagées par autophagie ou induire l'apoptose dans les cellules (Toyama et al. 2016).

Néanmoins, dans les cellules primaires, les résultats des différentes études sont moins évidents. En effet, sur fibroblastes de peau, une étude seulement observerait une fragmentation du réseau mitochondrial suite à l'inhibition du complexe I, résultat retrouvé sur des cellules neuronales primaires, tandis qu'une autre étude observerait une élongation du réseau mitochondrial suite à cette inhibition (Koopman et al. 2005). De plus, plusieurs études ont constaté une fragmentation intermédiaire ou modérée suite à l'inhibition des complexe III, IV et de l'ATP synthase (Guillery et al. 2008; Liot et al. 2009; Pham et al. 2004) (tableau 9).

Modulation de l'activité de la chaîne respiratoire induite par des altérations d'origine génétiques

Chez *S. cerevisiae*, l'organisation et l'ultrastructure des mitochondries ne semblent pas corrélées avec la capacité respiratoire, puisque la microscopie sur des mutants dépourvus de composants de la chaîne respiratoire ou des cellules traitées avec des inhibiteurs d'OXPPOS montre que le réseau mitochondrial est semblable au type sauvage (Church et Poyton 1998; Jakobs, Schauss, et Hell 2003; Xu, Thorsness, et Thorsness 2005).

Les premiers modèles cellulaires présentant des altérations génétiques de l'OXPPOS ont été utilisés en 1994 par l'équipe de Hayashi (Hayashi et al. 1994). Ceux-ci ont fusionné des cellules 143B- ρ^0 dépourvu d'ADN mitochondrial avec des cellules énucléées de patients, formant ainsi des hybrides cytoplasmique ou cybrides portant l'ADNmt des patients mais le fond nucléaire 143B. Les cybrides contiennent une quantité variable d'ADNmt mutant et sauvage. Leur morphologie mitochondriale est similaire aux cellules ρ^0 , avec un réseau mitochondrial fragmenté ou formant des structures gonflées (tableau 10).

Chez le mammifère, afin de déterminer si une chaîne respiratoire fonctionnelle était nécessaire à la fusion mitochondriale, Legros et al. (Legros et al., 2002) ont également généré des cellules 143B déplétées en ADNmt (143B- ρ^0) exprimant de manière stable la mtGFP ou la mtRFP. Si les cellules 143B- ρ^0 présentaient une plus grande proportion de mitochondries fragmentées que les cellules 143B contrôles (tableau 10), leurs résultats démontrent que la fusion mitochondriale dans les cellules 143B- ρ^0 ne différait ni en termes de cinétique ni d'efficacité par rapport aux contrôles, et donc qu'une chaîne respiratoire fonctionnelle n'est pas nécessaire pour la fusion mitochondriale.

Les maladies mitochondriales regroupent une grande variété de pathologies métaboliques dont le dénominateur commun est un trouble de la production énergétique, lié le plus souvent à une dysfonction de la chaîne respiratoire. Ces maladies sont vraisemblablement les plus fréquentes des maladies héréditaires du métabolisme, avec une incidence estimée à 1/5000 naissances. Elles sont la conséquence de mutations ou délétions dans des gènes codant des protéines mitochondriales, codés soit par l'ADN nucléaire, mais aussi l'ADN

Défaut	Génome muté	Lignée Cellulaire	Morphologie Du Réseau	Réf.
p ⁰	ADNmt	HeLa p ⁰	Gonflées, ressemblant à des bulles	(Hayashi et al. 1994)
		143B p ⁰	Fragmentée	(Legros et al. 2002, 2004)
MELAS	ADNmt/ARNt	HeLa cybride	Gonflées, ressemblant à des bulles	(Hayashi et al. 1994)
		Fibroblastes	Non altérée	(Huckriede et al. 1995)
Cardiomyopathie	ADNmt/ARNt	HeLa cybride	Gonflées, ressemblant à des bulles	(Hayashi et al. 1994)
MIDD	ADNmt/ARNt	143B cybride	Moins allongée, plus arrondie	(van den Ouweland et al. 1999)
MERFF	ADNmt/ARNt	143B cybride	Fragmentée	(Hanson et al. 2002)
		Fibroblastes	Filamenteuse	
NARP	ADNmt/ATP synthase	143B cybride	Nombreuses organelles isolées	(Szczepanowska, Zabłocki, et Duszyński 2004)
HSP60	ADN nucléaire	Fibroblastes	Aberration morphologique	(Huckriede et al. 1995)
PDH	ADN nucléaire	Fibroblastes	Filamenteuse	(Hanson et al. 2002)
Complexe I	ADN nucléaire	Fibroblastes	Fragmentée, augmentation du nombre, des ramifications	(Koopman et al. 2005)
			Raccourcie/fragmentée	(Benard et al. 2007)
			Filamenteuse	(Hanson et al. 2002)
Complexe II	ADN nucléaire	Fibroblastes	Filamenteuse	(Guillery et al. 2008)
Complexe III	ADN nucléaire	Fibroblastes	Filamenteuse	(Guillery et al. 2008)
Complexe IV	ADN nucléaire	Fibroblastes	Filamenteuse	(Guillery et al. 2008)
ATP synthase	ADN nucléaire	Fibroblastes	Filamenteuse	(Guillery et al. 2008)

Tableau 10 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des cellules présentant des défauts génétiques associés à des déficits mitochondriaux (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)). *Hsp60* : activités réduites de la protéine de choc thermique 60 ; *MELAS* : myopathie, encéphalopathie, acidose lactique et accident vasculaire cérébral mitochondriaux ; *MERFF* : épilepsie myoclonique et fibres ragged-red ; *MIDD* : diabète et surdité d'origine maternelle ; *NARP* : neuropathie, ataxie et rétinite pigmentaire ; *PDH* : déficit en pyruvate déshydrogénase.

mitochondrial. Les modèles cellulaires issus de patients atteints de pathologie mitochondriale constituent donc un modèle d'étude de choix pour la bioénergétique et la dynamique mitochondriale.

De nombreuses études ont ainsi été réalisées sur fibroblastes de peau de patients atteints de pathologie mitochondriale. Contrairement aux lignées cellulaires, chaque fibroblaste de peau est issu d'un patient présentant un défaut génétique particulier. Plusieurs études ont constaté que les fibroblastes avec des déficits des complexes OXPHOS ont un réseau mitochondrial filamenteux ou n'ont pas d'anomalie significative du réseau mitochondrial (Guillery et al. 2008; Hanson et al. 2002; Huckriede et al. 1995) ; à l'inverse deux études ont constaté qu'un défaut du complexe I conduit à une fragmentation, un raccourcissement, un gonflement ou une altération de ramification des mitochondries (Benard et al. 2007; Koopman et al. 2005) (Tableau 10). Dans ces deux derniers cas, les cellules étaient maintenues en milieu relativement pauvre, soit un milieu HEPES-Tris dépourvu en glucose, soit un milieu galactose. Le fait que la majorité des cellules de patients déficitaires en un ou des complexes de la chaîne respiratoire présentent une morphologie normale, contrairement aux lignées cellulaires traitées par des inhibiteurs OXPHOS, pose question. Dans le cas de ces altérations génétiques des complexes, l'inhibition de l'activité enzymatique est chronique, aussi l'absence de corrélation entre un déficit OXPHOS et la morphologie mitochondriale dans les fibroblastes de patients pourraient suggérer la mise en place d'une adaptation des mitochondries et du métabolisme cellulaire. Ainsi, lors de l'inhibition de la glycolyse par le déoxyglucose dans des fibroblastes de patients présentant des déficits OXPHOS, le réseau mitochondrial se trouve fragmenté (Guillery et al. 2008).

Au vu de l'ensemble de ces données et de la diversité des observations, tant sur modèle d'inhibition pharmacologique que sur modèle d'inhibition chronique d'origine génétique, des études complémentaires sont nécessaires afin d'approfondir les liens possibles entre activités de la chaîne respiratoire et induction de la fission mitochondriale et/ou les mécanismes de résistance à cette fission mis en place.

c) La variation de la production de ROS

Une altération de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire conduit à une production plus ou moins importante de ROS et serait impliqué dans le stress oxydatif. Qi et al, (2011) ont montré que durant un stress oxydatif, l'activation de la protéine kinase C δ (PKC δ) par les ROS conduit à la phosphorylation de la Ser616 de DRP1 et à la fragmentation du réseau mitochondrial dans un modèle de neurone en culture. Cette phosphorylation par PKC δ est délétère, en effet, une étude a démontré que cette fragmentation anormale du réseau mitochondrial conduit à des lésions cérébrales induites par l'hypertension (Qi et al. 2011). D'autres mécanismes pro-oxydants peuvent réguler la fusion mitochondriale. En effet, l'étude de Shutt (Shutt et al. 2012) sur HeLa montre qu'un niveau élevé en glutathion oxydé favorise la dimérisation des MFNs et la fusion des membranes externes. Ainsi la régulation de la production de ROS semblerait liée aux processus de fusion/fission. Cependant, l'inhibition des différents complexes de la chaîne respiratoire favorise une surproduction de ROS (Cf paragraphe 2.3.4). Pour autant, l'étude de Guillery et al. (2008) sur des fibroblastes

de peau humain, n'a pas constaté de fragmentation suite à l'inhibition d'OXPPOS. Néanmoins, le lien entre production de ROS par la chaîne respiratoire et activation de la fission reste encore peu clair.

d) La variation d'ATP et l'ATP synthase

Il a également été suggéré que la fusion pouvait être contrôlée par la concentration en GTP. En présence d'ATP, la nucléotide diphosphate kinase : NM23-H4, localisée dans la matrice mitochondriale permet de générer du GTP à partir de GDP. Cette molécule favorise le chargement en GTP sur la protéine OPA1, en outre, sa déplétion entraîne des défauts de fusion (Boissan et al. 2014). Ces résultats suggèrent que le niveau d'ATP cellulaire est lié à la fusion via le chargement en GTP de la protéine OPA1.

Des études suggèrent un rôle important de l'ATP synthase dans le maintien de la morphologie mitochondriale. Chez la levure, la contribution de l'ATP synthase à la morphologie mitochondriale se produit à deux niveaux : son activité et son oligomérisation. La délétion de certaine sous-unité permettant l'oligomérisation de l'ATP synthase de levure n'affecte pas son activité, en revanche, les mitochondries présentent une altération de leur ultrastructure avec un réseau mitochondrial partiellement fragmenté (Velours et al. 2009). A contrario, l'analyse de cellules de levure dépourvues du gène mitochondrial codant pour une sous-unité clé du canal protonique F₀ : *ATP6* montre que l'ATP synthase est toujours capable de s'assembler mais présente une activité réduite. Dans ces cellules, la morphologie des mitochondries semble altérée avec des mitochondries en amas avec les membranes internes et les crêtes mitochondriales déstructurées (Rak et al. 2007). Ainsi, chez la levure, contrairement aux déplétions de la chaîne respiratoire, les mutations de la F₁F₀-ATPase affectent fortement la structure et la morphologie des mitochondries.

Chez l'homme, les données sur l'effet d'une altération de l'activité et/ou de la structure de l'ATP synthase sont plus disparates. L'inhibition de l'activité de cette enzyme par l'oligomycine conduit à une fragmentation du réseau mitochondrial sur lignées cellulaires tumorales et MEFs (De Vos et al. 2005; Legros et al. 2002; Pletjushkina et al. 2006), ou à un état du réseau plus intermédiaire sur fibroblastes (Guillery et al. 2008). Sur cybrides 143B exprimant la mutation c.8993C>G dans la sous-unité MT-ATP6, Szczepanowska, Zabłocki, et Duszyński (2004) ont également observé la présence de nombreuses mitochondries isolées et les mutations des sous-unités 8 (MT-ATP8) (Szczepanowska et al. 2004) et a sont souvent corrélées à des formes pathologiques des crêtes mitochondriales, comme par exemple dans le syndrome de Leigh (Kucharczyk et al., 2009).

Ainsi, l'ATP synthase mitochondriale semble impliquée dans la structuration du réseau mitochondrial. Cependant les liens exacts entre ces différents paramètres restent peu compris, en particulier s'il s'agit d'un lien entre l'activité de l'ATP synthase et la dynamique mitochondriale, soit une signalisation possible par les niveaux d'ATP, ou un lien entre structure/superstructure de l'ATP synthase et morphologie mitochondriale.

Les différentes études disponibles soulignent donc que les liens entre la dynamique et la bioénergétique mitochondriale sont extrêmement complexes. Chez les mammifères, la fragmentation mitochondriale n'est pas systématiquement associée à un déficit d'OXPPOS, et inversement, une altération de l'activité de la chaîne respiratoire n'est pas systématiquement corrélée à une fragmentation du réseau mitochondrial, comme le montre les fibroblastes de patient présentant des défauts d'OXPPOS. Ces données montrent que l'inhibition ou la stimulation de la respiration mitochondriale provoquent des réponses mitochondriales différentes selon 1) le type cellulaire, 2) le type d'altérations (déplétion du potentiel de membrane, inhibition des complexes de la chaîne ou de la synthèse d'ATP, 3) les effets aigües ou chroniques. De plus, comme les effets précis de ces inhibiteurs de l'OXPPOS sur la fusion/fission ne sont pas bien compris, il est difficile de déterminer si la fragmentation du réseau mitochondrial résulte d'une augmentation de la fission, d'une diminution de la fusion ou des deux. D'autres travaux sur d'autres systèmes, tissus et organismes sont nécessaires afin de comprendre le(s) rôle(s) de la bioénergétique mitochondriale et cellulaire sur la morphologie et de la dynamique des mitochondries.

Objectif de la thèse

Au sein de l'équipe de recherche MitoLab à Angers, l'activité de recherche repose sur le travail d'ingénieurs et d'enseignants-chercheurs titulaires de postes au sein des services de neurologie, de pédiatrie, des services de biochimie et génétique du CHU d'Angers et de personnels rattachés à l'université d'Angers. L'exploration de cette relation structure-fonction mitochondriale est menée depuis une dizaine d'année. Ainsi, les conséquences de défauts génétiques des protéines de la fusion/fission, OPA1, DRP1, MFN2, sur la structure et l'organisation des mitochondries mais également l'activité bioénergétique mitochondriale sont étudiées au laboratoire depuis de nombreuses années. De nombreuses études, dont celles du laboratoire ont ainsi permis de montrer que ces défauts génétiques des protéines de la fusion/fission sont à l'origine de pathologies neurodégénératives comme l'atrophie optique autosomique dominante (Cf paragraphe 4.1.2.b)), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Cf paragraphe 4.1.2.a)) ou encore l'EMPF1 (4.1.1.a)). Dans l'AOAD et la CMT, il a également été observé une altération plus ou moins importante du métabolisme énergétique, néanmoins, seules certaines formes mutantes d'OPA1 (mutation p.R445H, p.V903fsX905 et p.R733X) induisent une fragmentation du réseau mitochondrial (Chevrollier et al. 2008b; Cretin et al. 2021; Kane et al. 2017; Aurélien Olichon et al. 2007). En outre, à notre connaissance, il n'y a pas de données mettant en relation les variants pathogènes de DRP1/DNM1L et le métabolisme énergétique.

La première partie de ce travail s'inscrit dans le cadre de ces recherches sur les acteurs de la dynamique mitochondriale à l'interface entre la clinique et la recherche des mécanismes physiopathologiques et. Ce travail a porté sur la caractérisation du variant (Thr59Asn) du gène *DMN1L* chez une patiente atteinte d'encéphalopathie sévère. Cet acteur principal de la fission mitochondriale a été mis en lien avec le développement d'une EMPF1. L'objectif de cette étude était de montrer le caractère pathogène de ce variant. Pour ce faire, nous avons décrit en détail les anomalies mitochondriales et peroxysomales sur fibroblastes de cette patiente.

Les études menées au sein du laboratoire portaient essentiellement sur les conséquences des défauts de la fusion/fission sur la bioénergétique mitochondriale. En revanche, l'inverse, c'est-à-dire : la conséquence d'une altération de la bioénergétique mitochondriale sur la structure tubulaire du réseau mitochondrial était peu étudiée. Les voies de signalisations cytosoliques permettant le remodelage des membranes ont été bien décrites, notamment les processus de fission DRP1-dépendant. Cependant, les mécanismes et la signalisation internes à la mitochondrie conduisant au remodelage des membranes restent eux peu connus. Les différentes observations de la littérature sur ce point sont contradictoires, complexes et faisant encore débat. Il est donc nécessaire d'approfondir ce lien entre métabolisme énergétique et remodelage du réseau mitochondrial.

La deuxième partie de mon projet de recherche s'intègre dans ce travail, avec une focalisation sur le mode d'induction de la fission des mitochondries. Pour cela, j'ai entrepris de caractériser finement ce que l'on nomme « stress mitochondrial », c'est-à-dire la modulation des constantes bioénergétiques mitochondriales tel que la synthèse d'ATP, le potentiel de membrane mitochondrial et la production de ROS. Pour ce faire, j'ai

inhibé chimiquement la chaîne respiratoire et/ou l'ATP synthase à l'aide d'inhibiteurs tels que la Roténone (inhibiteur CI), l'Antimycine (inhibiteur CIII) et l'Oligomycine (inhibiteur ATP synthase). Puis, j'ai étudié la modulation de morphologie du réseau mitochondrial au cours du temps suite à une variation de ces constantes. Cette caractérisation m'a permis de découvrir un mécanisme de résistance à la fission. Suite à ce constat, j'ai étudié le mécanisme de résistance à la fission mitochondriale à l'aide de modèle pharmacologique, ainsi que génétiques.

Résultats

1. Progression de trente ans d'une encéphalopathie EMPF1 due à une fission mitochondriale et peroxysomale défectueuse causée par un nouveau variant hétérozygote de novo DNM1L.

1.1. Introduction

La protéine humaine dynamine-1 (DNM1L) aussi couramment appelée la protéine 1 liée à la dynamine (DRP1), dont le gène est situé sur le chromosome 12 en position p11.21, appartient à la superfamille très conservée des dynamines. Sa structure caractéristique consiste en un domaine GTPase, un domaine médian et un domaine effecteur de la GTPase (GED). Cette protéine joue un rôle majeur dans la fission mitochondriale et dans la fission des peroxysomes. Recrutée au niveau de la membrane externe mitochondriale et à la surface des peroxysomes par des protéines réceptrices, DNM1L s'assemble en de grandes structures multimériques en forme d'anneau permettant de resserrer les membranes lors de l'hydrolyse du GTP ce qui conduit à une constriction permettant le clivage des organites. L'équilibre entre la fusion et la fission également nommé « dynamique mitochondriale » est essentiel pour l'intégrité mitochondriale et cellulaire. En 2007, le centre d'étude des maladies génétiques d'Amsterdam au Pays-Bas, Waterham et al. a publié la première étude clinique associant une mutation du gène *DNM1L* et une pathologie humaine. Cette fillette nouveau-née présentait une microcéphalie, un développement cérébral anormal, une atrophie et une hypoplasie optiques, une acidémie lactique persistante et une concentration plasmatique légèrement élevée d'acides gras à très longue chaîne. Ils ont identifié une mutation hétérozygote unique, c.1184C>A qui entraîne la substitution de l'alanine par l'acide aspartique en position 395 soit dans le domaine dit médian de DRP1. Depuis, de nombreuses mutations de DNM1L ont été décrites et deux phénotypes se distinguent : les variants pathogènes de DNM1L peuvent conduire soit à une encéphalopathie autosomique dominante ou récessive, complexe et sévère, due à une fission mitochondriale et peroxysomale défectueuse 1 (EMPF1, OMIM 614388), soit à une atrophie optique 5 autosomique dominante isolée (OPA5, OMIM 610708).

A ce jour, 38 patients EMPF1 ont été signalés et sont caractérisés par une grande variabilité phénotypique allant d'un décès précoce à une encéphalopathie lentement progressive avec hypotonie et retard de développement. L'étude des fibroblastes de patient montre généralement un réseau mitochondrial hyper-fusionné, avec également dans certains cas une altération de la morphologie des peroxysomes.

Nous avons été contactés par une équipe clinique de l'Institut de Pathologie et de Génétique ASBL Gosselies en Belgique pour apporter une expertise mitochondriale à un cas clinique rare. Nous avons travaillé avec le Pr I. MAYSTADT, MD, PhD, sur le cas d'une patiente âgée de 32 ans, atteinte d'EMPF1, chez laquelle un variant hétérozygote *de novo* dans le gène DNM1L avait été retrouvé. L'objectif était d'apporter des arguments fonctionnels afin de confirmer le caractère pathogène du variant (Thr59Asn) grâce à une description détaillée des anomalies mitochondriales et peroxymales d'échantillons fibroblastiques et tissulaires. La rareté et la spécificité du cas clinique, la position de la mutation, le fait que cette mutation n'ai jamais été décrite chez un patient alors même qu'elle avait été créée dans des modèles cellulaires construits pour identifier le rôle de DRP1 dès 2003 (Li et al., 2003) et les résultats obtenus sur son expression dans les fibroblastes du patient nous ont conduit à rédiger un case-report dans une revue clinico-biologique : *Frontiers in Neurology* section Neuromuscular Disorders and Peripheral Neuropathies.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Giovanni Meola,
University of Milan, ItalyREVIEWED BY
Andrea Legati,
IRCCS Carlo Besta Neurological
Institute Foundation, Italy
Alessia Nasca,
IRCCS Carlo Besta Neurological
Institute Foundation, Italy
Daniele Ghezzi,
University of Milan, Italy*CORRESPONDENCE
Arnaud Chevrollier
arnaud chevrollier@univ-angers.fr
Isabelle Maystadt
isabelle.maystadt@ipg.be

†These authors share last authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Neuromuscular Disorders and
Peripheral Neuropathies,
a section of the journal
Frontiers in NeurologyRECEIVED 06 May 2022
ACCEPTED 01 September 2022
PUBLISHED 23 September 2022CITATION
Lhuissier C, Wagner BE, Vincent A,
Garraux G, Hougrand O, Van Coster R,
Benoit V, Karadurmus D, Lenaers G,
Gueguen N, Chevrollier A and
Maystadt I (2022) Case report:
Thirty-year progression of an EMPF1
encephalopathy due to defective
mitochondrial and peroxisomal fission
caused by a novel *de novo*
heterozygous *DNM1L* variant.
Front. Neurol. 13:937885.
doi: 10.3389/fneur.2022.937885COPYRIGHT
© 2022 Lhuissier, Wagner, Vincent,
Garraux, Hougrand, Van Coster,
Benoit, Karadurmus, Lenaers,
Gueguen, Chevrollier and Maystadt.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Case report: Thirty-year progression of an EMPF1 encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission caused by a novel *de novo* heterozygous *DNM1L* variant

Charlène Lhuissier¹, Bart E. Wagner², Amy Vincent³,
Gaëtan Garraux^{4,5}, Olivier Hougrand⁶, Rudy Van Coster⁷,
Valerie Benoit⁸, Deniz Karadurmus⁸, Guy Lenaers^{1,9},
Naïg Gueguen^{1,10}, Arnaud Chevrollier^{1,*†} and
Isabelle Maystadt^{8,11,*†}¹MitoLab Team, UMR CNRS 6015-INSMER U1083, Unité MitoVasc, SFR ICAT, Université d'Angers, Angers, France, ²Department of Histopathology, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, United Kingdom, ³Wellcome Centre for Mitochondrial Research, Faculty of Medical Sciences, Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, ⁴GIGA-CRC in vivo Imaging, University of Liège, Liège, Belgium, ⁵Department of Neurology, CHU Liège, Liège, Belgium, ⁶Département d'Anatomie Pathologique, CHU Liège, Liège, Belgium, ⁷Division of Pediatric Neurology and Metabolism, Department of Pediatrics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium, ⁸Institut de Pathologie et de Génétique, Gosselies, Belgium, ⁹Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France, ¹⁰Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Angers, Angers, France, ¹¹Faculté de Médecine, URPhyM, Université de Namur, Namur, Belgium

Mutations in *DNM1L* (*DRP1*), which encode a key player of mitochondrial and peroxisomal fission, have been reported in patients with the variable phenotypic spectrum, ranging from non-syndromic optic atrophy to lethal infantile encephalopathy. Here, we report a case of an adult female patient presenting with a complex neurological phenotype that associates axonal sensory neuropathy, spasticity, optic atrophy, dysarthria, dysphasia, dystonia, and ataxia, worsening with aging. Whole-exome sequencing revealed a heterozygous *de novo* variant in the GTPase domain of *DNM1L* [NM_001278464.1: c.176C>A p.(Thr59Asn)] making her the oldest patient suffering from encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission-1. *In silico* analysis suggested a protein destabilization effect of the variant Thr59Asn. Unexpectedly, Western blotting disclosed profound decrease of *DNM1L* expression, probably related to the degradation of *DNM1L* complexes. A detailed description of mitochondrial and peroxisomal anomalies in transmission electron and 3D fluorescence microscopy studies confirmed the exceptional phenotype of this patient.

KEYWORDS

mitochondrial fission, *DRP1*, *DNM1L*, encephalopathy, EMPF1

Introduction

DNM1L is located on chromosome 12p11.21 and encodes the 81.8 kDa human dynamin-1-like protein (DNM1L), formerly called dynamin-related protein 1 (DRP1). DNM1L protein belongs to the conserved family of dynamins and plays a key role in the regulation of mitochondrial and peroxisomal fission (1–5). As for other dynamins, DNM1L comprises a large GTPase domain, including the GTP-binding motifs that are needed for guanine nucleotide binding and hydrolysis, and two additional domains, the middle domain and the GTPase effector domain (GED), which are involved in oligomerization and regulation of the GTPase activity. DNM1L forms homodimers which are recruited to the outer membrane of the mitochondria and to the surface of peroxisomes, where they induce mitochondrial or peroxisomal fission, by wrapping around the scission site to constrict and sever the membrane through a GTP-hydrolysis-dependent mechanism (6). Excessive activation and upregulation of DNM1L has been found to be associated with aberrant mitochondrial fragmentation, causing neuronal damage in various neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (7). Furthermore, a neural cell specific *Drp1*^{-/-} mice model emphasized the role of *Drp1* in embryonic forebrain development and synapse formation (8).

In humans, heterozygous *DNM1L* variants were reported in isolated autosomal dominant optic atrophy type 5 (OPA5, MIM#610708), and monoallelic or biallelic variants were associated with encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission (EMPF1, MIM#614388). Thirty-eight EMPF1 patients have been reported to date, showing a wide phenotypic spectrum and a variable degree of severity, ranging from early death to slowly progressive encephalopathy with hypotonia and developmental delay (9–11), while seizures were inconstantly reported. Dystonia, dysarthria, spasticity, microcephaly, insensitivity to pain, peripheral neuropathy, ataxia, optic atrophy, and brain anomalies (dysmyelination, corpus callosum anomalies, and T2 hyperintensities mainly in the cortex and the basal ganglia) are common clinical features associated with *DNM1L* variants.

Here, we report the oldest EMPF1 patient, whose clinical presentation recapitulates the entire phenotypic spectrum of *DNM1L*-related encephalopathy, except for the microcephaly and brain MRI anomalies, emphasizing the pejorative evolution of the clinical presentation. Heterozygous mutations in the GTPase domain usually affect *DNM1L* enzymatic activity without affecting its abundance, but here the p.(Thr59Asn) variant induced the full loss of *DNM1L* normal forms probably following the degradation of the DNM1L complexes. We confirmed, with a detailed description of mitochondrial and peroxisomal anomalies in transmission electron and 3D fluorescence microscopy studies, the abnormal cellular features of this patient.

Case report

The 32-year-old female patient is the only child of healthy non-consanguineous Caucasian parents (Supplementary Figure 1). Pregnancy was uncomplicated. She was born at 38-week gestation by cesarean section due to narrow maternal pelvis, with a weight of 2,950 g (P45), height of 47.5 cm (P35), and normal head circumference (precise measure not known). Neonatal adaptation was correct (APGAR score 9 at 1 min). During the first month, sucking difficulties and poor weight gain were noticed. The patient showed hypotonia and global developmental delay. She walked autonomously at 24 months, with a tendency to tiptoe and with ataxic gait, despite intensive physiotherapy. She progressively developed a tetrapyramidal syndrome. A diagnostic hypothesis of cerebral palsy was suggested, but CT scan revealed no brain anomalies. She spoke the first intelligible words at 3.5 years and built sentences at 4 years. During childhood, she had behavioral problems, such as tantrums, which decreased with aging. She had high pain tolerance. She had learning difficulties and required a school for special educational needs. At the age of 7, global IQ was estimated around 66 at the Wechsler scale. She can read and write, but mathematics remains a challenge. Since age 10, her neurological status deteriorated with increasing gait disturbances, dysarthria, and dysphagia. At the age of 12 years, clinical examination revealed a scoliosis, which was treated with a brace. She also had an ophthalmological follow-up for nystagmus and bilateral optic atrophy (Table 1). Her puberty was delayed, with the first menstrual cycle beginning at 16 years. At the age of 18 years, she developed tonic-clonic epileptic generalized seizures. Epilepsy was well controlled with lamotrigine treatment. At age 27, sleep study revealed severe dyssomnia, with fragmented sleep and a periodic limb movement disorder, treated with clonazepam.

At clinical examination at 29 years, the patient's height was 155 cm (P3) and weight was 42 kg (−3SD). Her head circumference was 54.5 cm (P55). She had a long and asymmetric face with deep-set eyes, divergent strabismus, high nasal bridge, and high arched palate (Supplementary Figure 1). Standard X-ray showed scoliosis that was 35 degrees with a Risser index of 4. Neurological examination revealed spastic quadriparesis with brisk tendon reflexes, a pseudobulbar syndrome with dysarthria and dysphagia, dystonia, ataxia, and lower limbs proprioception deficit.

Currently, at 32 years, the patient daily presents with drop attack of the lower limbs, without loss of consciousness. Spasticity, contractures, ataxia, peripheral neuropathy, dysarthria, and dysphagia are worsening with aging. She uses a wheelchair and requires assistance with activities of daily life, but can still feed herself. Her treatment consists in lamotrigine, coenzyme Q10, clonazepam, sotalol, alprazolam, and levetiracetam. She is receiving speech therapy, physiotherapy, occupational therapy, and psychological support.

TABLE 1 Summary of the clinical and genetic features of the patient in this study compared with EMIPF1 patients described with a de novo heterozygous mutation in the GTPase domain of DNMM1L

	Trujillano et al. (12)	Whitley et al. (13)	Verrigni et al. (14)	Longo et al. (15)	Keller et al. (9)	Liu et al. (10)	Wei et al. (16)	This study
Mutation	c.607G>A p.(Val203Ile)	c.95 G>C p.(Gly32Ala)	c.668G>T p.(Gly213Val)	c.436G>A p.(Asp146Asn)	c.115A>G p.(Ser39Gly)	c.119G>A p.(Ser39Asn)	c.445G>A p.(Gly149Asp)	c.176C>A p.(Thr59Asn)
Inheritance	de novo	de novo	de novo	de novo	de novo	de novo	de novo	de novo
Gender	female	female	female	female	male	male	male	female
Age	8 months	7 years	6 years	5 years	10 years	3 years	4.5 years	32 years
Early developmental delay	+	+	-	+	+	+	+	+
Hypotonia	NA	+	-	++	+	+	+	+
Spasticity	+	+	NA	+	-	+	-	++
Dysostia	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	+
Seizures	-	-	++ (>2.5 y)	-	+	-	-	+
Peripheral neuropathy	+	+	NA	++ (axonal, sensory)	+	+	+	++ (axonal, sensory)
Feeding difficulties/failure to thrive	+	+	NA	+	++	NA	NA	+
Ataxia	NA	+	+	+	NA	NA	+	+
Nystagmus	+	+	NA	+	-	NA	-	+
Optic nerve atrophy	-	+	NA	-	-	NA	NA	+
Facial dysmorphism	NA	+	NA	NA	+	NA	-	+
Microcephaly	NA	+	NA	-	+	+	NA	-
Brain MRI anomalies	Abnormal myelination, cerebral white matter atrophy	-	T2 hyperintensities in the posterior white matter regions and in the cortical areas. Global cerebral and cerebellar atrophy	-	Left cerebellar venous angioma (non specific)	T2 hyperintensity of basal ganglia, ventriculomegaly	Delayed myelination, thin corpus callosum	-
Scoliosis	NA	+	NA	-	-	-	NA	+
Other	Areflexia, Tongue fasciculations, Craniosynostosis, Chorea, Recurrent respiratory infections, Bilateral vocal cord paralysis	aphthous ulcers	-	-	Mitral valve insufficiency	-	Strabismus, mild cognitive impairment, dysarthria, equinovarus foot deformity	Insensitivity to pain, dysarthria, delayed zemannche

Brain MRI, performed in childhood, was controlled at adulthood and remained unremarkable. A fluorodeoxyglucose (FDG)-positron emission tomography (PET) revealed basal ganglia hypermetabolism compared to cerebral cortex. At adult age, lumbar puncture showed normal intracranial pressure and normal glucose and cells in cerebrospinal fluid. Metabolic screening (plasma and urinary amino acids, very-long-chain fatty acid) was unremarkable, except for increased lactate:pyruvate and 3-hydroxybutyrate:acetoacetate ratios, which were more pronounced post-prandially (lactate 2.41 mmol/L, nl 0.4–1.8; L:P 18.5, nl <15; 3OHB:AA 3.5, nl <1). At 23 years, a severe axonal sensory neuropathy was detected in the four limbs by nerve conduction studies (NCS).

Genetic investigations

The patient underwent serial genetic investigations (molecular karyotyping, *POLG* sequencing, spino-cerebellar-ataxia/Friedreich/dentatorubral-pallidoluysian triplet expansions analyses) that were unremarkable. Clinical exome sequencing was performed on DNA extracted from the whole blood of the patient and her parents, with Illumina NextSeq technology, according to the manufacturer's protocol (Supplementary material and method). In the proband, a heterozygous *DNM1L* c.176C>A p.(Thr59Asn) (Chr12(GRCh38): g.32701488 C>A) variant was detected (NM_001278464.1). The ClinVar accession number is SCV001780462. The variant was confirmed by PCR and direct Sanger sequencing. The primer sequences and reaction conditions are available upon request. This variant is not listed in genomic variant database (GnomAD). Paternity and maternity were molecularly confirmed, and the variant was not found in the parents suggesting that it arose *de novo* (paternal coverage 146X; maternal coverage 99X) (Supplementary Figure 2). The pathogenicity of the variant was assessed *in silico* using multiple prediction software, with results strongly supporting his deleterious and damaging effect, classified as class 5 variant by the American College of Medical Genetics ACMG prediction program (PS2, PS3, PP2, PP3, PP5). DNA next-generation sequencing did not detect any additional variant nor CNV on the second *DNM1L* allele (coverage 100% >20X). Moreover, no additional candidate causal variant was identified by clinical exome (in particular, no mutation was detected in the *OPA1* gene with a coverage of 99.95% >20X). In the proband, cDNA short- and long-range amplification and sequencing revealed that the mutant and the wide-type *DNM1L* alleles are both expressed, in similar proportion (50%-50%), in blood extracted lymphocytes, in lymphoblastoid cells, and in fibroblasts (Supplementary Figure 2 and Supplementary material and method).

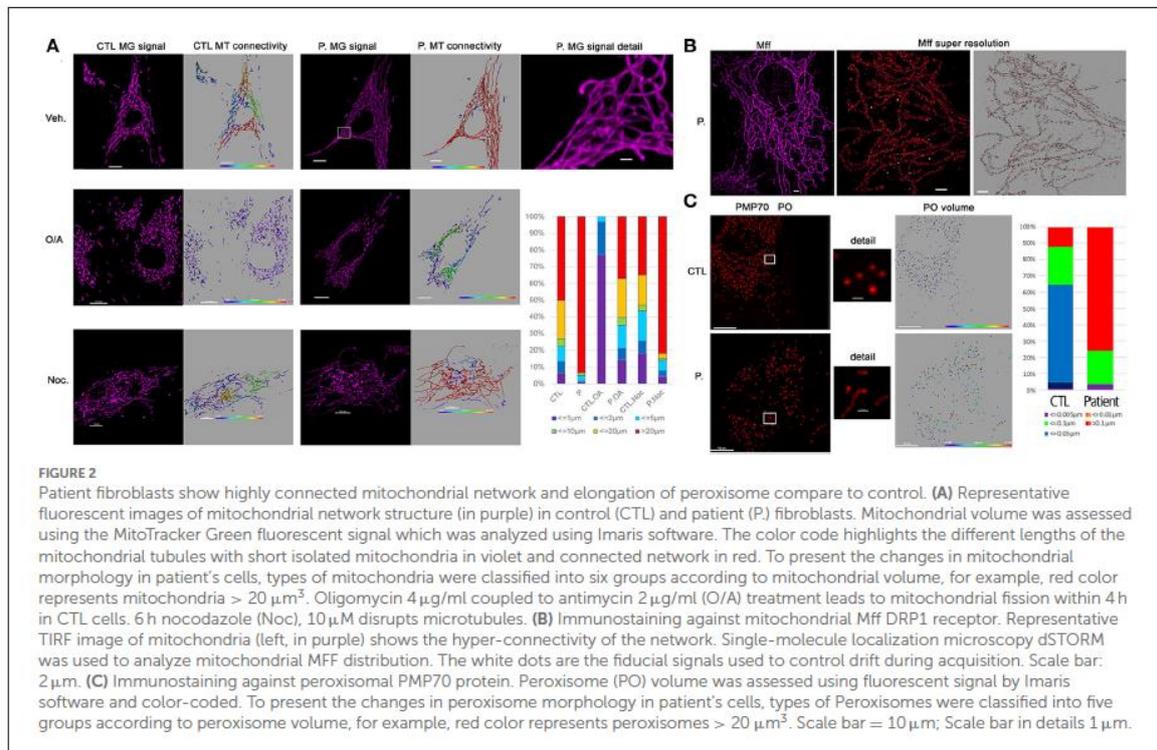
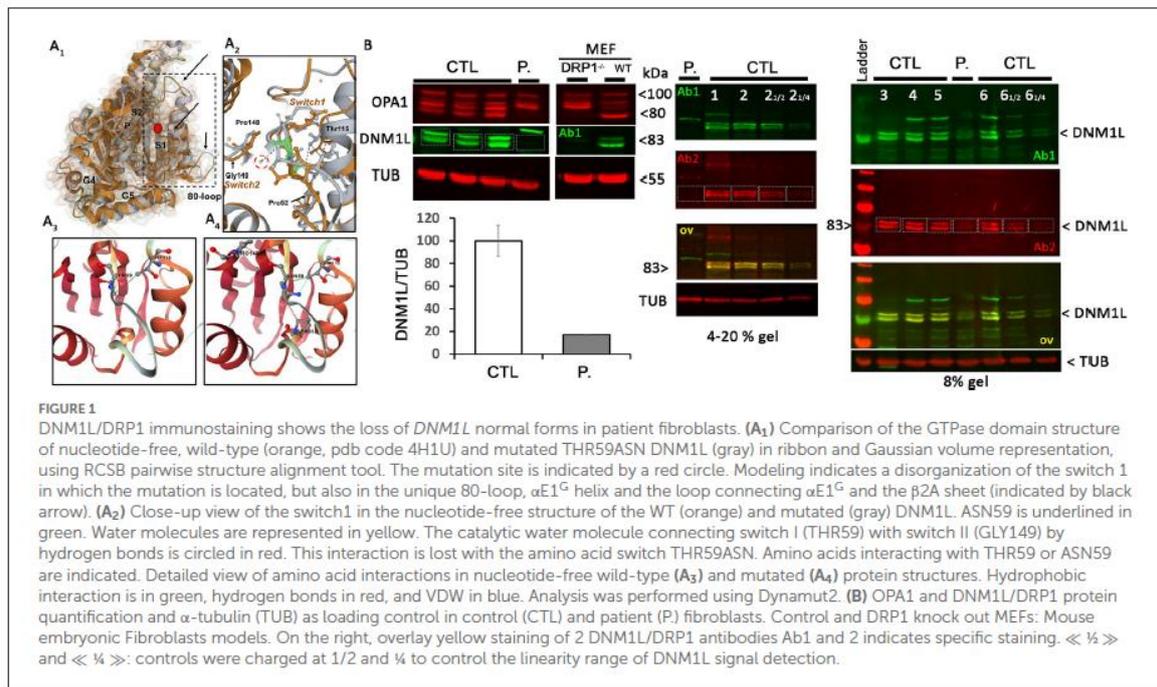
In addition, mitochondrial genome sequencing performed with Illumina MiSeq technology showed the m.10254G>A

p.(Asp66Asn) variant in *MT-ND3* (NC_012920) at 1.5% heteroplasmy in blood, at 9.9% heteroplasmy in urine, and at 1.3% heteroplasmy in skeletal muscle. This variant has no frequency in MitoMap and is classified as pathogenic in ClinVar (accession number VCV000155887). In the mother, this mitochondrial variant was found at 1.3% heteroplasmy in urine but was not significantly detected in blood (Supplementary Figure 2).

Biochemical and histological characterizations

The Thr59Asn substitution is located in the GTPase domain, within a stretch of highly conserved residues of the switch I essential for the ligand binding, the catalytic activity of the enzyme, and the interaction with other domains, such as the switch 2 (5). *In silico* structural modeling of DNML1 Thr59Asn and comparison with the wild-type, nucleotide-free structure (PDB:4H1U) indicated conformational changes in the switch s1, $\alpha E1^G$ helix, and two disorders loop, the 80-loop and the loop connecting $\alpha E1^G$ and the $\beta 2A$ sheet (Figure 1A). In addition, bioinformatics tests predicted that the Thr59Asn variant affects the stability of DNML1 (Supplementary Figure 3). While contradictory results were obtained according to the predictive tools used for the nucleotide-free structure, the Thr59Asn substitution is predicted to destabilize the protein in its nucleotide-bound state, particularly in the GDP-bound one (Supplementary Figure 3B). We characterized the skin fibroblasts from the patient carrying the DNML1 p.Thr59Asn mutation to explore its pathogenic nature. Unexpectedly, by Western blot, we showed a strong decrease of DNML1 protein expression (Figure 1B), with the very faint of signal corresponding to the two 81-83Kda bands generally revealed by DNML1 immunostaining. In a process that remains to be understood, the mutated DNML1 form would complex with the wide-type DNML1 form and be degraded. Interestingly, in the patient fibroblasts, the profile of OPA1 isoforms is also different, although no mutation or splicing alteration was detected by NGS and long-range *OPA1* RNA studies (data not shown).

As loss of DNML1 function leads to a block in mitochondrial and peroxisomal fission, we conducted microscopic organelles' imaging by fluorescent MitoTracker Green probe and immunostaining against the peroxisomal membrane protein 70, respectively. Normal skin fibroblasts show a set of dynamic tubular networks with some isolated mitochondria that we could fragment by bioenergetic stress (Figure 2A). 3D analysis and morphometric measurements revealed a hyper-connected mitochondrial network (Figure 2A) without any isolated mitochondria. After antimycin/oligomycin treatment, which induces a mitochondrial stress by the inhibition of complexes III and V, the mitochondrial network remained tubular with some swollen elements. As hyper-fusion requires



mitochondria to be brought together, the microtubule network was chemically disrupted using nocodazole to prevent mitochondrial movements. Following cytoskeletal depolymerization, the mitochondrial network remained abnormally connected in the patient's fibroblasts suggesting an absence of fission. We performed immunostaining of Mff, the mitochondrial outer membrane DRP1 receptor, by super-resolution microscopy and confirmed normal Mff distribution on mitochondrial hyper-connected network of the mutated fibroblasts (Figure 2B). Compared to control fibroblasts, disclosing small and abundant peroxisomes, mutated fibroblasts showed a decreased number of peroxisomes, which appeared significantly elongated (Figure 2C). These results strongly suggest a defect in DRP1 function, with downstream consequences on mitochondrial fission and peroxisomal shape in the DNM1L p.Thr59Asn fibroblasts.

Transmission electron microscopy (TEM) pictures of patient fibroblasts confirmed the presence of enlarged peroxisomes (17) with many peroxisomes in autophagic vacuoles and longer mitochondria than in control cells (Figure 3A). Immunohistological studies of a muscle biopsy revealed no specific anomaly, and only one ragged red fiber was detected. However, muscle TEM disclosed elongated mitochondria, with long slender protrusions from some mitochondria, likely corresponding to mitochondrial nanotunnels. No ultrastructure defect was evidenced, with normal cristae distribution, apart from a couple of mitochondrial profiles with some degenerated cristae. Subsarcolemmal concentric laminated bodies and several multiple degenerative myelinoid intramitochondrial foci were identified (Figure 3B). No respiratory chain complex enzymatic deficiency was shown in muscle and skin biopsy.

Discussion

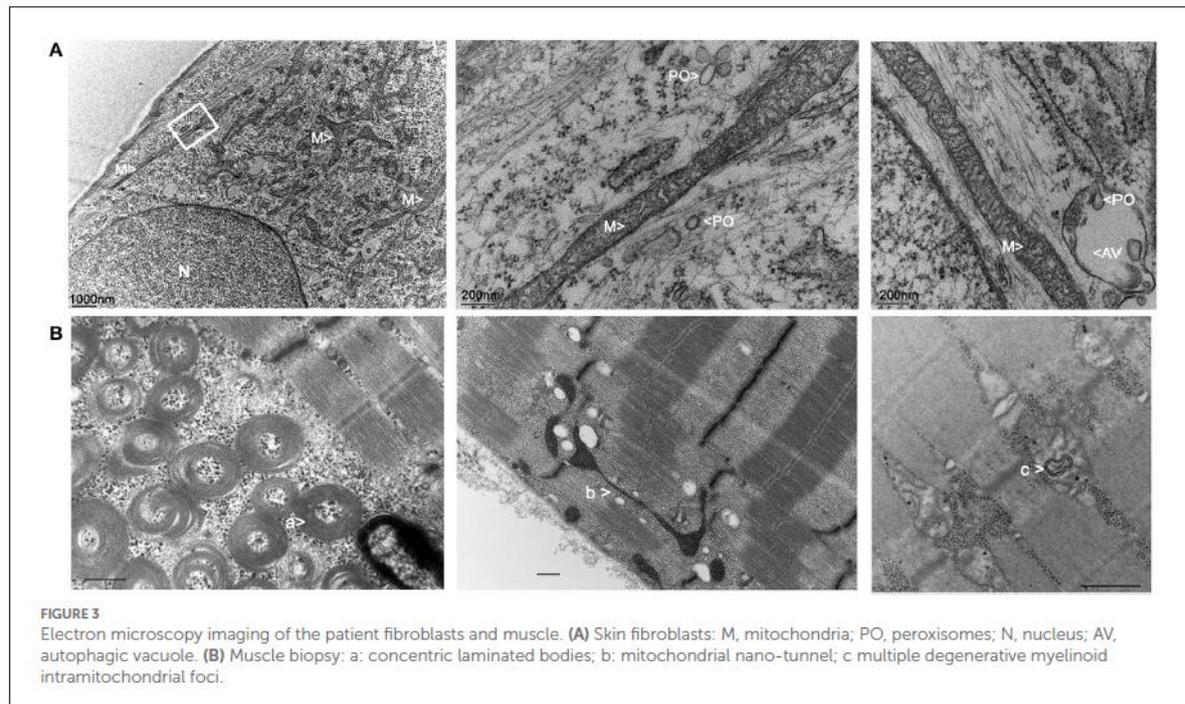
Here, we report the oldest EMPF1 patient, whose clinical presentation recapitulates the entire phenotypic spectrum of DNM1L-related encephalopathy, except for the microcephaly and brain MRI anomalies (Table 1). This patient shows a complex neurological phenotype associating developmental delay, progressive spastic quadriplegia, dystonia, dysarthria, dysphagia, axonal neuropathy, ataxia, nystagmus, optic atrophy, epilepsy, low sensitivity to pain, scoliosis, delayed menarche, and learning difficulties. Peripheral neuropathy, usually described as axonal with predominant sensory loss, is constantly reported in EMPF1 patients harboring a heterozygous DNM1L variant in the GTPase domain. This peripheral neuropathy is progressive, as confirmed by electroneuromyography examinations of the patient, which showed a drastic decrease of the sensory nerve action potentials and worsening of muscle denervation signs between ages 7 and 23. Interestingly, delayed menarche described in our patient may also be part of the DNM1L-related

phenotypic spectrum as it was already reported in another 27-year-old female harboring a *de novo* heterozygous DNM1L variant in the GED domain (18).

The first case of lethal EMPF1 encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission was described in 2007, in a new-born girl harboring a *de novo* heterozygous mutation in DRP1 middle domain, and presenting with microcephaly, abnormal brain development, optic atrophy, persistent lactic acidemia, and mildly elevated plasma concentration of very-long-chain fatty acids (19). Additional descriptions of severe lethal forms of EMPF1 associated with *de novo* heterozygous variants located in DRP1 middle domain were reported (9, 11, 20–22). Outside the DRP1 middle domain, DNM1L variants were also reported in the GTPase domain, initially at a heterozygous state associated with isolated autosomal dominant optic atrophy and at compound heterozygous state associated with autosomal recessive EMPF1 (23). More recently, several patients suffering from encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission-1 were described with *de novo* heterozygous variants located in the GTPase domain, as observed in our patient (9, 10, 12–16) (Table 1). Interestingly, most of the mutated amino acids in this latter cohort (Ser39, Asp146, Gly149) were reported as the most relevant residues of the five GTP-binding stretches, as the Thr59 residue mutated in our patient (5).

A dominant-negative mechanism is classically hypothesized for heterozygous mutations located in the GTPase domain, as they affect the enzymatic domain of the protein without altering the capacity of the protein to homopolymerize, leading to a loss of function of the wild-type protein within the homopolymers (24). This dominant-negative effect was also suggested by the functional experiments on DNM1L/DRP1 (Thr59Asn) mutant cells and model organism studies (2, 5, 25, 26). However, the present study revealed an almost complete loss of DNM1L protein in the mutated fibroblasts, which suggests the degradation of the mutated and non-mutated DNM1L proteins. As the complete loss of DNM1L/DRP1 in mice is embryonic lethal, our results raise questions concerning DNM1L/DRP1 complex instability within different tissues and its downstream consequences on this patient's clinical presentation.

In addition, the phenotype of our proband might be influenced by the heteroplasmic presence of the m.10254G>A p.(Asp66Asn) variant in *MT-ND3*. This variant was reported at 90% heteroplasmy in the muscle sample of a patient presenting with a severe Leigh syndrome associated with early developmental regression and ophthalmoplegia (27). However, the 1.3% heteroplasmy level measured in muscle sample of our patient is very low, and no necrotic lesion in the brainstem, basal ganglia, or thalamus, and characteristic of the Leigh syndrome was observed by brain MRI. Consequently, the contribution of this mitochondrial variant to the DNM1L patient clinical presentation is most likely not preponderant.



EMPF1 phenotype overlaps with the clinical spectrum of other diseases linked to the clinical spectrum of other diseases linked to proteins involved in mitochondrial dynamics fusion (MFN2, OPA1) and fission (MFF, MID49/MIEF2, DNIM2). EMPF1 is clinically very similar to Behr's syndrome (OMIM #210000) due to biallelic *OPA1* mutations (28) and to EMPF2 (OMIM #614785) due to biallelic *MFF* mutations (29). Mitochondrial morphology is maintained through the opposing forces of fission and fusion, and this balance is crucial in muscles and neurons. Interestingly, functional studies have already demonstrated the essential role of threonine-59 in Drp1. In *C. elegans* *DNM1L/DRP1* ortholog gene, the analogous Thr61Asn mutation has a strong dominant-negative effect on mitochondrial morphology, by inhibiting the mitochondrial outer membrane fission (25). Moreover, in COS-7 cells transfected with the *DNM1L/DRP1* (Thr59Asn) allele, the mitochondrial network invariably collapsed into large perinuclear aggregates, composed of clustered mitochondrial tubules, reflecting a defective distribution of the fused mitochondrial network throughout the cell (26).

In this respect, reconstruction of 3D fluorescence microscopy images showed a hyper-connected mitochondrial network in the patient fibroblasts, compared to control, and a defect of fragmentation in mitochondrial stress context. This was well described in *DNM1L*-related optic atrophy or encephalopathy, contrasting with hyper-fragmentation observed in *OPA1*-related optic atrophy (14, 15, 19, 30). In muscle, the long slender double-membrane protrusions

from mitochondria likely correspond to nano-tunnels that connect the matrices of non-adjacent mitochondria, which might emphasize immobilized mitochondria "in distress" (31). These protrusions are observed in normal tissue but are more abundant in presence of mtDNA mutations (32). Similarly, TEM analyses of the patient muscle revealed the presence of concentric laminated bodies that are common to other mitochondrial myopathies (33). Altogether, these peculiar observations reflect mitochondrial stress in our patient and should be confirmed in future by additional muscle sample analyses of EMPF1 patients.

DNM1L protein also mediates peroxisomal fission. Peroxisomes are dynamic and multifunctional organelles involved in the beta-oxidation of the very-long-chain fatty acids and in the formation of plasmalogen, which is an important component of the myelin. Very-long-chain fatty acid dosages performed in our *DNM1L/DRP1* (Thr59Asn) patient showed normal results (data not shown), while our data revealed a decreased number of significantly elongated peroxisomes, as already reported for other *DNM1L* patients (15). Additional studies demonstrated that *DNM1L/DRP1* is recruited by *PEX11* to the peroxisome membranes to induce their division and that the dominant-negative *DNM1L/DRP1* (Thr59Asn) mutant reduces peroxisome abundance (2). More recently, X-ray structure analyses of *DNM1L* confirmed that threonine-59 is located in the switch I motif and is essential for the GTPase reaction involved in mitochondrial and peroxisome

segregations (5). The great impact of the p.(Thr59Asn) mutation on peroxisomal network and shape is thus a central contribution to the severity of the clinical phenotype reported here (15, 19, 24).

This work evidences a novel *de novo* heterozygous *DNM1L* mutation causing an original adult presentation of encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission-1 EMPF1. Structural anomalies of mitochondria and peroxisomes observed in the primary cell culture from skin biopsy attest the main impact of *DNM1L/DRP1* (Thr59Asn) mutation on mitochondrial and peroxisomal dynamics, which has to be correlated with the original post-translational modifications of *DNM1L* and *OPA1*, emphasizing the complexity of *DRP1* regulation and its role in causing EMPF1 pathogenicity.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The name of the repository and accession number can be found below: National Center for Biotechnology Information (NCBI) ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, VCV001195874.1, (accessed May 6, 2022).

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board Committee of the University Hospital of Angers Authorization number: AC-2012-1507. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

IM, CL, and AC: drafting of the manuscript. IM, CL, AC, NG, and GL: revision of the manuscript. IM and AC: study concept or design. GG, AC, VB, DK, RV, OH, CL, and NG: acquisition of data. AC, CL, VB, BW, AV, and CL: interpretation

References

- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem.* (2003) 278:8597–605. doi: 10.1074/jbc.M211761200
- Li X, Gould SJ. The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J Biol Chem.* (2003) 278:17012–20. doi: 10.1074/jbc.M212031200

of data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by “Université d’Angers.” AV is supported by a Henry Wellcome Fellowship (215888/Z/19/Z).

Acknowledgments

We are thankful to the patient and her family for participating in the study. We thank Katharina DULIEU from the Department of Physical and Rehabilitation Medicine, Libramont, Belgium, for the clinical follow-up of the patient. We thank the University of Angers, SCIAM Microscopy Core Facility, SFR ICAT, F-49000 Angers, France.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.937885/full#supplementary-material>

- Bonekamp NA, Vormund K, Jacob R, Schrader M. Dynamin-like protein 1 at the Golgi complex: a novel component of the sorting/targeting machinery en route to the plasma membrane. *Exp Cell Res.* (2010) 316:3454–67. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.020
- Kraus F, Roy K, Pucadyil TJ, Ryan MT. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature.* (2021) 590:57–66. doi: 10.1038/s41586-021-03214-x

5. Wenger J, Klinglmayr E, Fröhlich C, Eibl C, Gimeno A, Hessenberger M, et al. Functional mapping of human dynamin-1-like GTPase domain based on x-ray structure analyses. *PLoS ONE*. (2013) 8:e71835. doi: 10.1371/journal.pone.0071835
6. Koirala S, Guo Q, Kalia R, Bui HT, Eckert DM, Frost A, et al. Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110:E1342–1351. doi: 10.1073/pnas.1300855110
7. Joshi AU, Minhas PS, Liddelow SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci*. (2019) 22:1635–48. doi: 10.1038/s41593-019-0486-0
8. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*. (2009) 11:958–66. doi: 10.1038/ncb1907
9. Keller N, Paketci C, Edem P, Thiele H, Yis U, Wirth B, et al. novo DNMI1 variant presenting with severe muscular atrophy, dystonia and sensory neuropathy. *Eur J Med Genet*. (2021) 64:104134. doi: 10.1016/j.ejmg.2020.104134
10. Liu X, Zhang Z, Li D, Lei M, Li Q, Liu X, et al. DNMI1-related mitochondrial fission defects presenting as encephalopathy: a case report and literature review. *Front Pediatr*. (2021) 9:626657. doi: 10.3389/fped.2021.626657
11. Piccoli C, Scrima R, D'Aprile A, Chetta M, Cela O, Pacelli C, et al. Pathogenic DNMI1 Variant (1085G>A) linked to infantile progressive neurological disorder: evidence of maternal transmission by germline mosaicism and influence of a contemporary in cis variant (1535T>C). *Genes (Basel)*. (2021) 12:1295. doi: 10.3390/genes12091295
12. Trujillano D, Bertoli-Avella AM, Kumar Kandaswamy K, Weiss ME, Köster J, Marais A, et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet*. (2017) 25:176–82. doi: 10.1038/ejhg.2016.146
13. Whitley BN, Lam C, Cui H, Haude K, Bai R, Escobar L, et al. Aberrant Drp1-mediated mitochondrial division presents in humans with variable outcomes. *Hum Mol Genet*. (2018) 27:3710–9. doi: 10.1093/hmg/ddy287
14. Verrigni D, Di Nottia M, Ardisson A, Baruffini E, Nasca A, Legati A, et al. Clinical-genetic features and peculiar muscle histopathology in infantile DNMI1-related mitochondrial epileptic encephalopathy. *Hum Mutat*. (2019) 40:601–18. doi: 10.1002/humu.23729
15. Longo F, Benedetti S, Zambon AA, Sora MGN, Di Resta C, De Ritis D, et al. Impaired turnover of hyperfused mitochondria in severe axonal neuropathy due to a novel DRP1 mutation. *Hum Mol Genet*. (2020) 29:177–88. doi: 10.1093/hmg/ddz211
16. Wei Y, Qian M. Case report: a novel *de novo* mutation in DNMI1 presenting with developmental delay, ataxia, and peripheral neuropathy. *Front Pediatr*. (2021) 9:604105. doi: 10.3389/fped.2021.604105
17. Kors S, Hacker C, Bolton C, Maier R, Reimann L, Kitchener EJA, et al. Regulating peroxisome-ER contacts via the ACBD5-VAPB tether by FFAT motif phosphorylation and GSK3 β . *J Cell Biol*. (2022) 221:e202003143. doi: 10.1083/jcb.202003143
18. Assia Batzir N, Bhagwat PK, Eble TN, Liu P, Eng CM, Elesa SH, et al. De novo missense variant in the GTPase effector domain (GED) of DNMI1 leads to static encephalopathy and seizures. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. (2019) 5:a003673. doi: 10.1101/mcs.a003673
19. Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV, et al. lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med*. (2007) 356:1736–41. doi: 10.1056/NEJMoa064436
20. Ladds E, Whitney A, Dombi E, Hofer M, Anand G, Harrison V, et al. De novo DNMI1 mutation associated with mitochondrial epilepsy syndrome with fever sensitivity. *Neurol Genet*. (2018) 4:e258. doi: 10.1212/NXG.0000000000000258
21. Ryan CS, Fine AL, Cohen AL, Schiltz BM, Renaud DL, Wirrell EC, et al. De novo DNMI1 variant in a teenager with progressive paroxysmal dystonia and lethal super-refractory myoclonic status epilepticus. *J Child Neurol*. (2018) 33:651–8. doi: 10.1177/0883073818778203
22. Schmid SJ, Wagner M, Goetz C, Makowski C, Freisinger P, Berweck S, et al. Novo dominant negative mutation in DNMI1 causes sudden onset status epilepticus with subsequent epileptic encephalopathy. *Neuropediatrics*. (2019) 50:197–201. doi: 10.1055/s-0039-1685217
23. Gerber S, Charif M, Chevrollier A, Chaumette T, Angebault C, Kane MS, et al. Mutations in DNMI1, as in OPA1, result in dominant optic atrophy despite opposite effects on mitochondrial fusion and fission. *Brain*. (2017) 140:2586–96. doi: 10.1093/brain/awx219
24. Gerber S, Charif M, Chevrollier A, Chaumette T, Angebault C, Kane S, et al. Reply: The expanding neurological phenotype of DNMI1-related disorders. *Brain*. (2018) 141:e29. doi: 10.1093/brain/awy027
25. Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Blik AM. C elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*. (1999) 4:815–26. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80391-3
26. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. (2001) 12:2245–56. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245
27. Leshinsky-Silver E, Lev D, Malinger G, Shapira D, Cohen S, Lerman-Sagie T, et al. Leigh disease presenting in utero due to a novel missense mutation in the mitochondrial DNA-ND3. *Mol Genet Metab*. (2010) 100:65–70. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.02.002
28. Bonneau D, Colin E, Oca F, Ferré M, Chevrollier A, Guéguen N, et al. Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1. *Brain*. (2014) 137:e301. doi: 10.1093/brain/awu184
29. Koch J, Feichtinger RG, Freisinger P, Pies M, Schrödl F, Iuso A, et al. Disturbed mitochondrial and peroxisomal dynamics due to loss of MFF causes Leigh-like encephalopathy, optic atrophy and peripheral neuropathy. *J Med Genet*. (2016) 53:270–8. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103500
30. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo M-AP, Verry C, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol*. (2008) 63:794–8. doi: 10.1002/ana.21385
31. Vincent AE, Turnbull DM, Eisner V, Hajnóczky G, Picard M. Mitochondrial Nanotunnels. *Trends Cell Biol*. (2017) 27:787–99. doi: 10.1016/j.tcb.2017.08.009
32. Vincent AE, White K, Davey T, Philips J, Ogden RT, Lawless C, et al. Quantitative 3D Mapping of the Human Skeletal Muscle Mitochondrial Network. *Cell Rep*. (2019) 26:996–1009.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.051
33. Vincent AE, Ng YS, White K, Davey T, Mannella C, Falkous G, et al. The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Sci Rep*. (2016) 6:30610. doi: 10.1038/srep30610

1.2. Résultats

La patiente concernée est une femme âgée de 32ans qui, bien que des signes cliniques aient été identifiés dès son plus jeune âge, n'avait pas été diagnostiquée génétiquement. Elle présente désormais un phénotype neurologique complexe, associé à une neuropathie sensorielle axonale, une spasticité, une atrophie optique, une dysarthrie, une dysphasie, une dystonie et ataxie, dont les conséquences s'aggravent avec l'âge. Récemment, un séquençage de l'exome entier a révélé une mutation hétérozygote *de novo* dans le domaine GTPase de la DNM1L (NM_001278464.1 : c.176C>A p.(Thr59Asn)). L'analyse bio-informatique utilisant plusieurs logiciels de prédiction, a fourni des scores de pathogénicité du variant suggérant le caractère délétère et dommageable de ce variant (classé en classe 5 par le programme de prédiction de l'ACGM). Nous avons également généré une modélisation structurelle *in silico* du variant DNM1L Thr59Asn qui montre des changements de conformation de la protéine dans plusieurs boucles et hélices, notamment au niveau d'une région particulière, essentielle pour la liaison du ligand, l'activité catalytique de l'enzyme et l'interaction avec d'autres domaines de la protéine. Ceci suggérait ainsi une déstabilisation de la protéine DNM1L, ce que confirment les outils de prédiction bio-informatique, en particulier pour les formes de DNM1L liées au GDP. Ces outils de prédiction ne suggéraient par contre pas de modification de la capacité d'oligomérisation de la DNM1L. De manière très inattendue, nous avons montré par une analyse par Western-Blot une très forte diminution de l'expression de DNM1L, supérieure à 50%. Ceci pourrait suggérer une dimérisation/oligomérisation de la forme mutée et sauvage, et une dégradation de l'ensemble de ce complexe après fixation ou hydrolyse du substrat, mais de plus amples analyses seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, l'observation des mitochondries par imagerie microscopique fluorescente des fibroblastes dérivés de ce patient montre un réseau hyperconnecté, ce qui correspond à une baisse d'activité de fission-DRP1 dépendante. De plus, le réseau mitochondrial reste plus longtemps tubulaire suite à l'utilisation d'inhibiteurs induisant à la fois une inhibition de la chaîne respiratoire (antimycine) et de la synthèse d'ATP (oligomycine), connus pour induire une fragmentation mitochondriale (Lazarou et al. 2015). L'immunomarquage contre la protéine membranaire peroxysomale 70 a également révélé un nombre réduit de peroxysomes associé à une augmentation de la longueur des peroxysomes, ce qui corrèle avec un défaut de la fonction de DNM1L dans les fibroblastes DNM1L p.Thr59Asn. Enfin, une exploration de l'ultrastructure des mitochondries et des peroxysomes par microscopie électronique à transmission (MET) de tissus et des fibroblastes du patient ont confirmé la présence de peroxysomes agrandis avec notamment de nombreux peroxysomes dans des vacuoles autophagiques ainsi que des mitochondries plus longues que dans les cellules témoins sans pour autant d'atteinte de la distribution des crêtes.

1.3. Discussion

Dans cette étude nous rapportons le cas d'un patient atteint d'EMPF1, lié à un variant pathogène hétérozygote *de novo*. Le premier cas d'encéphalopathie létale EMPF1 due à une fission mitochondriale et peroxysomale défectueuse a été décrit en 2007, depuis d'autres descriptions de formes létales sévères de

EMPF1 associées à des variants hétérozygotes *de novo* situés dans le domaine médian de DMN1L mais également situés dans le domaine GTPase comme notre patiente, ont été rapportées.

Généralement, un mécanisme dominant négatif est supposé pour les mutations hétérozygotes situées dans le domaine GTPase, en effet, dans ce cas le domaine enzymatique est affecté mais la capacité d'oligomérisation de la protéine n'est pas altérée, conduisant à une perte de fonction catalytique. Cependant notre étude montre une diminution drastique de l'expression de la protéine DNM1L dans les fibroblastes, qui pourrait s'expliquer par un effet déstabilisateur du variant p.Thr59Asn sur la protéine, induisant sa dégradation. Cependant, la déplétion de DNM1L chez l'embryon de souris n'est pas compatible avec la vie (Ishihara et al. 2009; Wakabayashi et al. 2009), ce résultat pose donc question. Il est possible que l'expression résiduelle de DNM1L soit malgré tout suffisante pour le développement fœtal, ou qu'il existe des différences tissu-spécifique/développement spécifiques d'expression et de dégradation de DNM1L (Rosdah et al. 2020). La reconstitution 3D des images de microscopie à fluorescence montre un réseau mitochondrial hyperconnecté dans les fibroblastes de patients par rapport au contrôle. De plus, lors d'un stress mitochondrial, il a été observé chez ces fibroblastes de patients, un défaut de fragmentation contrastant avec l'hyper-fragmentation observée chez les fibroblastes contrôles. Ces résultats confirment d'une baisse d'activité de DMN1L dans les fibroblastes.

Nous avons pu voir qu'il existe un lien ambigu entre les processus de fusion/fission et le métabolisme mitochondrial. Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a pas de données sur l'effet des variants pathogènes de DMN1L sur la phosphorylation oxydative ou le métabolisme énergétique. De ce fait, ces fibroblastes de patients constituent un modèle d'étude intéressant pour creuser les liens entre défaut de fission mitochondrial et fonctionnement mitochondrial. Les premières analyses sur le tissu musculaire et les fibroblastes de cette patiente n'ont pas révélé d'anomalie évidente de l'activité de la chaîne respiratoire. Cependant, il serait intéressant de pousser ces analyses par la mesure du potentiel de membrane et de la production de ROS, mais également d'étudier la variation des différentes constantes énergétiques au cours du temps. En particulier sur des temps de passage tardif, pour tester si un défaut de fission mitochondrial pourrait conduire à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles par ralentissement/inhibition de la mitophagie. Il serait également intéressant d'approfondir l'étude de l'expression des protéines de fusion, puisque les résultats montrent la perte d'isoformes courtes d'OPA1, malgré le fait qu'aucune altération de l'ARNm n'ait été détectée. En effet, en présence combinée d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (antimycine) et de l'ATP synthase (oligomycine), nous n'avons pas observé de fragmentation du réseau chez le mutant Thr59Asn contrairement aux cellules contrôles, néanmoins ce réseau était moins connecté. Une étude plus approfondie pourrait permettre de déterminer si cette modification résiduelle du réseau mitochondrial suite à une inhibition des OXPHOS résulte d'une fission DRP1-indépendante ou encore d'une diminution de la fusion via le processing d'OPA1.

2. Caractérisation des voies d'induction et de résistance à la fission mitochondriale

2.1. La F₀F₁-ATP synthase mitochondriale conditionne la réactivité des mitochondries à la fission

2.1.1. Introduction

Les mitochondries sont des organites à double membrane impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la production d'ATP via la phosphorylation oxydative (OXPHOS), la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. Ce sont des organites extrêmement dynamiques capables de remodeler leur structure interne, leur longueur et de former un réseau interconnecté (Bereiter-Hahn et Vöth 1994). Cette structure mitochondriale dynamique contribue au maintien de l'intégrité mitochondriale, et plus largement de l'homéostasie cellulaire. Les évolutions morphologiques du réseau mitochondrial sont ainsi fortement associées à la division cellulaire, à la différenciation cellule-spécifique, au contrôle qualité mitochondrial et finalement à la mort cellulaire par apoptose. (Archer 2013; Gao et Hu 2021; Hoppins, Lackner, et Nunnari 2007b:200).

La morphologie du réseau mitochondriale est déterminée par l'équilibre dynamique entre la fusion et la fission mitochondriale, cet équilibre entre fusion/fission est sous le contrôle des protéines de la famille Dynamin GTPase (Hoppins et al. 2007b). La protéine DRP1 est responsable de la fission mitochondriale (Smirnova et al. 2001b) ; la fission de la membrane externe est réalisée grâce à la phosphorylation et au recrutement de DRP1 sur des récepteurs de la membrane externe mitochondrial, préférentiellement au niveau de sites de contacts réticulum endoplasmique (RE)-mitochondries, puis les facteurs DRP1 s'assemblent en anneau au niveau du site de fission (Smirnova et al. 2001b). La fusion des mitochondries débute quant à elle par l'interaction des membranes externes mitochondriales grâce aux protéines MFN1/2 qui fusionnent les membranes externes de deux mitochondries, suivie de la fusion des membranes internes grâce à l'action de la protéine OPA1 (Gao et Hu 2021; Kraus et al. 2021; Olichon et al. 2003; Rojo et al. 2002). La protéine OPA1 joue un rôle crucial dans la régulation de la dynamique mitochondriale. En particulier, elle est nécessaire à l'organisation structurelle des crêtes mitochondriales (Cipolat et al. 2006; Frezza et al. 2006). Dans des conditions physiologiques, OPA1 est importée à la mitochondrie et est régulée par des processus protéolytiques réalisés par les protéases de la membrane interne mitochondriale : YME1L et OMA1 (Anand et al. 2014; Baker et al. 2014; Ishihara et al. 2006b). Les formes longues d'OPA1 (L-OPA1) sont liées à la membrane interne et sont nécessaires à la fusion mitochondriale, tandis que les formes courtes solubles (S-OPA1) limiteraient la fusion des membranes internes et favoriseraient la fission mitochondriale (Ishihara et al. 2006b; MacVicar et Langer 2016). L'importance de cet équilibre entre fusion et fission dans l'homéostasie cellulaire est illustrée par le fait que des mutations dans les gènes de ces différents effecteurs sont à l'origine de neuropathies héréditaires telles que l'atrophie optique autosomique dominante (mutation OPA1), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (MFN2) ou encore

l'encéphalopathie EMPF1 (DRP1) (J. Cassereau et al. 2011; Julien Cassereau et al. 2011; Delettre et al. 2000; Keller et al. 2021; Züchner et al. 2004). Dans certaines de ces pathologies liées à une altération de la fusion/fission, il a été montré que les mitochondries présentent également une altération du métabolisme mitochondrial (Bertholet et al. 2016; Chao de la Barca et al. 2016; Chevrollier et al. 2008b), bien que le lien entre morphologie du réseau et altération de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ne soit pas clair dans ces pathologies. La structure et la morphologie du réseau mitochondrial varient selon les types cellulaires ou entre les tissus bien que la connectivité des mitochondries soit généralement favorisée. Cette organisation semble extrêmement sensible aux variations de la disponibilité des nutriments ainsi qu'à un large éventail de stress cellulaires. Aussi, il est probable que cette dynamique soit coordonnée avec l'activité OXPHOS des cellules.

Les réactions de l'OXPHOS sont assurées par les quatre complexes de la chaîne respiratoire et la F₀F₁-ATP synthase, insérés au sein des crêtes de la membrane mitochondriale interne. Leur rôle est de produire de l'ATP à partir d'équivalents réduits, le NADH, H⁺ et le FADH₂. Ceux-ci sont essentiellement produits par le cycle de Krebs dans les mitochondries, bien qu'une partie du NADH soit également produite par la glycolyse dans le cytosol. Les deux molécules sont respectivement oxydées par le complexe I (CI) et le complexe II (CII) de la chaîne de transport d'électrons (ETC). Les électrons sont transportés vers le complexe III (CIII) via le coenzyme Q puis vers le complexe IV (CIV) par le cytochrome c (Cyt C). Ce transport d'électrons est couplé au transfert de protons de la matrice vers la membrane interne mitochondriale par les complexes I, III et IV. Cela conduit à la génération d'une force proton-motrice à travers la membrane interne composée d'un gradient chimique ($\Delta\mu\text{H}$) et un potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi\text{m}$). Les protons retournent dans la matrice mitochondriale via la F₀F₁-ATP synthase, permettant ainsi la synthèse d'ATP. Ce $\Delta\Psi\text{m}$ est finement régulé, il est en effet un paramètre essentiel du fonctionnement mitochondrial, permettant non seulement la synthèse d'ATP, mais également l'import de nombreux métabolites et protéines à la mitochondrie, ou encore la régulation de l'activité de protéases mitochondriales telles YME1L et OMA1 (Anand et al. 2014; Ishihara et al. 2006b; Kaser et al. 2003; Mishra et al. 2014; Rainbolt et al. 2015). Lors du transfert des électrons au sein de l'ETC, une partie de ceux-ci peut directement interagir avec l'oxygène, formant ainsi des anions superoxydes ou ROS. En condition physiologique, cette production reste minime, mais peut être fortement augmentée en cas de dysfonction de l'ETC (Brand 2010, 2016; Rottenberg et al. 2009).

Les études pionnières de Hackenbrock ont révélé que l'ultrastructure des mitochondries est modulée par le métabolisme énergétique, et qu'elles peuvent adopter des conformations très différentes (Hackenbrock et al. 1971). Depuis, de nombreuses études ont montré qu'un « stress » mitochondrial perturbait l'équilibre fusion/ fission et la morphologie des mitochondries (Wai et Langer 2016; Westermann 2012), cependant les données de cette littérature sont relativement contradictoires. Ainsi, des études chez la levure et sur cellules humaines montrent qu'une augmentation forcée de l'activité de la phosphorylation oxydative augmente la fusion des mitochondries (Egner et al. 2002; Jakobs, Martini, et al. 2003; Mitra et al. 2009; Tondera et al. 2009), cependant une fragmentation mitochondriale est également fréquemment observée dans des conditions de demande énergétique accrue (Coronado et al. 2018). A l'inverse, une inhibition de l'activité OXPHOS par traitement pharmacologique n'est pas systématiquement associée à la fragmentation. Chez les mammifères, l'induction de la fragmentation mitochondriale suite à ces inhibitions des complexes de la chaîne respiratoire ou

de la FOF1-ATP synthase semble dépendre du type/modèle cellulaire utilisé (Sauvanet et al. 2010). Une fission accrue a été observée, par exemple, dans les cellules HeLa (Frank et al. 2012; Pletjushkina et al. 2006), les cellules CV1-4A (De Vos et al. 2005) ou les fibroblastes embryonnaires de souris (De Vos et al. 2005). En revanche, certains types cellulaires conservent des mitochondries filamenteuses lors d'une inhibition de la chaîne respiratoire, et le phénotype des cellules présentant un déficit de la chaîne respiratoire est ambigu (Guillery et al. 2008; Sauvanet et al. 2010). En effet, des altérations de la morphologie mitochondriale ont été décrites dans les cultures cellulaires de patients porteur de mutations dans l'une des sous-unités de la chaîne respiratoire, notamment les complexes I ou III ((Benard et al. 2007; Koopman et al. 2005; Pham et al. 2004). Toutefois, il ne s'agit pas d'une observation générale : dans la plupart des modèles cellulaires présentant un déficit de la phosphorylation oxydative d'origine génétique, le réseau mitochondrial n'est pas fragmenté (Guillery et al. 2008; Hanson et al. 2002; Morán et al. 2010; Sauvanet et al. 2010), un phénotype que nous avons également retrouvé sur les fibroblastes de notre bio-collection.

L'induction de la fission pourrait également dépendre de l'intensité de la baisse du potentiel de membrane, attendue en cas de déficit de l'ETC. Dans des conditions de stress comme une baisse du potentiel de membrane mitochondrial, une production d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) élevé, la protéase OMA1 peut être suractivée, ce qui clive massivement OPA1 et favoriserait ainsi la fission (Anand et al. 2014; Baker et al. 2014; Consolato et al. 2018; Ehses et al. 2009; Head et al. 2009; Jang et Javadov 2020). Certains auteurs ont également suggéré que l'intensité du déficit, notamment dans le cas du complexe I, pourrait être associée à des niveaux plus ou moins élevés de ROS, et donc à des altérations plus ou moins prononcées de la morphologie mitochondriale (Koopman et al. 2005). Cependant, dans de nombreux cas, la relation directe entre le niveau de diminution des activités de l'ETC, l'augmentation des niveaux de ROS et la fragmentation mitochondriale ne peut pas être établie (Fernandez Moreira et al., 2007 ; Moran et al., 2010). Enfin, l'induction de la fission pourrait également dépendre du niveau de déficit énergétique (synthèse d'ATP), cependant l'activité de fusion mitochondriale dans les cellules de mammifères peut être observée en l'absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle ou après une réduction significative des niveaux d'ATP cellulaire (Guillery et al. 2008; Hanson et al. 2002).

Aussi, malgré l'accumulation de données sur les acteurs et la mécanistique de la dynamique mitochondriale, le lien entre activité OXPHOS et dynamique mitochondrial reste flou. En particulier, les relations entre dysfonctionnement de l'ETC et induction de la fission mitochondriale, ainsi que les signaux intra-mitochondriaux sous-jacents qui modulent ces processus restent mal compris.

Cette étude vise à clarifier le lien entre l'activité bioénergétique mitochondriale et sa dynamique. Afin de déterminer précisément quel « stress bioénergétique » induit la fission du réseau mitochondrial, nous avons suivi sur des temps précoces, en amont de l'induction de la mitophagie, l'évolution du réseau mitochondrial suite à différentes inhibitions des OXPHOS dans des cellules primaires de peau. Pour clarifier comment la structure tubulaire des mitochondries résiste à la fission, nous avons complété cette analyse par l'utilisation de modèles génétiques de défaut de la FOF1-ATP synthase. Nous montrons le rôle central de la FOF1-ATP synthase dans la résistance à l'induction de la fission, de par son fonctionnement en mode inverse après inhibition de la

chaîne respiratoire. Les mitochondries ont ainsi une capacité de résistance à la fission qui les protège d'une élimination rapide sous stress bioénergétique. L'étude de l'assemblage des complexes a également permis de soulever des hypothèses intéressantes sur le rôle de la dimérisation des FOF1-ATP synthase dans la fission mitochondriale.

1 **Mitochondrial F0F1-ATP synthase conditions the responsiveness of**
2 **mitochondria to fission.**

3
4 Charlène LHUISSIER¹, Valérie DESQUIRET-DUMAS^{1,2}, Anaïs GIRONA¹, Alexia BODIN¹, Jennifer
5 ALBAN², Justine FAURE², Julien CASSEREAU³, Philippe CODRON³, Guy LENAERS¹, Naïg
6 GUEGUEN^{1,2}, Arnaud CHEVROLLIER¹

7
8 1. MitoLab Team, MitoVasc Unit, CNRS UMR6015, INSERM U1083, SFR ICAT, Angers University,
9 Angers, France.

10 2. Departments of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital Angers, Angers, France.

11 3. Laboratoire de Neurobiologie et Neuropathologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers,
12 Angers, France; Univ Angers, Inserm, CNRS, MITOVASC, SFR ICAT, Angers, France.

13
14 **Keywords:** Mitochondrial metabolism, F0F1-ATP synthase, OPA1, mitochondrial membrane potential,
15 mitochondrial dynamics, fusion, fission.

16
17 **Abstract**

18 Mitochondria are tubular structures that fuse or separate, being essential for the cellular distribution of ATP
19 coupled to oxidative phosphorylation (OXPHOS). Many OXPHOS pathologies are associated with
20 mitochondrial damage of structure or function. The cytosolic protein DNM1L is the main factor responsible
21 for the constriction and mitochondrial fission. However, the dynamin GTPase OPA1 plays a major role in
22 inner membrane fusion and fission and is currently the first marker of impaired mitochondrial dynamics. Its
23 activation depends on the mitochondrial membrane potential, which results from the balance between the

24 activity of the respiratory chain that generates the proton gradient and its utilization by F₀F₁-ATP synthase
25 for ATP production. The mitochondrial bioenergetic activity is thought to regulate mitochondrial fission,
26 however the relationship between respiratory chain activity and mitochondrial dynamics is not well
27 understood. Using chemical inhibitors and fibroblast models from patients with rare mitochondrial genetic
28 disorders, we specifically blocked respiratory chain and/or F₀F₁-ATP synthase activity and monitored the
29 response in terms of respiration rates, mitochondrial membrane potential and mitochondrial fission
30 dynamics. Our results showed the existence of safeguard mechanism of the mitochondrial membrane
31 potential implied in fission resistance. The F₀F₁-ATP synthase, by a rapid adaptation of its activity and
32 superstructure to inhibitions of the respiratory chain seems to control mitochondrial fission. By varying the
33 metabolic sources, we further showed an attenuation of this fission resistance, which opens up interesting
34 therapeutic avenues.

35

36 **Introduction**

37 Within most of the cells, mitochondria are organized in tubular networks distributed throughout the
38 cytoplasm. This tubular network undergoes constant remodeling, coexisting with few mitochondria isolated
39 from fission events. Mitochondrial migration allows the ATP distribution to the different cellular
40 compartments and the fusion of mitochondria. A fine balance between mitochondrial fusion and fission
41 events is essential to the mitochondrial DNA distribution and to the quality control of mitochondria, splitting
42 dysfunctional mitochondria elements¹⁻⁴. The Dynamin GTPase DRP1, Mitofusin 1 and 2 (MFN1/2) and
43 Optic Atrophy 1 (OPA1) are the main actors of this dynamic. The cytosolic factor DRP1 is recruited to the
44 outer membrane and promotes mitochondrial tubule constriction and fission by providing constraints to
45 mitochondrial membranes⁵. MFN1 and 2 induce the fusion of adjacent outer mitochondrial membranes⁶,
46 while the fusion of inner membrane involved OPA1⁷. Proteolytic processing of OPA1 contributes to a
47 complex regulation of mitochondrial inner membrane (MIM) organization by shaping mitochondrial cristae
48 junction and cristae remodeling^{8,9}. The long OPA1 isoform (L-OPA1) and the short one (S-OPA1) coexist
49 and their equilibrium is regulated by the action of MIM proteases YME1L and OMA1¹⁰. L-OPA1, bound to
50 the inner membrane, has a main role in MIM fusion, while the S-OPA1 are thought to limit fusion and to
51 promote fission by disrupting the cristae structure¹¹⁻¹³. The S-OPA1 role in mitochondrial fragmentation is

52 shown under excessive OPA1 cleavage when OMA1 is over-activated following of the mitochondrial
53 membrane potential ($\Delta\Psi$) drop ^{10,14-16}.

54 This mitochondrial membrane potential is the result of a complex enzymatic activities where electron
55 transport is coupled to the transfer of protons from the matrix to the inner mitochondrial membrane at the CI,
56 CIII and CIV complexes of the respiratory chain (ETC) ¹⁷. Electrons come from the oxidation of NADH and
57 FADH₂, mainly produced by tricarboxylic acid cycle (TCA) within mitochondria but also by glycolysis in
58 the cytosol. This leads to a proton-motive force Δp across the inner mitochondrial membrane composed of a
59 chemical (ΔpH) and an electrical ($\Delta\Psi_m$) gradient. The protons can then return to the matrix via the F0F1-
60 ATP synthase allowing the synthesis of ATP. This coupling between oxidations at the ETC and
61 phosphorylation at the F0F1-ATP synthase through the Δp is named the oxidative phosphorylation
62 (OXPHOS) ^{18,19}.

63 Many publications have highlighted a strong relationship between cellular OXPHOS activity and the
64 mitochondrial structure and dynamics, but the links between these parameters remain complex and
65 equivocal. In neurological diseases linked to altered mitochondrial dynamics, such as type 2A Charcot-
66 Marie-Tooth disease with pathogenic *MFN2* variants and dominant optic atrophy (ADOA) with pathogenic
67 *OPA1* variants, OXPHOS coupling defect and/or altered ETC activity has been shown in primary fibroblasts
68 from patients, but the relationship with the structure of the network was unclear since only few variants
69 induced a strong mitochondrial network fragmentation ²⁰⁻²³. The reverse link, i.e. the link between OXPHOS
70 activity and network morphology, is not more obvious. In yeast and in human tumoral cell lines, it has been
71 shown that a metabolic orientation towards oxidative phosphorylation increase the fusion of mitochondria ²⁴⁻
72 ²⁷. However, pharmacological inhibition of respiratory chain complexes or F0F1-ATP synthase is not
73 necessary followed by a mitochondrial fragmentation ²⁸⁻³⁰ and nuclear and mitochondrial genetic defects in
74 oxidative phosphorylation subunits rarely show a scattered isolated mitochondrial distribution ³⁰. Therefore,
75 it remains unclear how the mitochondrial fission/fusion balance respond to bioenergetics alteration; this
76 complexity could be, at least in part, linked to the cellular phenotypes, especially primary vs. immortalized
77 cells ^{31,32}, but also to the type of mitochondrial “dysfunction” or “stress”, a generic term that covers different
78 alterations of bioenergetic parameters. Thus, acute or chronic metabolic stresses have been shown to impact

79 the ATP synthesis, the $\Delta\Psi_m$, or the reactive oxygen species (ROS) production, but the metabolic signals that
80 link mitochondrial structure to its functional states is still not fully understood.

81 As mitochondrial fragmentation is considered as a deleterious phenotype, preceding the
82 mitochondrial elimination by mitophagy or cell death by apoptosis, it is essential to better understand the
83 mitochondrial resistance to fission and the sequence of fission events in response to mitochondrial
84 bioenergetics alteration. In contrast to many tumor lines, healthy primary skin fibroblasts use both oxidative
85 and glycolytic metabolisms to sustain their energetic needs³³, fibroblast mitochondria are essentially tubular
86 and connected, and show almost identical mitochondrial membrane potential between cells and along
87 mitochondrial networks ; therefore, these cells represent an adapted model for the study of mitochondrial
88 structure – function relationships. In this study, by focusing on blockages of the mitochondrial respiratory
89 chain, and the ATP synthesis by the F₀F₁-ATP synthase and their consequences on mitochondrial dynamics,
90 we asked how mitochondrial energy balance control their morphology in primary fibroblasts. As Our data
91 detailed the fine coordination between ETC and F₀F₁-ATP synthase to maintain the mitochondrial
92 membrane potential and prevent the mitochondrial fragmentation under energetic stress. In the absence of
93 any respiration and mitochondrial ATP production, our results raise the question of the availability of
94 reduced cofactor essential for respiratory chain activity or the source of ATP essential for F₀F₁-ATPase
95 reverse activity, and at least the question of the threshold of mitochondrial membrane potential below which
96 fission is induced. By using mutated fibroblasts from patients suffering mitochondrial diseases, we
97 strengthened the pivotal role of F₀F₁-ATP synthase in the responsiveness of mitochondria to fission.

98

99 **Materials and Methods**

100 *Cell line*

101 Primary fibroblasts were obtained from skin biopsy from 10 individuals, 3 patients with
102 mitochondrial F₀F₁-ATP synthase deficiency, nuclear types (OMIM #) and 7 healthy controls. Written
103 informed consent was obtained from all participants (Ethics Committee of the Angers University Hospital
104 approval: CPP Ouest II – Angers, France; Identification number: CPP CB 2014/02; Declaration number: DC-

105 2011-1467 and Authorization number: AC-2012-1507). The description of the mutations from each patient
106 and their phenotype are detailed in SI Table 1.

107 *Cell Culture and Cell treatments*

108 Primary human fibroblasts were cultured in 2/3 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM-F12,
109 PAN Biotech, Wimborne, UK), 1/3 Amniomax (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) (final glucose
110 concentration, 2g/l and glutamine, 1mM) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN Biotech,
111 Wimborne, UK), 1mM sodium pyruvate, and 50 µg/ml uridine (Sigma Aldrich, Lyon, France) at 37 °C, 5%
112 CO₂. All experiments were conducted on fibroblast cultures between passages 6 and 25 to avoid artefacts
113 due to senescence³⁴. All fibroblast cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma
114 contamination. Drugs were added to culture medium at concentration giving maximal inhibition of the
115 targeted metabolic at final concentration of 10µM Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP,
116 Sigma Aldrich), 1µM Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, Sigma Aldrich)
117 2.5µM Rotenone (Sigma), 2µg/ml Antimycin A (Sigma Aldrich), 4µg/ml Oligomycin (Sigma Aldrich),
118 30µM BMS-199264 (Sigma Aldrich) (durations of treatment are indicated in the figure legends). All
119 treatments and analyses were performed in cell culture medium, i.e. supplemented with 10% SVF in order to
120 avoid stress-induced SVF deprivation.

121 *Mitochondrial enzymatic activities*

122 The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes were measured at 37°C on a UVmc2
123 spectrophotometer (SAFAS, Monaco, Monaco) in a mitochondrial-enriched fraction from frozen cell pellets.
124 The activities of NADH ubiquinone reductase (complex I, CI), ubiquinol cytochrome C reductase (complex
125 III, CIII), F₀F₁-ATP hydrolase (complex V, CV) and citrate synthase (CS) were measured according to the
126 method described by^{33,35}.

127 *Fluorescence microscopy and mitochondrial morphology*

128 Fibroblasts were seeded in their culture medium with 10% SVF on a two-well or four-well chamber
129 coverslips (Ibidi, Gräfelfing, Germany) at least one day before imaging. Mitochondrial morphology was
130 assessed by staining cells with 100 nM Mitotracker Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 30
131 min at 37°C. For fluorescence imaging, images were acquired with an inverted wide-field microscope

132 ECLIPSE Ti-E (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a 100 oil immersion objective (Nikon Plan Apo100x,
133 Tokyo, Japan, N.A. 1.45) and an Andor NEO sCOMS camera controlled by Metamorph 7.7 software
134 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A precision, piezoelectric driver mounted underneath the objective
135 lens allowed faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. Thirty-
136 five image planes were acquired along the Z-axis at 0.1 mm increments. Imaris 8.0 software (Bitplane,
137 Zurich, Switzerland) was used for 3D processing and morphometric analysis. For mitochondrial network
138 characterization, acquired images were iteratively deconvolved using Huygens Essential software (Scientific
139 Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), with a maximum iteration scored 50 and a quality threshold
140 at 0.01. The cell volume and mitochondrial network were modeled in 3D, and thresholds were defined in
141 order to classify mitochondria depending on their volume : $<5\mu\text{m}^3$ (fragmented), $<20\mu\text{m}^3$ (normal), $>20\mu\text{m}^3$
142 (connected).

143 *Western Blotting and Blue-Native Page*

144 Cellular proteins were solubilized in a Laemmli buffer, and 40 μg was resolved by SDS-PAGE in a
145 8% polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry
146 transfer apparatus (iBlot 2 Dry blotting system, ThermoFisher, France). Mouse anti-OPA1 (BD Biosciences,
147 612607), and Mouse anti-SDHA ([2E3GC12FB2AE2], ab14715, Abcam) primary antibodies were used
148 (dilution at 1:1000). Membranes were then incubated for two hours in the dark, with anti-mouse and anti-
149 rabbit coupled, respectively, with Alexa Fluor 680 and Alexa Fluor 790 dyes (ab186694 and ab186697
150 Abcam, 1:10,000). Membranes were washed twice with TBS 1X–Tween 0.1% and once with TBS 1X.
151 Fluorescence was detected at 700 and 800 nm with an Odyssey XF imaging system (LI-COR Biosciences,
152 Bad Homburg, Germany). Band intensities were quantified with Image Studio software (LI-COR
153 Biosciences, Bad Homburg, Germany).

154 For F0F1-ATP synthase assembly analyses, mitochondria were enriched by using differential
155 centrifugation, according to the method described by ³³. The cell pellets were incubated 10 min on ice with
156 digitonin (4 mg/ml in PBS, v/v; 0.2% w/v). Then, digitonin was diluted by addition of cold PBS (5 v/v).
157 Cells were centrifugated for 10 min, at 10,000 g and 4 °C to recover the mitochondria enriched fraction. The
158 pellet was washed once more in 1 ml cold PBS, centrifuged (10,000g, 4 °C), resuspended at 10 mg/ml in
159 AC/BT buffer (1.5M aminocaproic acid and 75mM Bis–Tris/HCl, pH 7.0, supplemented with Complete

160 Mini Protease Inhibitor (Roche Diagnostics, Stockholm, Sweden)) and kept frozen at -80°C until analysis.
161 For Blue-Native Page analyses, 30 μg of the samples were diluted at 2 mg/ml in AC/BT buffer and
162 mitochondrial membrane proteins were solubilized by incubation with the dedicated detergent for 10 minutes
163 at 4°C : (a) 3g/g protein n-dodecyl β -d-maltoside for preparation of native F₀F₁-ATP synthase and (b) 6 g/g
164 protein digitonin (1.2% w/v) to detect the F₀F₁-ATP synthase higher assembly forms. After centrifugation
165 for 20 min, 20,000g at 4°C , the supernatant was collected, and 5% Serva Blue G dye (Biorad, Marnes-la-
166 Coquette, France) in 1 M aminocaproic acid/50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7 was added (1/20 v/v) prior to
167 loading. The dimer/monomer of F₀F₁-ATP synthase were separated on Native PAGE Novex 3–12% Bis-Tris
168 gels (Invitrogen) for approximately 3 h and transferred on PVDF membranes (GE Healthcare, Velizy-
169 Villacoublay, France) in cold blotting buffer (25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3, 20% methanol).
170 Membranes were hybridized using dedicated monoclonal antibodies (ATP5a (ab110273), ATP5b (ab14730),
171 UQCRC2 (ab14745), SDHA (ab14715), Abcam). Anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-linked secondary
172 antibodies (GE Healthcare, Life Sciences) were used at 1/10,000 and signals were detected using a
173 chemiluminescence system (Super signal® West Femto, Thermo Scientific, #34095) (Thermo Fisher
174 Scientific). Acquisitions were performed using the Odyssey FC imaging system and analyzed using Image
175 Studio™ Lite (LI-COR Biosciences).

176 *Mitochondrial Respiration Rates and mitochondrial membrane potential*

177 Oxygraph-2k equipped with the two-channel O2k-Fluorescence LED2-Module (O2k-Fluorometer,
178 Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) was used to simultaneously monitor both oxygen level and
179 fluorescence. Measurements were performed under atmospheric pressure in the 2.0-ml incubation chambers
180 kept at 37°C by Peltier control. Changes of oxygen concentration over time are monitored with
181 polarographic oxygen sensors; simultaneously with the fluorescence signals for both chambers.

182 Respiration rates on intact cells were measured in cell culture medium on roughly 7.10^6 cells. The
183 analysis started with routine respiration measurement. This respiration does not contain any additional
184 substrates or effectors (cell endogenous respiration, corresponding to the cellular oxidative metabolism).
185 Then, after 3 minutes, Oligomycin (CV inhibitor, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Rotenone (CI inhibitor, 2.5 μM), Antimycin
186 (CIII inhibitor, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), combined Oligomycin/Antimycin or FCCP (carbonyl cyanide p-
187 trifluoromethoxyphenylhydrazone, a mitochondrial uncoupler, 1 μM) were added. All sequence analyses

188 ended by F0F1-ATP synthase inhibition by Oligomycin and FCCP addition to fully uncoupled oxidative
189 phosphorylation and induced mitochondrial membrane full depolarization.

190 Respiration rates on permeabilized cells were measured in respiratory buffer RB (10mM KH₂PO₄,
191 300mM mannitol, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM EGTA and 1 mg/ml serum albumin bovine, pH 7.2).
192 The substrates of complexes I and II were used as follows: first, state 2 (non-phosphorylating) respiration was
193 measured after adding 2.5mM pyruvate and 5mM malate (CI substrates) and 10 mM succinate (Complex II,
194 CII substrate). Then, submaximal ADP concentration (0.5 mM) was added to stimulate ATP synthesis to
195 ~60% of maximal OXPHOS capacity (Desquiret-Dumas et al., 2019). After 3 minutes stabilization,
196 Oligomycin (F0F1-ATP synthase inhibitor, 4 µg/ml), Rotenone (CI inhibitor, 2.5 µM), Antimycin (CIII
197 inhibitor, 2 µg/ml), combined Oligomycin/Antimycin or FCCP (1 µM) were added.

198 Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured simultaneously with oxygen consumption
199 in both intact or permeabilized cells using 0,5 µM final of the membrane potential sensitive probe: TMRM
200 (Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate) (Sigma Aldrich, Lyon, France), a cell-permeant positively
201 charged dye that accumulates within mitochondrial proportionally to the $\Delta\Psi_m$. The Fluorescence-Sensor of
202 the O2k-Fluorescence LED2 module is equipped with Green filter set for TMRM (excitation 525
203 nm/emission filter 580 nm). Calibrations with stepwise additions of 0.125 µM TMRM were carefully
204 performed before and at the end of each experiment to ensure fluorescence conversion into nmol TMRM
205 uptake and signal stability, respectively.

206 *Metabolites measurements*

207 Cells were seeded on a 24-wells cell culture plate at [15 000 cells/well]. One day after cell seeding,
208 ethanol (1/2000) or dedicated inhibitors (Rotenone, Antimycin, Oligomycin or combination of
209 Oligomycin/Antimycin) were added. Cellular glucose consumption and lactate production were determined
210 on cell supernatant after 1 to 6 hours of cell culture on an Architect C16000 apparatus using the Glucose
211 assay for Architect CTM system and the Lactate assay for Architect CTM system (Abbott, Ringis, France).

212 *Statistical Analyses*

213 For each experiment, each control or patient fibroblast cell line were analyzed at least in duplicate
214 (two biological replicates). Results are represented as mean \pm SD. The nonparametric Mann–Whitney test (*
215 symbols) or its version for paired data (Wilcoxon test, # symbols) were used for means comparison

216 (Biostatgv, : <https://biostatgv.sentiweb.fr/> , iPLesp UMR S 1136). All data were considered statistically
217 significant at $p < 0.05$. For the comparison of each mutant fibroblast cell to control cells, the values of mutant
218 cell lines that were beyond ± 2 SD (standard deviation) compared to mean control cells were considered to be
219 different.

220

221 **Results**

222 ***The mitochondrial network connectivity resist to electron transfer chain (ETC) inhibition.***

223 For these analyses, we chose to use a non-immortalized primary cell model, in order to avoid any
224 alteration of cellular metabolism and mitochondrial activities or of mitochondrial dynamics that could be
225 encountered in immortalized or tumor cells lines ³⁶. Fibroblasts energetic metabolism is based on 50%
226 glycolytic activity coupled to 50% oxidative mitochondrial activity with a great cellular homogeneity of the
227 mitochondrial membrane potential unlike most tumor lines as well. Analysis of Primary fibroblast cell lines
228 derived from patients with inherited respiratory chain and F1F0-ATP synthase deficiency resulting from
229 mutations in the nuclear or mitochondrial DNA provide particularly relevant results concerning
230 mitochondrial bioenergetic functions, complexes assembly ^{33,37} and also mitochondrial dynamics ^{20,38}.
231 Interestingly, the mitochondria of these cells form a large set of connected tubular networks (SI figure 1). As
232 others ^{30,39}, our preliminary study of the dynamics of fusion/fission of the network induced by a blockage of
233 mitochondrial respiration and mitochondrial ATP synthesis showed a heterogeneity of the response with
234 either a rapid fragmentation, a progressive network dissociation or a resistance to fission depending on the
235 complex targeted.

236 To better understand the coordination between mitochondrial bioenergetic activity and fission
237 induction, we used well known inhibitors that specifically target 1) on the one hand the electron transport
238 chain (ETC) and thus the oxidations: Rotenone, a specific CI inhibitor, thereby inhibiting NADH oxidation
239 and Antimycin A, a specific CIII inhibitor (Figure 1A), thereby inhibiting both NADH and FADH₂
240 oxidations.; 2) on the other hand, the phosphorylation system by using Oligomycin, a specific F0F1-ATP
241 synthase inhibitor; and the combination of oxidation and phosphorylation inhibitions
242 (Oligomycin/Antimycin : O/A). The inhibitor concentrations were selected as regard to their efficiency to
243 inhibit the mitochondrial complexes activities without inducing abnormal mitochondrial swelling, nor

244 cellular apoptosis (Data not shown). Applied within the cell culture media, these inhibitor concentrations
245 efficiently and durably inhibit the targeted enzyme activities as confirmed by our quantifications one hour
246 after drug application (Figure 1B). As expected, Oligomycin had no effect on complex III activity, nor did
247 Antimycin inhibit F₀F₁-ATP synthase activity, confirming the inhibitor specificity. Also, the double
248 inhibition O/A did not change the degree of complex III or F₀F₁-ATP synthase inhibition.

249 Then we analyzed the evolution of the mitochondrial network by using fluorescent deconvolution
250 microscopy (Kane et al., 2017), in these conditions of ETC or F₀F₁-ATP synthase inhibition. Surprisingly,
251 the inhibition of ETC either by Rotenone (CI), only inhibiting NADH oxidation, or by Antimycin (CIII),
252 inhibiting both NADH and FADH₂ oxidations, did not induce mitochondrial fission (Figure 1C,D). Thus
253 neither pharmacological acute ETC inhibition nor genetic dysfunctions (SI figure 1) show mitochondrial
254 fragmentation. ETC inhibitions rather increased the connectivity of the mitochondrial network, within 2
255 hours after CI inhibition and within 4 hours after CIII inhibition. (Figure 1C-D).

256 A key player of mitochondrial dynamic is the inner membrane localized protein OPA1⁴⁰ and more
257 specifically the equilibrium between long (L-OPA1) and short OPA1 (S-OPA1) forms⁴¹. S-OPA1 generated
258 by proteolysis of L-OPA1 was shown to facilitates mitochondrial fission^{10,42}. In agreement with the analysis
259 of mitochondrial network, we did not observe any L-OPA1 protein cleavage following Rotenone or
260 Antimycin exposure (Figure 1E).

261

262 ***The mitochondrial network fragmentation requires the F₀F₁-ATP synthase inhibition***

263 In contrast to ETC inhibition, the F₀F₁-ATP synthase inhibition by Oligomycin slightly fragmented
264 the mitochondrial network from 6h (Figure 1C-D) whereas L-OPA1 protein is cleaved as soon as 2 to 4
265 hours (Figure 1E) after drug addition, thus preceding mitochondrial fragmentation. Strikingly, conjoint
266 inhibitions of the F₀F₁-ATP synthase and the ETC using both Oligomycin/Antimycine, induced L-OPA1
267 cleavage from 15 min (SI Figure 2), the S-OPA1 being the unique isoform detectable after 1 hour of
268 treatment (Figure 1E). This rapid S-OPA1 accumulation was followed by a faster mitochondrial fission from
269 4h, leading to a massive fragmentation of the network as early as 6h. These data indicate that the inhibition

270 of F0F1-ATP synthase promotes the fission of the mitochondrial network, a combined blockage of ETC and
271 F0F1-ATP synthase accelerates the fission of mitochondria.

272

273 ***Reverse F0F1-ATPase activity participate to the $\Delta\Psi_m$ maintenance and mitochondrial fission resistance***

274 Respiratory chain poisoning through inhibition of electron transfer should decrease the mitochondrial
275 membrane potential ($\Delta\Psi_m$) through inhibition of proton pumping into the intermembrane space. A sustained
276 drop of the $\Delta\Psi_m$ is moreover known to fate the cleavage of L-OPA-1 through OMA1 activation ⁴³.
277 However, L-OPA-1 cleavage was neither observed in the presence of Rotenone nor Antimycin. To go further
278 on this discrepancy, the $\Delta\Psi_m$ and respiration rates were measured simultaneously following Rotenone,
279 Antimycine and Oligomycin addition on the primary fibroblasts under *in situ* conditions (intact cells, Figure
280 2A-B). As expected, F0F1-ATP synthase inhibition by Oligomycin induced a significant hyperpolarization
281 (+225% TMRM uptake after Oligomycin treatment compared to vehicle treatment, $p<0.05$) as Oligomycin
282 inhibits the protons flow back to the matrix through the F0F1-ATP synthase, leading to intra-cristae space H^+
283 accumulation. Also, the mitochondrial uncoupler CCCP completely collapsed the $\Delta\Psi_m$ (Figure 2A),
284 inducing a maximal stimulation of ETC turnover (about 80% increased respiration rate compared to vehicle,
285 $p<0.05$) (Figure 2B). Surprisingly, neither CI nor CIII inhibitions decreased the $\Delta\Psi_m$ (Figure 2A), although
286 both inhibitors did drastically inhibit mitochondrial oxygen consumption, i.e. electron transfer within the
287 ETC (-86% and -85%, for Rotenone and Antimycin, respectively, $p<0.05$, Figure 2B). We rather observed a
288 hyperpolarization with a +98% TMRM uptake after Antimycin treatment compared to vehicle-treated cells,
289 ($p<0.05$) and +113% in Rotenone-treated cells ($p=0.28$). When monitoring the variation of the $\Delta\Psi_m$ over
290 time (Figure 2C), we showed that Antimycin, while immediately inhibiting oxidation rate, did not drop the
291 $\Delta\Psi_m$. Within few minutes a slight hyperpolarization appeared reaching its maximum within 20-25 minutes.
292 Further F0F1-ATP synthase inhibition (Oligomycin Figure 2C) blocked this response in few seconds leading
293 to the drop of the $\Delta\Psi_m$. These results point to the F0F1-ATP synthase as a major player in the maintenance
294 of mitochondrial membrane potential under condition of ETC inhibition.

295 In physiological condition and active oxidative phosphorylation, the proton motive force generated
296 by the respiratory chain complexes fuels ATP synthesis via F0F1-ATP synthase (forward mode). Yet it has

297 been demonstrated in isolated mitochondria that under condition of decreasing $\Delta\Psi_m$, F₀F₁-ATP synthase
298 can also function in its reverse mode, hydrolyzing matrix ATP into ADP and pumping H⁺ across the IMM
299 ⁴⁴.

300 In order to verify if the ATP-hydrolyzing mode of the F₀F₁-ATP synthase was indeed implied in the
301 maintenance of the $\Delta\Psi_m$, we forced the reaction in the forward direction, i.e. ATP synthesis. For this
302 purpose, we permeabilized the fibroblasts by using digitonin, allowing us to control the substrates supply.
303 Analyses were performed in the presence of malate, pyruvate and succinate, permitting a fully operating
304 TCA cycle and the supply in both NADH (CI) and FADH₂ (CII) to the ETC. Then, ADP was added to
305 stimulate ATP synthesis favoring the functioning of F₀F₁-ATP synthase in the forward mode through high
306 ADP/ATP ratio. In this condition, the ETC inhibition by Antimycin (Figure 2D) did not increase the $\Delta\Psi_m$
307 anymore but decreased it (-70% of TMRM uptake after Antimycin treatment compared to vehicle, p=0.07),
308 meaning that there was no more H⁺ flux compensation. Altogether, these results point to the crucial role of
309 the F₀F₁-ATPase in ATP hydrolyzing mode in the maintenance of the mitochondrial membrane potential.

310 To further confirm that the F₀F₁-ATPase activity is implied in the mitochondrial fission resistance,
311 we used BMS-199264 (BMS), which selectively inhibits F₀F₁-ATPase activity without any effect on F₀F₁-
312 ATP synthase activity ⁴⁵. 30 μ M BMS inhibited the F₀F₁-ATPase activity by nearly 75-80% (SI Figure 3).
313 Separately, BMS or Antimycin had no effect on the mitochondrial network (Figure 2F, G). However, when
314 F₀F₁-ATPase activity was inhibited by BMS, Antimycin induced mitochondrial fragmentation (Figure 2G).
315 These data therefore strengthened the link between the reserve mode of F₀F₁-ATPase and the resistance of
316 mitochondrial network to fission.

317

318 ***Genetic F₀F₁-ATP synthase defects sensitizes mitochondria to fission***

319 Then, we used fibroblast patient cells mutated on two different subunits of CV, ATP5G3 and
320 ATP5O, or on the CV assembly factor TMEM70 (table S1) as models of chronic F₀F₁-ATP synthase
321 deficiency.

322 ATP5G3 mutant had a significant decrease of 64% in maximal F₀F₁-ATPase activity while the
323 ATP5O and TMEM70 mutants demonstrated a drastic deficiency, with a residual F₀F₁-ATPase activity of

324 18% and 16%, respectively (Figure 3A). Oxygraphic measurements on intact cells confirmed the significant
325 decrease in the oxidative metabolism (Routine respiration, R, Figure 3B) and nearly 40% decrease of the
326 phosphorylating respiration for the ATP5G3 (R-O, beyond 2 SD to the control mean, Figure 3B), and
327 profound decrease in ATP5O and TMEM70 mutants (-60%, R-O beyond 3 SD to the control mean, Figure
328 3B). The analysis of F0F1-ATP synthase assembly by Blue Native-Page showed a significant, nearly half,
329 decrease in F0F1-F0F1-ATP synthase holocomplex level for ATP5G3, and a major assembly defect in
330 ATP5O and TMEM70-mutant cells. Indeed, in ATP5O mutant cells, BN-PAGE revealed complex V
331 additional bands of lower molecular weight intermediates, corresponding to F1 sub-domains, together with a
332 drastic reduction of the holocomplex level (~80% decrease, Figure 3C-D). TMEM70-mutant cells
333 demonstrated an almost complete absence of the complex V holoenzyme (Figure 3C-D). These different
334 mutants thus model a constitutive, chronic F0F1-ATP synthase defect, with a graduation of the inhibition,
335 from partial (ATP5G3) to profound (TMEM70) (Figure 3E).

336 Mitochondrial network analysis by fluorescence microscopy did not show any significant difference
337 between the different mutants compared to control (ATP5G3: 12.20%; ATP5O: 25.76%; TMEM70: 21.10%
338 fragmented mitochondria (<1 μ m) vs 19.83% for the control, $p=0.28$, Figure 3F). Thus, contrary to acute
339 F0F1-ATPase inhibition by Oligomycin, the fission to fusion equilibrium seems to be either preserve or
340 restore in the cell models of constitutive inhibition.

341 In parallel, the L/S OPA1 ratio was unchanged in ATP5G3 and ATP5O-mutant cells, while in
342 TMEM70 mutant cells a cleavage of the L-OPA1 forms into short S-OPA1 was observed (L/S ratio, Figure
343 3G), although not complete since the long form was still largely detectable. In Routine condition,
344 mitochondrial membrane potential remained relatively maintained in the ATP5G3 and ATP5O mutants, but
345 was significantly decrease in TMEM70 mutant cells (~ -60%, beyond 2 SD to the control mean, Figure 3H).
346 As expected, F0F1-ATP synthase inhibition by Oligomycin, inducing a hyperpolarization in control cells, had
347 no effect on $\Delta\Psi_m$ on the more F1F0-ATP synthase-defective cells, ATP5O and TMEM70 (Figure 3H).

348 We next challenged these rare genetic models to test the role of F0F1-ATP synthase in response to
349 ETC inhibition. Our results showed that the ATP5O and TMEM70 mutants cannot sustain Complex I
350 inhibition by Rotenone with a fragmentation of the mitochondrial network from 4 hours. The effect is even
351 more marked with the complete inhibition of oxidations using Antimycin, showing a massive fragmentation

352 of the mitochondrial network in the three F0F1-ATP synthase mutants (ATP5G3: 55.40%; ATP5O: 62.71%;
353 TMEM70: 59.79% fragmented mitochondria (<1 μ m) with Antimycin vs control: 10.20% with Antimycin,
354 $p < 0.05$) (Figure 4A, B).

355 We then monitored the variation of the mitochondrial membrane potential over time in F0F1-ATP
356 synthase mutants following respiratory chain inhibition. In ATP5O and TMEM70 mutants, not only did
357 Antimycin not induce hyperpolarization, as was observed in CTL cells, but also decreased the $\Delta\Psi_m$. Further
358 Oligomycin addition did not change the $\Delta\Psi_m$ (Figure 4C, D). In the ATP5G3 mutant cells with only partial
359 F0F1-ATP synthase defect, Antimycin only induced a slight increase in the $\Delta\Psi_m$ as compared to control
360 cells, while full F0F1-ATP synthase inhibition by Oligomycin decrease it.

361 This indicate that cell mutant with defect in F0F1-ATPase activity could not correct the H^+ gradient
362 through reverse H^+ pumping following respiratory chain inhibition.

363

364 **Mitochondrial fission resistance relies on glycolytic energetic metabolism**

365 All these data indicate that inhibition of the respiratory chain switches F0F1-ATP synthase to reverse
366 mode, i.e. F1F0-ATPase. This mechanism assumes an ATP supply to the mitochondria, which would then
367 rely on glycolytic energy production.

368 To test this hypothesis, we first assessed the glycolytic metabolism by measuring cellular glucose
369 consumption, lactate production and the glucose conversion to lactate (L/G ratio, Figure 5A, B). Both the
370 respiratory chain and the F0F1-ATP synthase inhibitions stimulated the glycolytic metabolism, as showed by
371 the increases in both the glucose consumption and lactate production. However, glucose consumption was
372 higher in Antimycin-treated cells than Oligomycin or O/A-treated one. All of these inhibitors inhibit
373 oxidative metabolism and oxidative phosphorylation, which means an almost complete dependence on
374 glycolytic metabolism for ATP production, regardless of which inhibitor is used. Therefore, the greater
375 glucose consumption in Antimycin-treated cells strongly suggests an increase in ATP requirements,
376 consistent with ATP consumption by the F0F1-ATPase

377 Secondly, cells were grown in galactose medium (72h) instead of glucose one and analysed the
378 mitochondrial network. Upon conditioning to galactose medium, glycolysis in strongly slow down ^{46,47} and

379 cells shifted their energy dependency towards mitochondrial OXPHOS, with increased oxygen consumption
380 (data not shown). Glucose to galactose replacement slightly decrease the connection of the mitochondrial
381 network in control cells, with a 17% decreased in mitochondria with $>20\mu\text{m}$ length ($p<0.05$, Figure 5B, D).
382 In contrast to glucose condition, in galactose medium, respiratory chain inhibition by Antimycin increased
383 mitochondrial fragmentation (11%, $p<0.05$, Figure 5B, C) at 4H.

384 Thus, inhibition of the respiratory chain with Antimycin strongly increases glycolysis, to higher
385 extend than does mitochondrial ATP synthesis inhibition. Conversely, the slowing down of glycolysis
386 sensitizes mitochondria to the fragmentation caused by inhibition of the respiratory chain. All these data
387 confirm that resistance to fission relies, at least in part, on glycolytic metabolism.

388

389 **F0F1-ATP synthase inhibition alters its supramolecular assembly**

390 It is generally accepted that the drop in membrane potential is a key component of fission induction,
391 associated with OPA1 cleavage. A surprising result of this study is that Oligomycin induces mitochondrial
392 network fragmentation (Figure 1, C, D) and OPA1 cleavage to short isoforms (Figure 1E). According to the
393 chemosmotic theory, F1F0-ATP synthase inhibition, by inhibiting the protons backflow to the matrix, would
394 not depolarize mitochondria, but rather hyperpolarize it. Accordingly, we did not observe any drop in $\Delta\Psi\text{m}$
395 on Oligomycin-treated cells (SI Figure 5).

396 The mitochondrial F0F1-ATP synthase adopts supramolecular structures, mainly in dimeric forms ⁴⁸.
397 The F0F1-ATP synthase supramolecular assembly into dimer and further to oligomers is known to shape
398 mitochondrial cristae ⁴⁹⁻⁵². Moreover, the study by Velours et al. (2009) suggested that supramolecular
399 assembly of the F0F1-ATP synthase is not only an actor of mitochondrial ultrastructure at the cristae level ⁵³
400 but also of the mitochondrial network.

401 We therefore analyzed the dimerization/monomerisation state of F0F1-ATP synthase in cells treated
402 with the different inhibitors by BN-PAGE. IF1 ATPase inhibitor was expressed in fibroblast cells, and
403 interacted with both ATP synthase monomer and dimers. BN-PAGE analyses did not showed any evidence
404 of modification in its expression or interaction with F0F1-ATP synthase in inhibitors-treated cells or in
405 patient cells (Figure 6A, B). In cells treated with Oligomycin, alone or in combination with Antimycin, the

406 ratio of dimer/monomer was significantly higher than in vehicle treated cells, as early as 1 hour of treatment
407 (Figure 6A), without any obvious decrease in the amount of F₀F₁-ATP synthase, estimated by the expression
408 of the ATP5B subunit (SI Figure 6). By contrast, no change in the dimer to monomer ratio was observed
409 following respiratory chain inhibition by Antimycin (alone) or Rotenone. Furthermore, in patient cells with
410 F₀F₁-ATP synthase structural defect, dimer expression and dimer/monomer ratio were decreased (Figure
411 6B). These results indicate a greater supramolecular assembly into dimers, or greater dimer stability,
412 following F₀F₁-ATP synthase inhibition. This F₀F₁-ATP synthase reorganization preceded the OPA1
413 protein cleavage and seems to correlate with the mitochondrial network fission.

414

415 **Discussion**

416 Mitochondria show major morphological changes during the cell cycle ⁵⁴, becoming elongated in
417 senescent cells ²⁶ or fragmenting in apoptotic cells ²⁸. It has become clear that these morphological changes
418 contribute to cellular processes and homeostasis ⁵⁵. Cycles of fusion and fission adapt the morphology of the
419 mitochondrial network to the metabolic needs of the cell and ensure the cellular distribution of ATP ⁵⁶. The
420 fission–fusion cycles are finely balanced to maintain their equilibrium under physiological conditions; both
421 these processes play critical roles in maintaining functional mitochondria: fusion helps mitigate stress by
422 mixing the contents of partially damaged mitochondria, while fission contributes to mitochondrial quality
423 control ⁵⁷. Indeed, one striking feature of the mitochondrial network is that it can rapidly shift from a fused to
424 a fragmented state when cells experience metabolic or environmental stresses, enabling the selective removal
425 of damaged organelles by mitophagy ^{58,59}. Thus, given the links between mitochondrial dynamics and quality
426 control, it is likely that the balance between fission and fusion and lately, mitophagy, is coordinated with
427 cellular OXPHOS activity. However, despite major impairment of OXPHOS activities and mitochondrial
428 damages ^{37,60,61}, cells displaying respiratory chain deficiencies often demonstrate unaltered mitochondrial
429 network ^{29,30} (SI Figure 1). This raises questions about the relationships between OXPHOS activity and
430 mitochondrial fragmentation, the underlying mechanisms and/or how these mitochondria resist to fission. In
431 this study, we focus on the early-stage response of mitochondrial network to alteration of OXHOS. In this
432 purpose, we inhibited the ETC and/or the F₀-F₁ ATP synthase and sequence the fission events following
433 respiration and ATP production arrest. We show that respiratory chain inhibition does not induced fission in

434 primary cells and demonstrate the key role of ATPase activity and supramolecular structure in the
435 responsiveness of mitochondria to fission.

436 Genetic deficiencies of the respiratory chain represent chronic mitochondrial stress models and
437 therefore do not allow the study of the early-stage responses before the setting of mitophagy. Therefore, we
438 first used a pharmacological approach, and followed the mitochondrial dynamics from 15 minutes after ETC
439 inhibition up to 19h. Our findings indicate that the mitochondrial network connectivity resist to electron
440 transfer chain (ETC) inhibition. Indeed, while partial inhibition of mitochondrial oxidations (CI inhibition by
441 rotenone) did not induce mitochondrial fission over the entire time studied, complete inhibition of oxidations
442 eventually induces partial fragmentation, but only at 19h after antimycin treatment. In fact, ETC inhibition
443 did not depolarized and fragmented mitochondria, but rather hyperpolarized and hyperfused it. Thus,
444 pharmacological inhibition of the respiratory chain confirms the data observed in models of genetic defect of
445 the respiratory chain. These results are also in agreement with previous studies which do not show
446 fragmentation of the mitochondrial network following ETC inhibition ^{29,30}. Cellular stress such as starvation
447 or acidosis have previously been shown to increase mitochondrial length ^{31,62,63}. Tondera et al, (2009) also
448 showed that mitochondria form a highly interconnected network in cells exposed to selective stresses, such
449 as serum and amino-acid deprivation. This process was named Stress-induced mitochondrial hyperfusion
450 (SIMH) and would represent an adaptive pro-survival response against stress. SIMH results from activation
451 of mitochondrial fusion activity and requires L-OPA1. Here, we also demonstrate that L-OPA1 is not
452 cleaved upon ETC inhibition. Loss of L-OPA1 isoforms by excessive activation of OMA1 proteases has
453 been shown to be correlated with the drop in mitochondrial membrane potential and to promote
454 mitochondrial network fission ^{28,41,64}. Whether mitochondrial membrane hyperpolarization could promote L-
455 OPA1 stability and increased mitochondrial fusion remains an outstanding question.

456 The mitochondrial membrane potential depends on ETC activity but also on FOF1-ATP synthase
457 function. FOF1-ATP synthase can function as a proton pump using ATP hydrolysis: FOF1-ATPase activity.
458 The hydrolysis of ATP by the F1 part causes the central rod to rotate clockwise, transferring the motion to
459 the F0 part. This rotation results in the pumping of protons from the matrix into the intermembrane space of
460 the cristae ^{45,65}, allowing to maintain a stable mitochondrial membrane potential when this one cannot be
461 sustained by the respiratory chain activity ^{65,66}. Here, we further demonstrated that mitochondrial

462 hyperpolarization upon full ETC inhibition relies on F₀F₁-ATPase activity, this reverse activity of the
463 enzyme further preventing mitochondria from fission. Indeed, 1) upon antimycin inhibition, further blockade
464 of both F₀F₁ ATP synthase and ATPase activities by oligomycin leads to a very rapid cleavage of OPA1
465 followed by a massive fragmentation. 2) In these conditions, the mitochondrial membrane potential is
466 collapsed nearly as much as with CCCP or FCCP uncouplers. 3) The use of a specific inhibitor of ATPase
467 activity, BMS-199264⁴⁵, induced a partially fragmented network in cells with inhibited complex III,
468 supporting the link between ATPase activity and mitochondrial network structure. 4) All these results were
469 further reproduced in genetic models of ATP synthase deficiencies.

470 Our results are in agreement with the study of Forkink et al 2014, which shows in intact HEK293
471 cells that the mitochondrial membrane potential is maintained by F₀F₁-ATPase activity following chronic
472 ETC inhibition. Nevertheless this study did not address the link between F₀F₁-ATP synthase activity and the
473 mitochondrial network structure⁶⁷.

474 ATPase activity is regulated by the factor IF1 (inhibit factor 1); once activated, notably in acidic
475 conditions (pH<6.5) (Cabezón et al. 2000), IF1 binds to the catalytic site of the F₁ domain blocking the
476 rotation of the stem and preventing the hydrolysis of ATP^{68,69}. In primary fibroblast cells that we used, IF1
477 was normally expressed and binds to F₀F₁-ATP synthase, but does not inhibit ATPase activity. We can
478 assume that either IF1 expression is not sufficient in these cells for a complete inhibition of the reverse
479 function of the enzyme, or IF1 is not activated under ETC inhibition; however, our current data do not allow
480 to decipher between these two hypotheses. Studies have reported that IF1 is overexpressed in many cancer
481 cells compared to healthy cells, preventing ATP hydrolysis in those cells with altered mitochondrial
482 functions⁷⁰⁻⁷³. In addition, studies in cancer cells suggest that the mitochondrial network easily undergo
483 fragmentation following respiratory chain inhibition^{28,74-78}. Because cancer cells overexpress IF1, the
484 mitochondrial membrane potential could not be maintained during respiratory chain dysfunction, which
485 would sensitize the mitochondria to fission. This could partly explain the discrepancy of the results in the
486 literature, which should be interpreted regarding the cell types and models, as each primary or
487 immortal/cancer cell line may exhibit unique mitochondrial properties and morphology. Mitochondrial
488 dynamic and its regulation may also strongly depend on culture conditions.

489 Previous studies demonstrated that reverse ATPase activity is supported by the mitochondrial import
490 of ATP produced by glycolytic metabolism^{67,79}. Here, we observed a particular increase in cellular glucose
491 consumption in antimycin-treated cells, overcoming that one found after inhibition of mitochondrial ATP
492 synthesis by oligomycin. Moreover, conditions that force cellular oxidative metabolism while limiting
493 glycolytic capacity induce a decrease in mitochondrial tubulation of fibroblasts and reduce fission resistance
494 following ETC inhibition. Our data thus strongly suggest that mitochondrial resistance to fission through
495 FOF1 ATPase activity is supported by glycolytic metabolism. Primary fibroblasts, cultivated in relative
496 moderate glucose concentration such as in our study, displayed an oxido-glycolytic metabolism and are able
497 to switch from oxidative to mainly glycolytic one according to ETC dysfunction (Leman et al, 2019), which
498 means a high metabolic plasticity. Strikingly, metabolic capacities of different cell or tissue types could
499 constrain the mitochondrial resistance to fission through ATP hydrolysis by FOF1 ATP synthase. Tissues
500 with high oxidative metabolism such as the heart⁸⁰ or neurons⁸¹ could therefore be more sensitive to ETC
501 inhibition and fission than more glycolytic one^{75,82} or encompass higher injury due to ATP hydrolysis⁸³.

502 What has been widely described in the literature is that a drop in mitochondrial membrane potential
503 leads to fission of the mitochondrial network, regardless of the cell type^{10,14,28,41,64}. Most studies therefore use
504 uncouplers such as CCCP to control the network fragmentation^{28,29,74,76,84-86}. We also observe a rapid and
505 massive mitochondrial fission after the drop of the $\Delta\Psi_m$ during a coupled ETC and FOF1-ATP synthase
506 inhibition. Nevertheless, a striking result of this study is that FOF1-ATP synthase inhibition induced, *per se*,
507 a clivage of L-OPA1 into S-OPA1 and a fragmentation of the mitochondrial network without any $\Delta\Psi_m$ drop.
508 On HepG2 cells, Van de Stel et al.⁸⁷ also demonstrated that complex V inhibitors provoked a more
509 fragmented mitochondrial morphology. Inversely, the genetic models of FOF1-ATP synthase defects
510 demonstrated a partial decrease in the mitochondrial membrane potential but do not show any fragmentation
511 of the mitochondrial network, as long as the ETC is not inhibited. Thus, we suggest that the drop in $\Delta\Psi_m$
512 alone cannot induce fission of the mitochondrial network⁸⁷.

513 Mitochondrial ultrastructure and cristae organization also have their own dynamics⁸⁸. Among the
514 principal actors, three main complexes have been described to control cristae biogenesis, curvature and
515 function: OPA1, MICOS and dimers of FOF1 ATP synthase^{85,89,90}. Although mitochondrial fission would
516 depend on the recruitment of the cytosolic factor DRP1, the proteolytic cleavage of the OPA1 protein at the

517 inner membrane and disruption of mitochondria internal organization would also participate to the fission
518 sequence ^{8,9,91}.

519 Analysis of FOF1 ATP synthase distribution by 3D-STORM super-resolution suggests that the
520 dimeric and spatial organization of FOF1-ATP synthase depend on its activity ⁸⁶. Here, we observed a
521 conformational change of FOF1-ATP synthase with an increase/stabilization of the dimer following its
522 inhibition by oligomycin. Morphological changes in isolated mitochondria occur during metabolic changes
523 in *in vitro* experiments. Mitochondria switch between an “orthodox” configuration in non-phosphorylating
524 condition, characterized by small cristae disconnected from each other, to a “condensed” configuration when
525 producing ATP, in which cristae spaces enlarge and appear interconnected ⁹². These changes occur within
526 seconds of the ADP supply to mitochondria ⁹². Since the FOF1-ATP synthase dimer is involved in cristae
527 shaping ^{93,94} and, as shown here, its monomeric/dimeric state depends on its activity, it is tempting to
528 speculate that FOF1-ATP synthase activity, through structural change, control the cristae dynamics. However,
529 whether this mechanism could have a role in fission sensitization has not been evoked. In our cellular models
530 of FOF1-ATP synthase genetic defects, the assembly of the complex is disrupted. Thus, in these cells, FOF1
531 ATP synthase dimers are less present or even almost absent. Concomitantly, mitochondria in these cells do
532 not fragment, despite the inhibition of ATPase activity and their low membrane potential. Therefore, we
533 hypothesize that increased dimerization alter the inner membrane morphology, sensitizing the mitochondria
534 to fission. Thus, a change in activity and conformation of FOF1-ATP synthase would lead to mitochondrial
535 network fragmentation. This hypothesis could explain why patients mutated on the different subunits of
536 FOF1-ATP synthase are not fragmented, accumulating defective mitochondria.

537 The elimination of these accumulated mitochondria in patients is nowadays a therapeutic challenge.
538 Mitochondrial fission is the key step preceding mitophagy. According to our results, FOF1-ATP synthase and
539 its IF1 regulator seem to be good candidates to renew the pool of defective mitochondria by mitophagy.

References

- 540 1. Hoppins, S. *et al.* The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic
541 complexes. *Mol Cell* **41**, 150–160 (2011).
- 542 2. Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062–
543 1065 (2012).
- 544 3. Archer, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl.*
545 *J. Med.* **369**, 2236–2251 (2013).
- 546 4. Gao, S. & Hu, J. Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. *Trends Cell Biol* **31**, 62–74
547 (2021).
- 548 5. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Bliek, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is
549 required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245–2256 (2001).
- 550 6. Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. & Lombès, A. Membrane topology and mitochondrial targeting of
551 mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell. Sci.* **115**, 1663–
552 1674 (2002).
- 553 7. Delettre, C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated
554 in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207–210 (2000).
- 555 8. Cipolat, S. *et al.* Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via
556 OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163–175 (2006).
- 557 9. Frezza, C. *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial
558 fusion. *Cell* **126**, 177–189 (2006).
- 559 10. Anand, R. *et al.* The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial
560 fusion and fission. *J. Cell Biol.* **204**, 919–929 (2014).
- 561 11. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. & Mihara, K. Regulation of mitochondrial morphology through
562 proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* **25**, 2966–2977 (2006).
- 563 12. MacVicar, T. & Langer, T. OPA1 processing in cell death and disease – the long and short of it. *J*
564 *Cell Sci* **129**, 2297–2306 (2016).
- 565 13. Del Dotto, V., Fogazza, M., Carelli, V., Rugolo, M. & Zanna, C. Eight human OPA1 isoforms, long
566 and short: What are they for? *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1859**, 263–269 (2018).
- 567 14. Olichon, A. *et al.* Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and
568 integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743–7746 (2003).
- 569 15. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. OPA1 processing controls mitochondrial
570 fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749–755
571 (2007).
- 572 16. Ehses, S. *et al.* Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease
573 isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* **187**, 1023–1036 (2009).
- 574 17. Zorova, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* **552**, 50–59 (2018).
- 575 18. Brand, M. D. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans*
576 **33**, 897–904 (2005).
- 577 19. Papa, S. *et al.* The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol*
578 **942**, 3–37 (2012).

- 579 20. Chevrollier, A. *et al.* Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect.
580 *Ann Neurol* **63**, 794–798 (2008).
- 581 21. Bertholet, A. M. *et al.* Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal
582 plasticity. *Neurobiol Dis* **90**, 3–19 (2016).
- 583 22. Chao de la Barca, J. M. *et al.* OPA1-related disorders: Diversity of clinical expression, modes of
584 inheritance and pathophysiology. *Neurobiol Dis* **90**, 20–26 (2016).
- 585 23. Cretin, E. *et al.* High-throughput screening identifies suppressors of mitochondrial fragmentation in
586 OPA1 fibroblasts. *EMBO Mol Med* **13**, e13579 (2021).
- 587 24. Egner, A., Jakobs, S. & Hell, S. W. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals
588 structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3370–3375 (2002).
- 589 25. Jakobs, S. *et al.* Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division
590 component Fis1p. *J Cell Sci* **116**, 2005–2014 (2003).
- 591 26. Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial
592 state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,
593 11960–11965 (2009).
- 594 27. Tondera, D. *et al.* SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* **28**,
595 1589–1600 (2009).
- 596 28. Legros, F., Lombès, A., Frachon, P. & Rojo, M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient,
597 requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* **13**, 4343–4354 (2002).
- 598 29. Guillery, O. *et al.* Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary
599 human fibroblasts. *Neuromuscul Disord* **18**, 319–330 (2008).
- 600 30. Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P. & Rojo, M. Energetic requirements and
601 bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 558–565
602 (2010).
- 603 31. Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared
604 from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**, 589–598 (2011).
- 605 32. Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M. & Smeitink, J. A. M. Monogenic mitochondrial disorders.
606 *N Engl J Med* **366**, 1132–1141 (2012).
- 607 33. Desquret-Dumas, V. *et al.* Warburg-like effect is a hallmark of complex I assembly defects.
608 *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 2475–2489 (2019).
- 609 34. Hutter, E. *et al.* Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in
610 primary human fibroblasts. *Biochem J* **380**, 919–928 (2004).
- 611 35. Desquret-Dumas, V. *et al.* Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in
612 NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *J Biol Chem* **288**, 36662–36675 (2013).
- 613 36. Bensinger, S. J. & Christofk, H. R. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin*
614 *Cell Dev Biol* **23**, 352–361 (2012).
- 615 37. Leman, G. *et al.* Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I
616 deficiency. *Int J Biochem Cell Biol* **65**, 91–103 (2015).
- 617 38. Cassereau, J. *et al.* Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in
618 a patient with CMT. *Neurology* **76**, 1524–1526 (2011).
- 619 39. Bulthuis, E. P., Adjobo-Hermans, M. J. W., Willems, P. H. G. M. & Koopman, W. J. H.
620 Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. *Antioxid Redox Signal* **30**, 2066–2109 (2019).

- 621 40. Olichon, A. *et al.* Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance
622 to ADOA pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* **211**, 423–430 (2007).
- 623 41. Wai, T. & Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*
624 **27**, 105–117 (2016).
- 625 42. Cho, B. *et al.* Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for
626 mitochondrial division. *Nat Commun* **8**, 15754 (2017).
- 627 43. Rainbolt, T. K., Saunders, J. M. & Wiseman, R. L. YME1L degradation reduces mitochondrial
628 proteolytic capacity during oxidative stress. *EMBO Rep* **16**, 97–106 (2015).
- 629 44. Tuena Gómez-Puyou, M. T., Martins, O. B. & Gómez-Puyou, A. Synthesis and hydrolysis of ATP
630 by the mitochondrial ATP synthase. *Biochem Cell Biol* **66**, 677–682 (1988).
- 631 45. Grover, G. J. & Malm, J. Pharmacological profile of the selective mitochondrial F1F0 ATP
632 hydrolase inhibitor BMS-199264 in myocardial ischemia. *Cardiovasc Ther* **26**, 287–296 (2008).
- 633 46. Rossignol, R. *et al.* Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in
634 cancer cells. *Cancer Res* **64**, 985–993 (2004).
- 635 47. Marroquin, L. D., Hynes, J., Dykens, J. A., Jamieson, J. D. & Will, Y. Circumventing the Crabtree
636 effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial
637 toxicants. *Toxicol Sci* **97**, 539–547 (2007).
- 638 48. Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J. & Ryan, M. T. Function and regulation of the divisome for
639 mitochondrial fission. *Nature* **590**, 57–66 (2021).
- 640 49. Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. & García, J. J. Structure of dimeric mitochondrial ATP
641 synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl*
642 *Acad Sci U S A* **102**, 12356–12358 (2005).
- 643 50. Anselmi, C., Davies, K. M. & Faraldo-Gómez, J. D. Mitochondrial ATP synthase dimers
644 spontaneously associate due to a long-range membrane-induced force. *J Gen Physiol* **150**, 763–770 (2018).
- 645 51. Eydt, K., Davies, K. M., Behrendt, C., Wittig, I. & Reichert, A. S. Cristae architecture is determined
646 by an interplay of the MICOS complex and the F1F0 ATP synthase via Mic27 and Mic10. *Microb Cell* **4**,
647 259–272 (2017).
- 648 52. Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D. & Kühlbrandt, W. Structure of the yeast
649 F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**,
650 13602–13607 (2012).
- 651 53. Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I. & Brèthes, D. Mitochondrial F1F0-ATP synthase and
652 organellar internal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1783–1789 (2009).
- 653 54. Sesaki, H. & Jensen, R. E. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate
654 mitochondrial shape. *J Cell Biol* **147**, 699–706 (1999).
- 655 55. Adebayo, M., Singh, S., Singh, A. P. & Dasgupta, S. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune
656 balance for cellular homeostasis. *FASEB J* **35**, e21620 (2021).
- 657 56. Mishra, P. & Chan, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* **212**, 379–387
658 (2016).
- 659 57. Ni, H.-M., Williams, J. A. & Ding, W.-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality
660 control. *Redox Biol* **4**, 6–13 (2015).
- 661 58. Twig, G., Hyde, B. & Shirihai, O. S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control
662 axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1092–1097 (2008).

- 663 59. Xian, H. & Liou, Y.-C. Functions of outer mitochondrial membrane proteins: mediating the crosstalk
664 between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Cell Death Differ* **28**, 827–842 (2021).
- 665 60. Gusic, M. *et al.* Bi-Allelic UQCRC1 Variants Are Associated with Mitochondrial Complex III
666 Deficiency, Cardiomyopathy, and Alopecia Totalis. *Am J Hum Genet* **106**, 102–111 (2020).
- 667 61. Brischigliaro, M. *et al.* Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Defects Alter Cellular Homeostasis of
668 Transition Metals. *Front Cell Dev Biol* **10**, 892069 (2022).
- 669 62. Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. Tubular network formation
670 protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S*
671 *A* **108**, 10190–10195 (2011).
- 672 63. Khacho, M. *et al.* Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell
673 survival. *Nat Commun* **5**, 3550 (2014).
- 674 64. Baker, M. J. *et al.* Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-
675 dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J* **33**, 578–593 (2014).
- 676 65. Kubo, S., Niina, T. & Takada, S. Molecular dynamics simulation of proton-transfer coupled rotations
677 in ATP synthase FO motor. *Sci Rep* **10**, 8225 (2020).
- 678 66. Devenish, R. J., Prescott, M. & Rodgers, A. J. W. The structure and function of mitochondrial F1FO-
679 ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**, 1–58 (2008).
- 680 67. Forkink, M. *et al.* Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex I inhibition is sustained
681 by low activity of complex II, III, IV and V. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 1247–1256 (2014).
- 682 68. Pullman, M. E. & Monroy, G. C. A NATURALLY OCCURRING INHIBITOR OF
683 MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. *J Biol Chem* **238**, 3762–3769 (1963).
- 684 69. Esparza-Moltó, P. B., Nuevo-Tapióles, C. & Cuezva, J. M. Regulation of the H⁺-ATP synthase by
685 IF1: a role in mitohormesis. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2151–2166 (2017).
- 686 70. Luciaková, K. & Kuzela, S. Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria.
687 *FEBS Lett* **177**, 85–88 (1984).
- 688 71. Capuano, F., Guerrieri, F. & Papa, S. Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic
689 cell growth. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 379–384 (1997).
- 690 72. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Ríos, E., Rodríguez-Zavala, J. S. & García, J. J.
691 Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with
692 mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J*
693 *Bioenerg Biomembr* **36**, 257–264 (2004).
- 694 73. Solaini, G., Sgarbi, G. & Baracca, A. The F1Fo-ATPase inhibitor, IF1, is a critical regulator of
695 energy metabolism in cancer cells. *Biochem Soc Trans* **49**, 815–827 (2021).
- 696 74. De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J. & Sheetz, M. P. Mitochondrial function and actin regulate
697 dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* **15**, 678–683 (2005).
- 698 75. Barsoum, M. J. *et al.* Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related
699 GTPases in neurons. *EMBO J* **25**, 3900–3911 (2006).
- 700 76. Pletjushkina, O. Y. *et al.* Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim.*
701 *Biophys. Acta* **1757**, 518–524 (2006).
- 702 77. Zhao, J. *et al.* Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells.
703 *Oncogene* **32**, 4814–4824 (2013).
- 704 78. Wan, Y.-Y. *et al.* Involvement of Drp1 in hypoxia-induced migration of human glioblastoma U251

- 705 cells. *Oncol Rep* **32**, 619–626 (2014).
- 706 79. Belous, A. *et al.* Reversed activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator in ischemia-
707 reperfusion. *Transplantation* **75**, 1717–1723 (2003).
- 708 80. Cao, Y.-P. & Zheng, M. Mitochondrial dynamics and inter-mitochondrial communication in the
709 heart. *Arch Biochem Biophys* **663**, 214–219 (2019).
- 710 81. Chandra, R., Calarco, C. A. & Lobo, M. K. Differential mitochondrial morphology in ventral striatal
711 projection neuron subtypes. *J Neurosci Res* **97**, 1579–1589 (2019).
- 712 82. Liot, G. *et al.* Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell
713 death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* **16**, 899–909 (2009).
- 714 83. Grover, G. J. *et al.* Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1FO-
715 ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J*
716 *Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H1747-1755 (2004).
- 717 84. Malka, F. *et al.* Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* **6**, 853–859
718 (2005).
- 719 85. Quintana-Cabrera, R. *et al.* The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP
720 synthase oligomers to safeguard mitochondrial function. *Nat Commun* **9**, (2018).
- 721 86. Salewskij, K. *et al.* The spatio-temporal organization of mitochondrial F1FO ATP synthase in cristae
722 depends on its activity mode. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1861**, 148091 (2020).
- 723 87. van der Stel, W. *et al.* High-content high-throughput imaging reveals distinct connections between
724 mitochondrial morphology and functionality for OXPHOS complex I, III, and V inhibitors. *Cell Biol Toxicol*
725 (2022) doi:10.1007/s10565-022-09712-6.
- 726 88. Wolf, D. M. *et al.* Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane
727 potentials and are functionally independent. *EMBO J* **38**, e101056 (2019).
- 728 89. Faelber, K. *et al.* Structure and assembly of the mitochondrial membrane remodelling GTPase
729 Mgm1. *Nature* **571**, 429–433 (2019).
- 730 90. Hu, C. *et al.* OPA1 and MICOS Regulate mitochondrial crista dynamics and formation. *Cell Death*
731 *Dis* **11**, 940 (2020).
- 732 91. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of
733 molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341–360 (2018).
- 734 92. Hackenbrock, C. R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in
735 mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver
736 mitochondria. *J Cell Biol* **30**, 269–297 (1966).
- 737 93. Cadena, L. R., Gahura, O., Panicucci, B., Zíková, A. & Hashimi, H. Mitochondrial Contact Site and
738 Cristae Organization System and F1FO-ATP Synthase Crosstalk Is a Fundamental Property of Mitochondrial
739 Cristae. *mSphere* e0032721 (2021) doi:10.1128/mSphere.00327-21.
- 740 94. Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M. & Kühlbrandt, W. Dimers of mitochondrial ATP
741 synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 4250–4255
742 (2019).

743 **Figure legends**

744 **Figure 1: ETC inhibition does not induce mitochondrial fission while ATP synthase inhibition does.**

745 Fibroblast cells were treated from 1H to 6H with different inhibitors of the respiratory chain: Rotenone (R:
746 2.5 μ M; CI inhibitor), Antimycin (A: 2 μ g/ml; CIII inhibitor), or F₀F₁-ATP synthase: Oligomycin (O:
747 4 μ g/ml) or Oligomycin coupled to Antimycin (O/A).

748 **(A) Schematic representation of the ETC in mitochondria.** CI, CIII and F₀F₁-ATP synthase are
749 specifically inhibited by Rotenone, Antimycin and Oligomycin, hence their "gray" color.

750 **(B) Effect of respiratory chain inhibition on the enzymatic activity of complexes.** Control human skin
751 cells were treated 1H, either with vehicle (Ethanol, 1/2000) with various respiratory chain inhibitors
752 including Rotenone (2.5 μ M), Antimycin (2 μ g/ml), Oligomycin (4 μ g/ml), and Oligomycin coupled to
753 Antimycin. CI, CIII and ATP synthase activity were normalized to citrate synthase. N=4, each in duplicates,
754 Results are presented as means \pm SEM. *indicates significant difference from Vehicle conditions.

755 **(C) Analysis of the mitochondrial network** observed with the MitoTracker Green probe by fluorescence
756 microscopy. Upper panel: Representative images of the different morphologies of the mitochondrial network
757 observed. Lower panel: Colorimetric representation of the mitochondrial network according to mitochondrial
758 volume, determine using Imaris® software (Bitplane).

759 **(D) Quantification of mitochondrial network.** Each image stack was deconvoluted with Huygens Essential
760 Software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands) which improved the resolution and
761 noise of the images acquired by fluorescence microscopy. The processing of the 3D images and their
762 analysis were performed with Imaris® software (Bitplane). The isosurface module allows to quantify the
763 length of mitochondria in μ m and thus to classify mitochondria by size. The percentage of mitochondria
764 volume thus represents the percentage of mitochondria of $\leq 1\mu$ m (fragmented, in violet), $\leq 20\mu$ m (Normal,
765 in green) and $>20\mu$ m (connected, in red) in an image. N=3, analyses were performed on 12 images on three
766 independent biological replicates. Results are presented as means \pm SEM. * indicates significant difference
767 from control conditions (Veh).

768 **(E) OPA1 protein cleavage.** Analysis of long (L) and short (S) OPA1 isoforms expression. Left panels,
769 representative images of Western blots of OPA1 and SDHA (mitochondrial loading reference) performed on
770 protein extracts from treated-cells. Right panel, Quantification of the L/S ratio is expressed relative to the
771 vehicle. N=5, in five independent biological replicates. Results are presented as means \pm SEM. * indicates
772 significant difference from control conditions (Veh).

773

774 **Figure 2: Mitochondrial membrane potential depends on the inhibited complex.**

775 **(A-E) Measurement of mitochondrial membrane potential and O₂ consumption** determined on the
776 same sample, using fluorescence coupled to oxygraphy after inhibition of the respiratory chain using either
777 Rotenone (R: 2.5 μ M; CI inhibitor) or Antimycin (A: 2 μ g/ml; CIII inhibitor), inhibition of F₀F₁-ATP
778 synthase using Oligomycin (O: 4 μ g/ml; ATP synthase inhibitor), or inhibition of both using Oligomycin
779 coupled to Antimycin (O/A). The CCCP (10 μ M) and FCCP (10M) uncoupler, which dissipates the proton
780 gradient were used as positive controls of mitochondrial depolarization.

781 **(A) Modulation of the mitochondrial membrane potential.** Cells were treated 30 minutes using the
782 different inhibitor, and the TMRM uptake was measured on intact cells.

783 **(B) Measurement of O₂ consumption** performed in parallel on the same samples.

784 **(C) Modulation of the mitochondrial membrane potential and respiration rates over times, performed**
785 **on intact cells.** Intact cells were added to the oxygraphic chambers and mitochondrial membrane potential
786 (inversely proportional to TMRM fluorescence within the medium, black trace) and the corresponding
787 Routine respiration rate (O₂ flux, red trace), were recorded for 5 min. Then, Antimycin was added. After for
788 30 min. recording, Oligomycin was injected. Finally, CCCP was used to fully depolarized mitochondria.
789 TMRM was added at the end of the sequence to control eventual change in fluorescence intensity according
790 to TMRM concentration over time. Left panel: Representative traces, Right panel: Quantification of TMRM
791 uptake. Measurement of O₂ consumption performed intact cells. N=4, each in duplicate, results are
792 presented as means \pm SEM.*p<0.05, Mann-Whitney U test.

793 **(D) Analysis of mitochondrial membrane potential in permeabilized cells.** TMRM uptake was measured
794 on cells were treated 30 minutes using the different inhibitors.

795 **(E) Measurement of O₂ consumption** performed in parallel on the same samples.

796 N=4, each in duplicate. Results are presented as means \pm SEM.*p<0.05, Mann-Whitney U test.

797 **(F) Representative images of the mitochondrial network** morphology observed using the MitoTracker
798 Green probe by fluorescence microscopy in human control cells, treated with O/A 4h, treated with BMS
799 (30 μ M), BMS + R, BMS + A, or BMS + O.

800 **(G) Quantification of mitochondrial volume.** The length of mitochondria in μ m was quantified and
801 mitochondria volume classified by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the
802 percentage of $\leq 1\mu$ m (fragmented, violet), $\leq 20\mu$ m (normal, green) and $>20\mu$ m (connected, red)
803 mitochondria. N=3, analyses were performed on 12 images on three independent biological replicates.
804 Results are presented as means \pm SEM.*p<0.05, Mann-Whitney U test.

805

806 **Figure 3: The F₀F₁-ATP synthase mutants model a constitutive and graduated F₀F₁-ATP synthase**
807 **defect.**

808 **(A) Activity of F₁-ATPase (V)**, normalized to citrate synthase (CS), measured in control cells and on each
809 mutant cells

810 **(B) Measurement of respiration rates on intact control and patient cells.** R: Routine respiration
811 measured in cell culture medium and corresponding to oxidative metabolism. O: non-phosphorylating
812 respiration rate, measured after ATP synthesis inhibition through Oligomycin (4 μ g/ml) addition. F :
813 maximal oxidation capacity, determined after uncoupling through FCCP addition (1 μ M). R-O:
814 phosphorylating respiration rate, i.e. respiration dedicated to ATP synthesis estimated by substraction of the
815 Oligomycin-insensitive respiration from the Routine one. Controls, N=12, patients: analyses were performed
816 on two independent biological replicates, each in duplicate. Results are presented as means \pm SD. * indicates
817 significant difference from Ctrl (value beyond 2 S.D. from controls).

818 **(C) Analysis of mutant ATP synthase assembly by Blue Native-Page and immunoblotting.** ATP synthase
819 level was analyzed by sequential hybridization of ATPVA, ATPVB and SDHA antibodies. Left panel :
820 representative membranes; right panel: quantification of ATP synthase level. Controls, N=5, each in

821 duplicate, patients: analyses were performed on two independent biological replicates, each in duplicate.
822 Results are presented as each patient mean, relative to control cells. * indicates significant difference from
823 Ctrl (value beyond 2 S.D. from controls).

824 **(D) Schematic representation of ATP synthase assembly and activity** in healthy fibroblasts and mutated
825 patients : ATP5G3, ATP5O and TMEM70.

826 **(E) Representative images of mitochondrial network morphology** observed using MitoGreen probe by
827 fluorescence microscopy. (E1) Healthy donor human skin fibroblasts. (E2) ATP5G3 mutated patient, (E3)
828 ATP5O mutated patient, (E4) TMEM70 mutated patient.

829 **(F) Quantification of mitochondrial volume.** The length of mitochondria in μm was quantified and
830 mitochondria volume classified by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the
831 percentage of $\leq 1\mu\text{m}$ (fragmented, violet), $\leq 20\mu\text{m}$ (normal, green) and $>20\mu\text{m}$ (connected, red)
832 mitochondria. Controls, N=3, patient cells: analyses were performed on 12 images on triplicates. Results are
833 presented as each patient mean, relative to control cells. * indicates significant difference from Ctrl (value
834 beyond 2 S.D. from controls).

835 **(G) OPA1 isoforms expression.** Upper panel: representative images of Western blots of OPA1 and SDHA
836 (mitochondrial loading reference) performed on protein extracts from control fibroblast cells and mutant
837 patient cells. Lower panel: Quantification of long (L) and short (S) isoforms of OPA1 and Quantification of
838 the L/S ratio is expressed relative to the control mean. Control cells: N=4. Analysis was performed in
839 duplicate. Results are presented as means \pm SEM. * indicates significant difference from control conditions
840 (value beyond 2 S.D. from controls).

841 **(H) Mitochondrial membrane potential in intact patient cells.** TMRM uptake was measured on control
842 and patients intact cells in Routine condition (R) and in non-phosphorylating condition after F0F1-ATP
843 synthase inhibition by Oligomycin (O). TMRM uptake was normalized to cellular protein concentration
844 within the oxygraphic chamber. Control cells: N=6. Analysis was performed on 3 independent biological
845 replicates. Results are presented as means \pm SEM. * indicates significant difference from control conditions
846 (value beyond 2 S.D. from controls).

847

848 **Figure 4: ETC inhibition decreases mitochondrial membrane potential and induces fission in genetic**
849 **models of F0F1-ATP synthase defects.**

850 **(A) Analysis of the mitochondrial network** observed with the MitoTracker Green probe by fluorescence
851 microscopy. Representative images of the different morphologies of the mitochondrial network observed.
852 Controls and patient fibroblast cells ATP5G3, ATP5O and TMEM70 were treated 4H with Rotenone (R:
853 2.5 μ M) or with Antimycin (A: 2 μ g/ml)

854 **(B) Quantification of mitochondrial volume.** The length of mitochondria in μ m was quantified and
855 mitochondria volume classified by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the
856 percentage of $\leq 1\mu$ m (fragmented, violet), $\leq 20\mu$ m (normal, green) and $>20\mu$ m (connected, red)
857 mitochondria. Controls, N=3, patient cells: in three replicate. Results are presented as mean. * indicates
858 significant difference from vehicle conditions.

859 **(C, D) Measurement of mitochondrial membrane potential** determined by measurement of TMRM
860 uptake. TMRM fluorescence was first measured in Routine condition (R), then 30min after injecting
861 Antimycin (A: 2 μ g/ml), and then after adding Oligomycin (O: 4 μ g/ml; ATP synthase inhibitor). CCCP was
862 used as a control to fully depolarized mitochondria. Results are presented as mean \pm SEM. * indicates
863 significant difference from vehicle conditions.

864

865 **Figure 5: Glycolytic metabolism support the resistance to fission during ETC inhibition**

866 **(A, B) Analysis of the cellular glycolytic metabolism.** Cellular glucose consumption and lactate production
867 were measured in vehicle-treated cells, or after ETC inhibition Antimycin, A, or Rotenone, R), F0F1-ATP
868 synthase inhibition (Oligomycin, O) or both (Oligomycin /Antimycin, O/A). N=4. Results are presented as
869 means \pm SEM.* indicates significant difference from vehicle conditions, # indicates significant difference
870 among inhibitors, Mann-Whitney U test.

871 **(C) Representative images of the mitochondrial network** morphology observed using the MitoTracker
872 Green probe by fluorescence microscopy in human control cells, treated 1H to 6H with Antimycin (2 μ g/ml)
873 in DMEM F12 medium or in Galactose medium.

874 **(D) Quantification of mitochondrial volume.** The length of mitochondria in μm was quantified and
875 mitochondria volume classified by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the
876 percentage of $\leq 1\mu\text{m}$ (fragmented, violet), $\leq 20\mu\text{m}$ (normal, green) and $>20\mu\text{m}$ (connected, red)
877 mitochondria. N=3, in three replicate, results are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, Mann-Whitney U test.

878

879 **Figure 6: Mitochondrial F0F1-ATP synthase supramolecular assembly**

880 **(A) Representative Blue Native PAGE** followed by western blot analysis. Membranes were sequentially
881 hybridized with monoclonal antibodies targeting IF1 α and ATP synthase subunit ATP5B. Experiments were
882 performed on N=4 control cell lines, in duplicate. **Quantifications of the relative immunoblot (ATP5B)**
883 band intensities are provided in the bottom panel. Results are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$, Mann-
884 Whitney U test.

885 **(B) Representative Blue Native PAGE.** Left panel: Membranes were sequentially hybridized with
886 monoclonal antibodies targeting IF1 α and ATP synthase subunit ATP5B. Experiments were performed on
887 N=2 patients cell lines, in duplicate. Right panel: **quantifications of the relative immunoblot (ATP5B)**
888 band intensities are provided in the bottom panel. Results are presented as each patient mean, relative to
889 control cells.

Figure 1

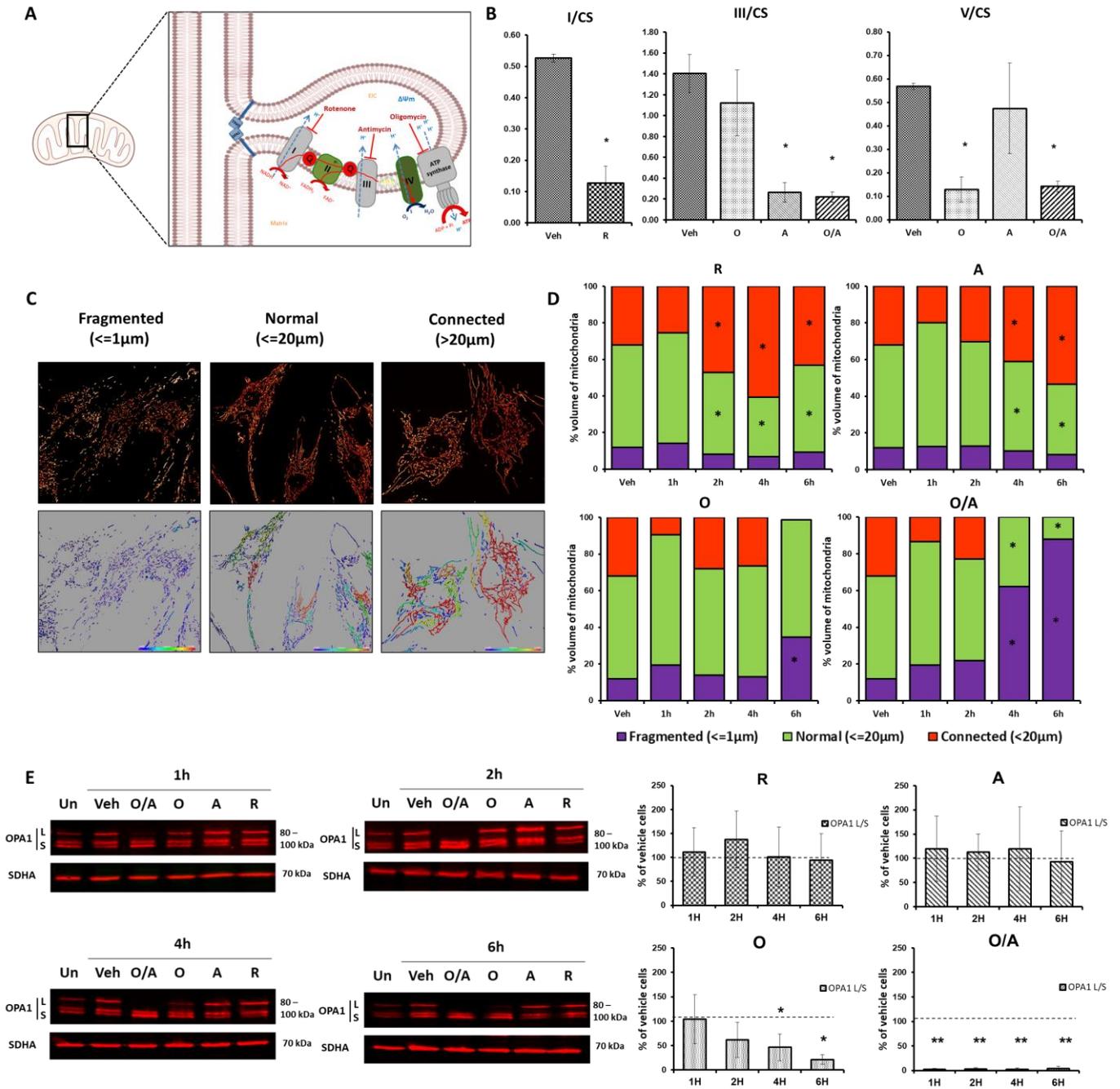


Figure 2

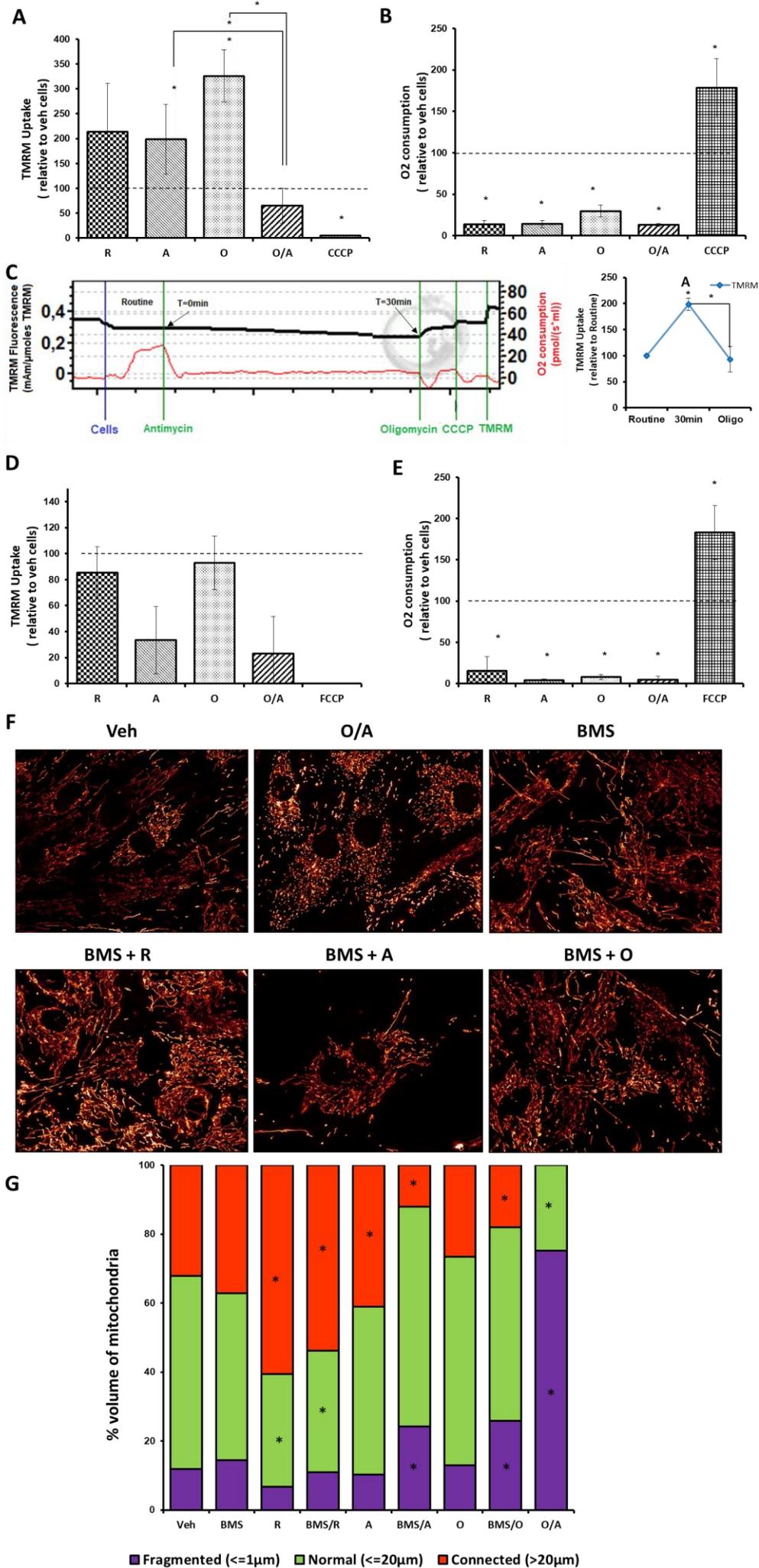


Figure 3

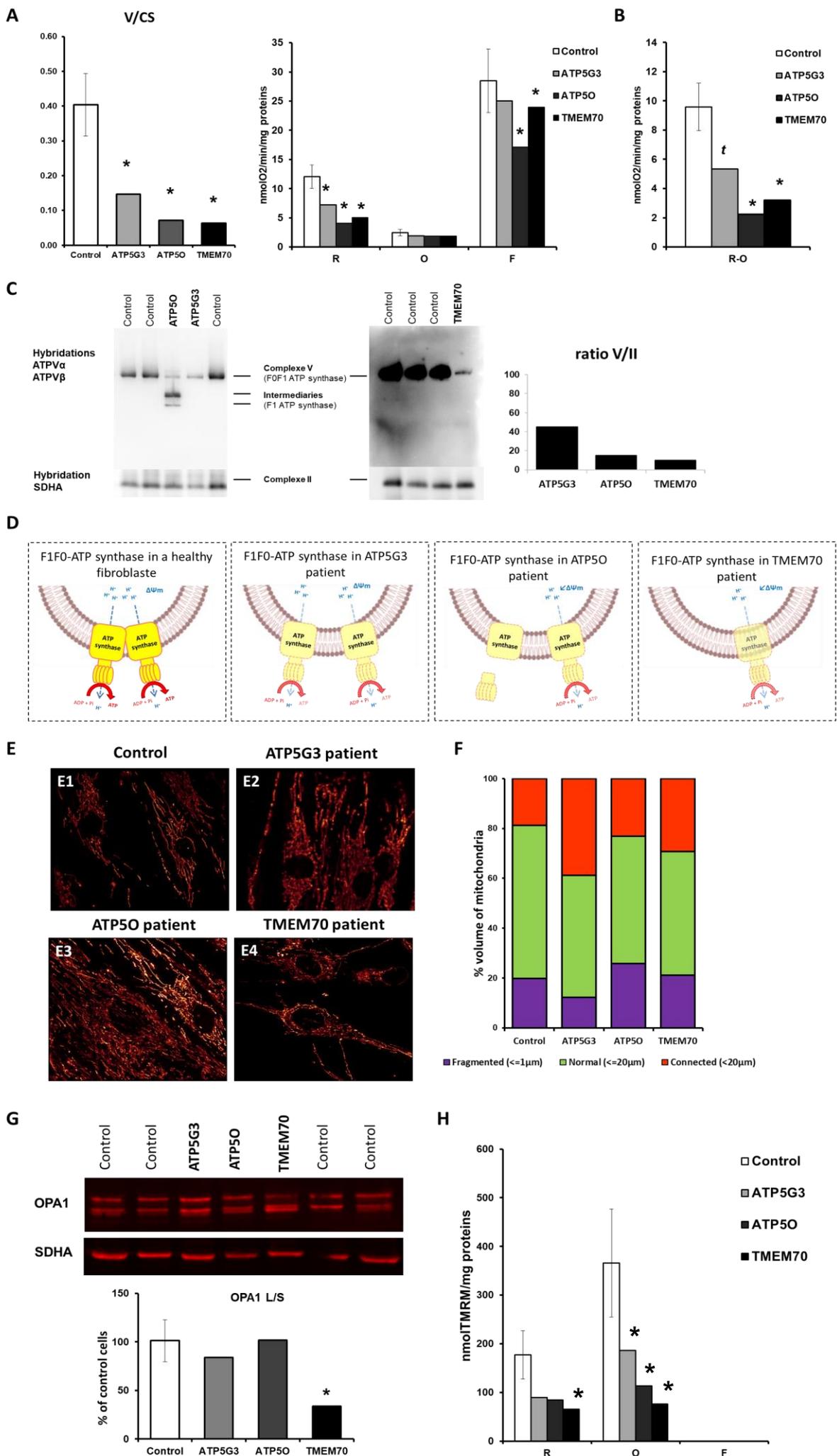


Figure 4

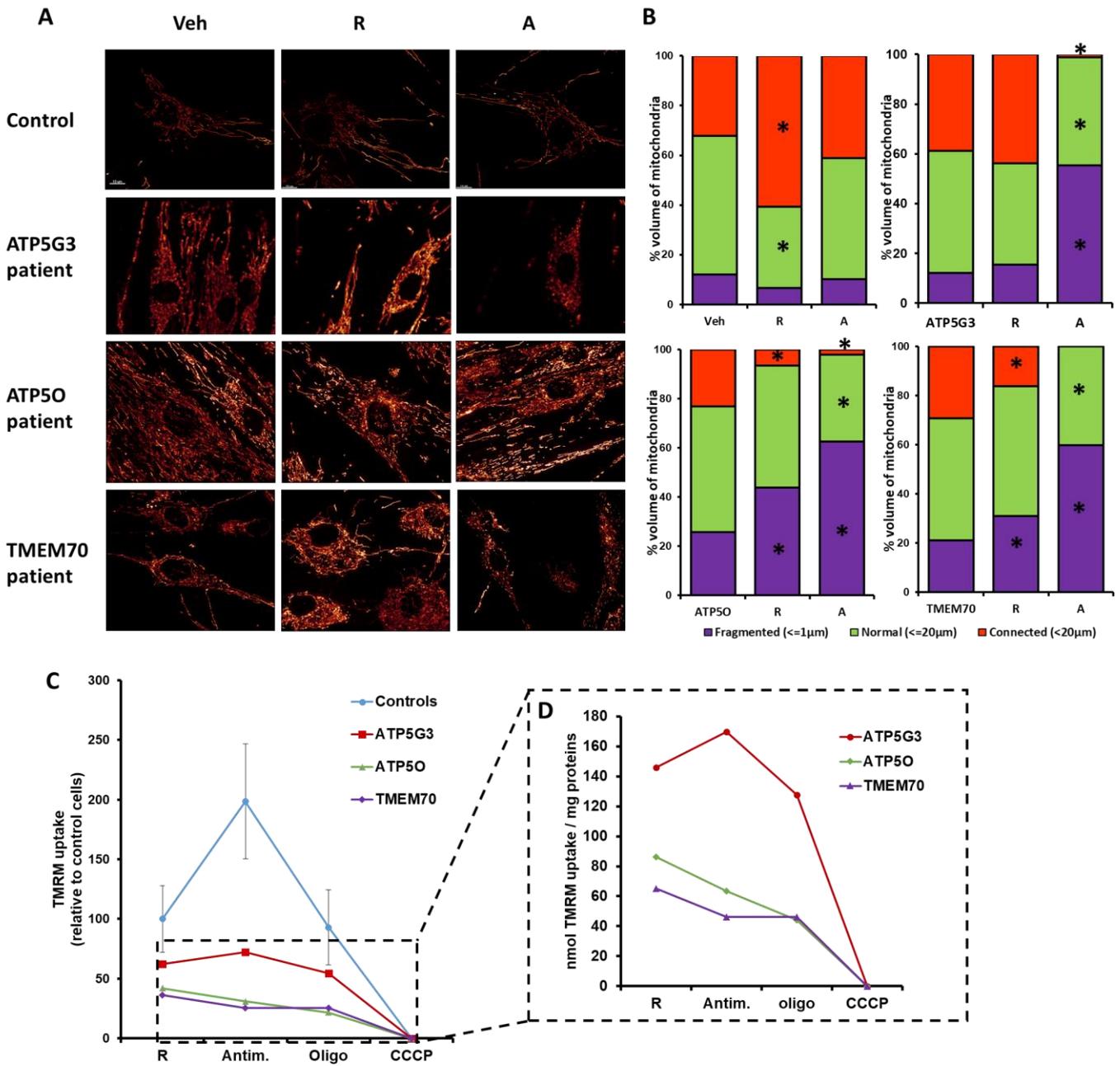


Figure 5

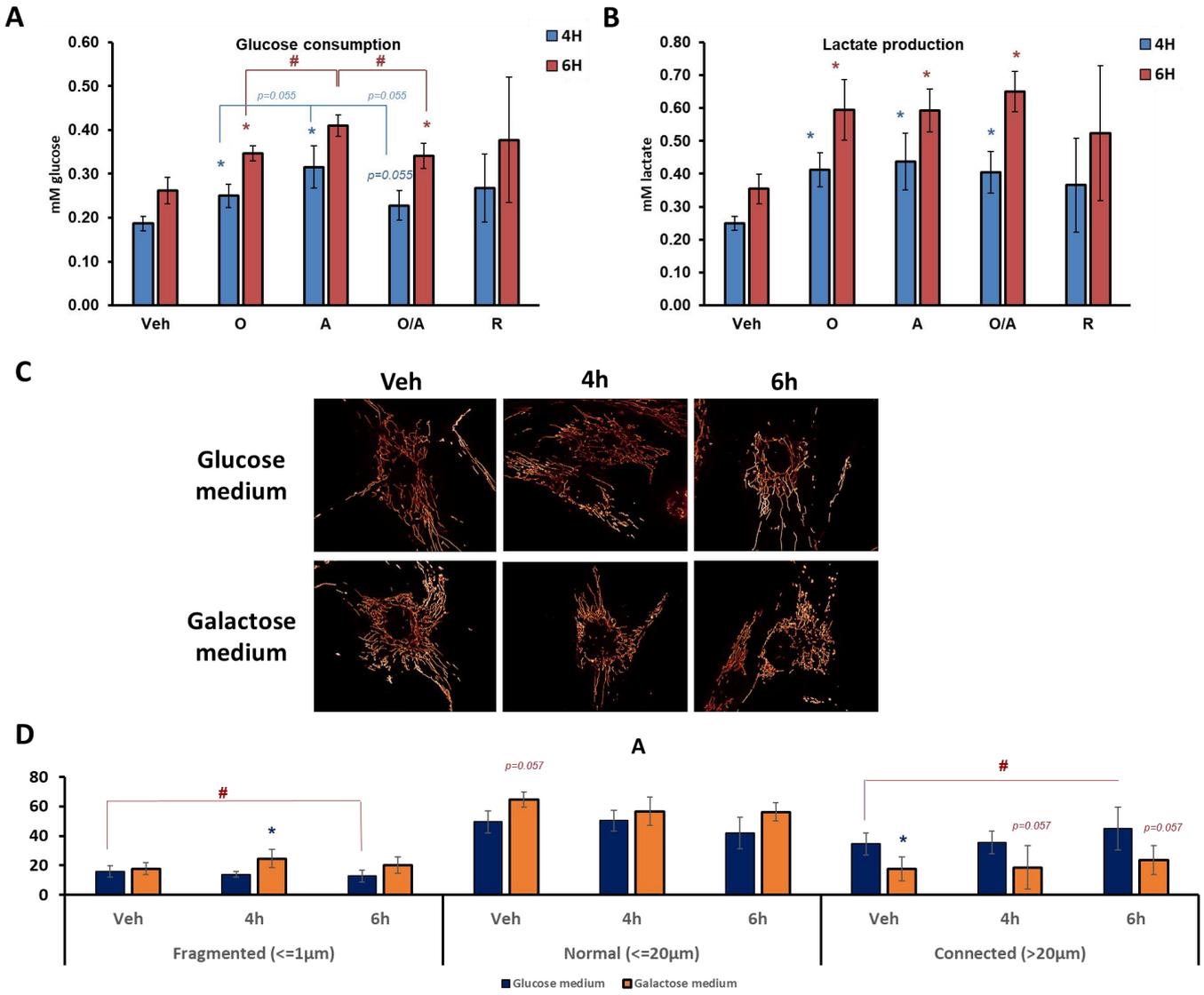
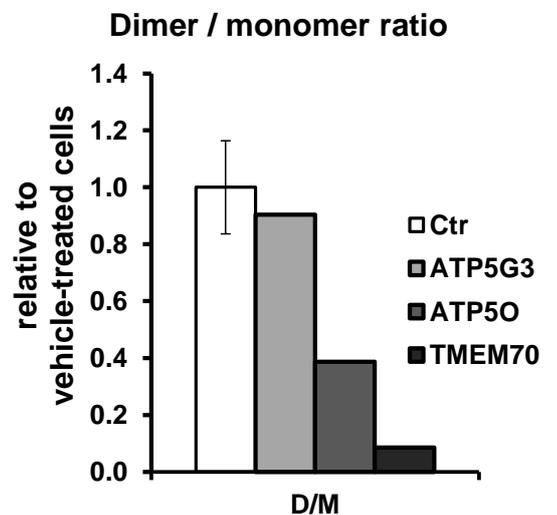
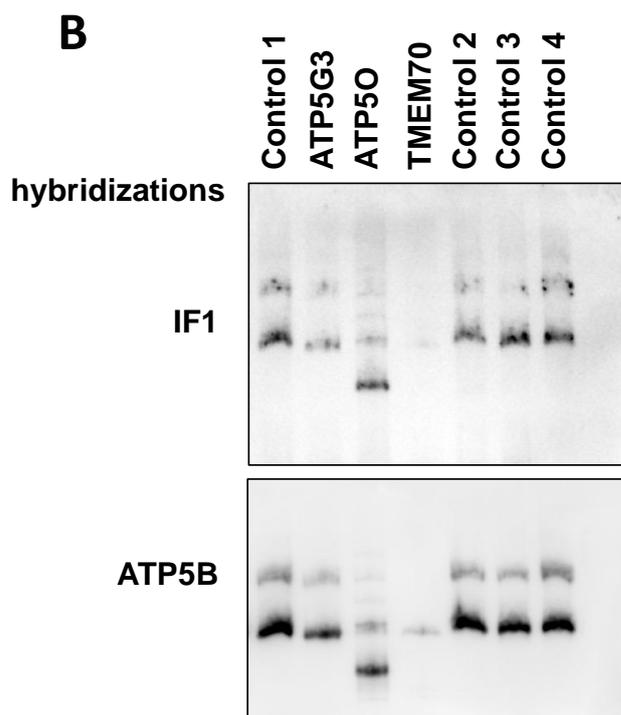
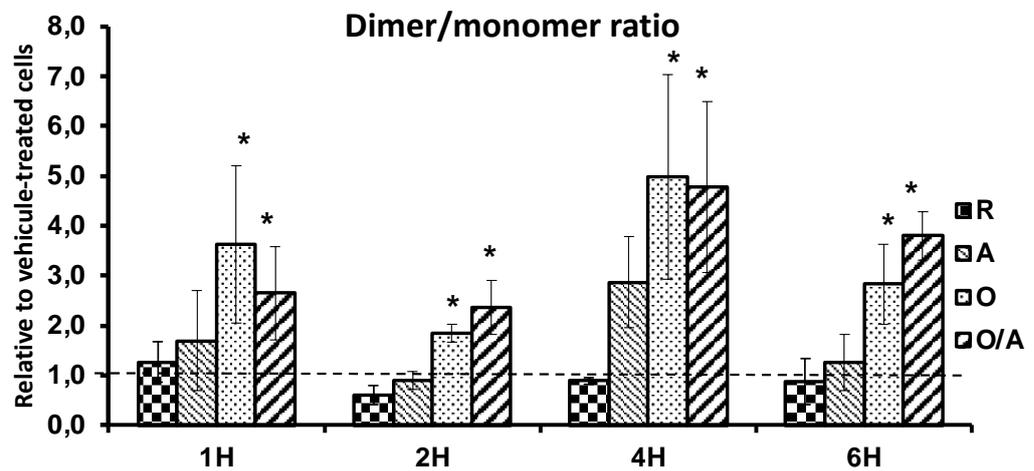
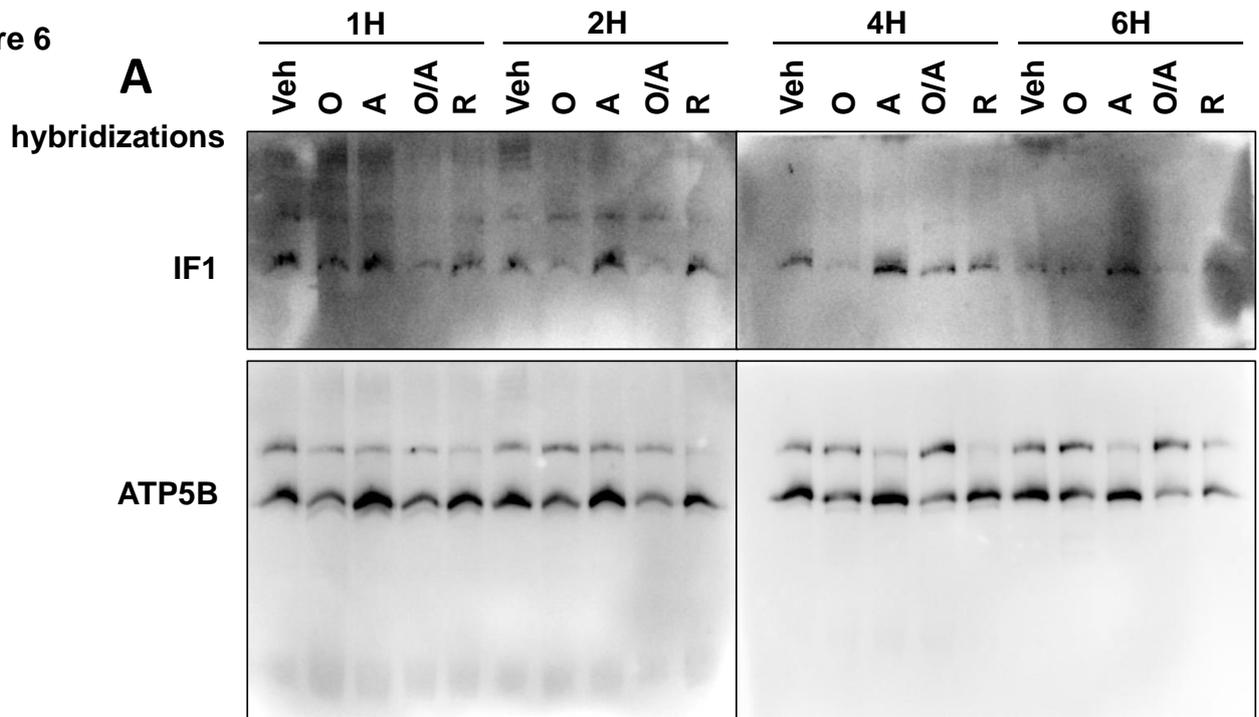
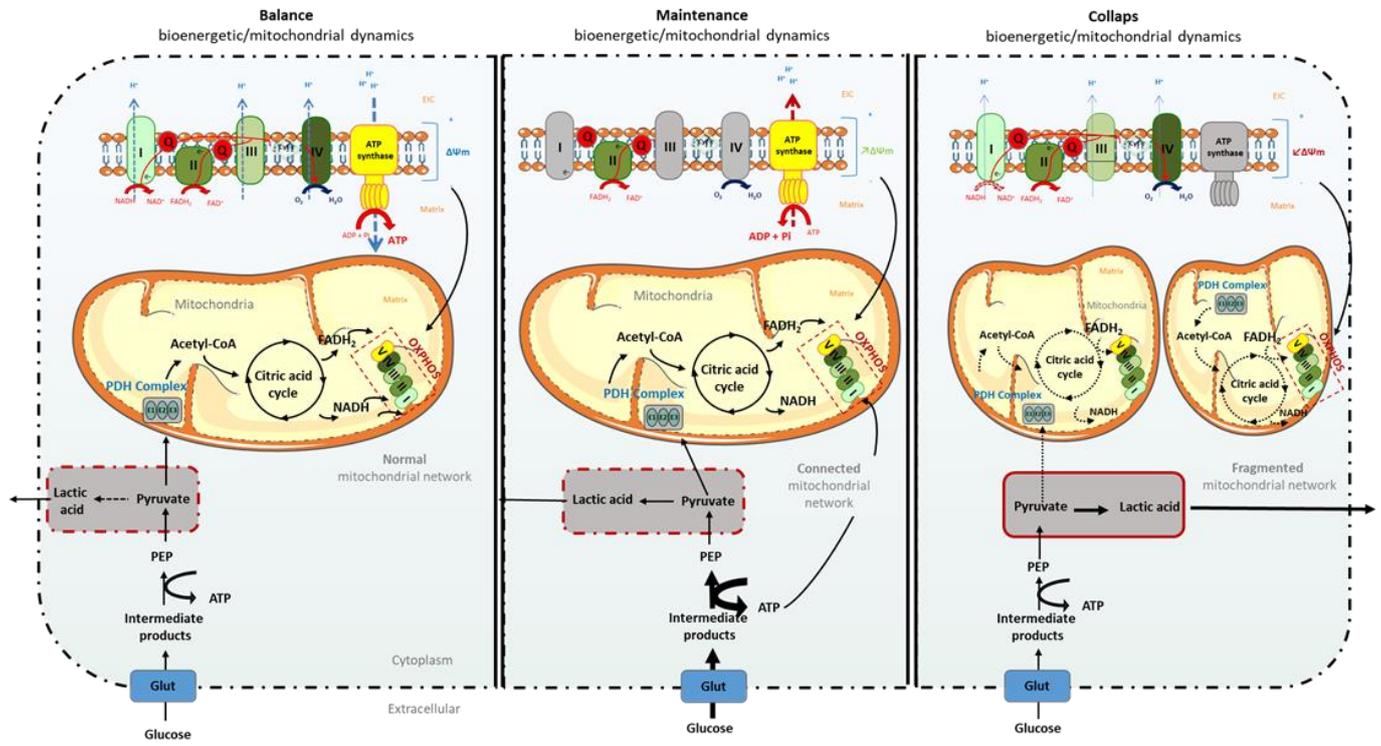


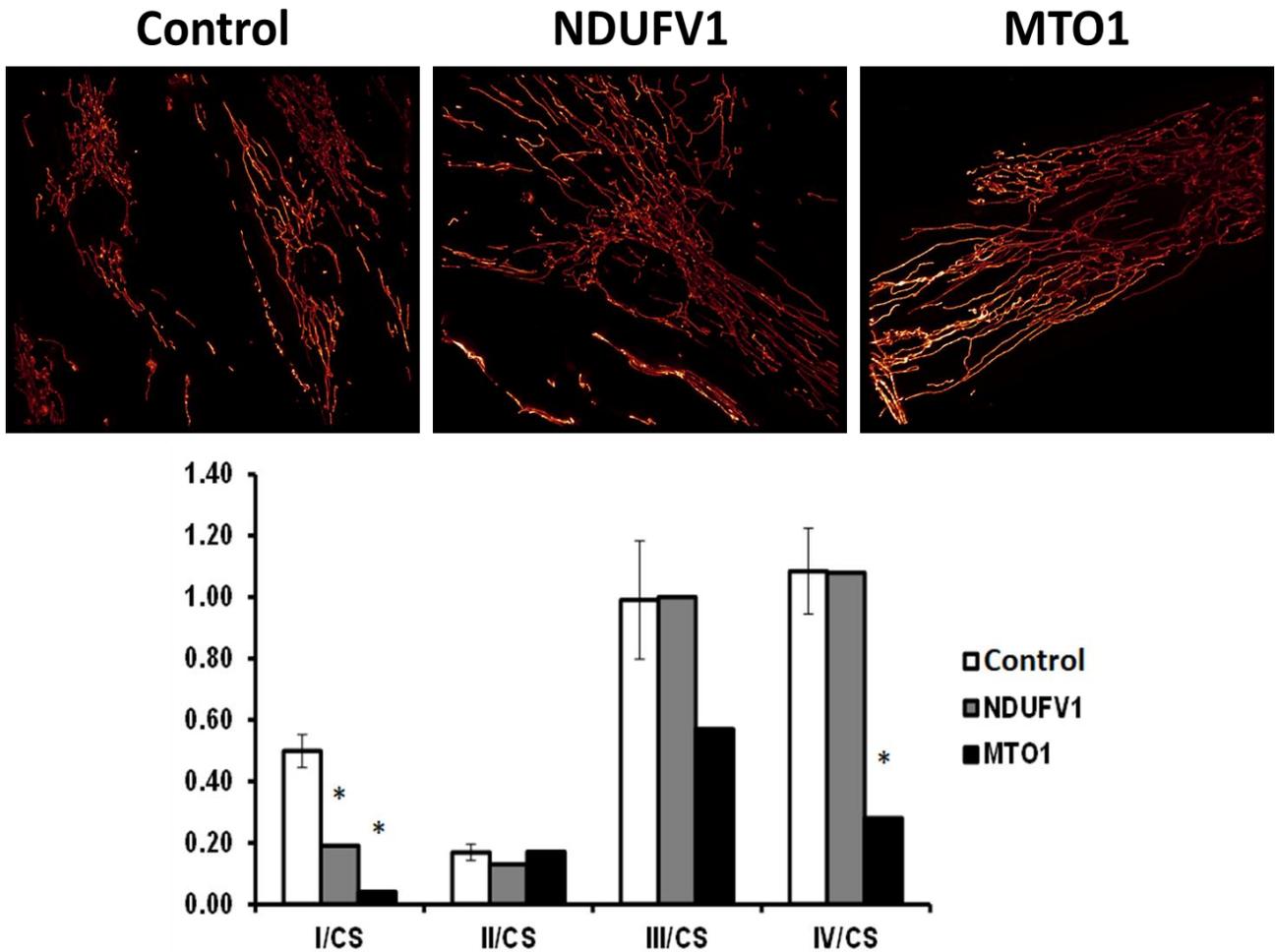
Figure 6



Graphical abstract

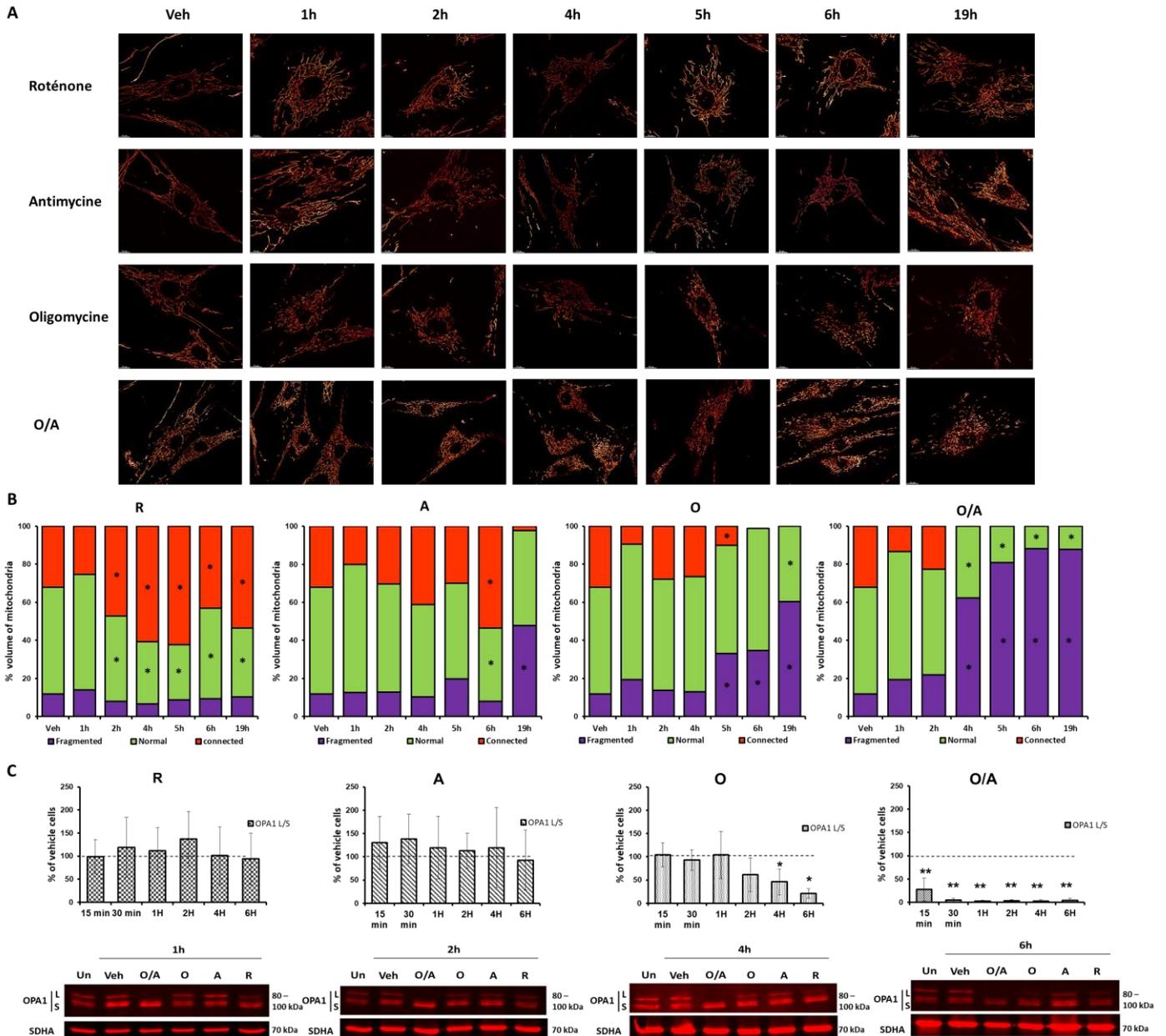


SI Figure 1



SI Figure 1: Mitochondrial network observed with the MitoTracker Green probe by fluorescence microscopy in patient cells with isolated CI deficiency (NDUFV1) and combined CI and CIV deficiencies (MTO1). NDUFV1: NDUFV1, a structural subunit of CI, mutated fibroblast cells. MTO1: mitochondrial translation optimization 1 (MTO1) -mutated fibroblast cells. Upper panel: Representative images of the different morphologies of the mitochondrial network observed. Lower panel: Enzymatic activities of the respiratory chain complexes, normalized to citrate synthase activity. Ctr, N=12. Each measurement was performed on two biological replicates, each in duplicate. Values are represented as a mean \pm SD for control cells. * indicate a significant difference (patient value beyond to SD to the mean compared to Ctr cells). In both mutated cells, despite the ETC defects, the mitochondrial network is

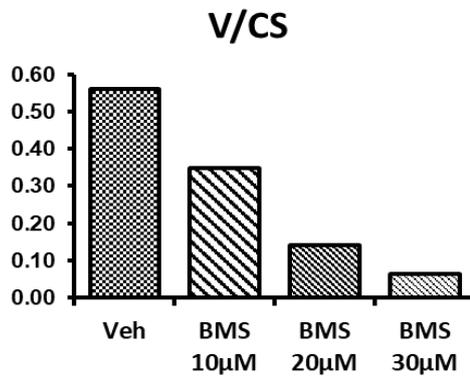
SI Figure 2



SI Figure 2: ETC inhibition does not induce mitochondrial fission ATP synthase inhibition does. Human skin cells were treated from 15min to 19H with different inhibitors of the respiratory chain: rotenone (R: 2.5µM; CI inhibitor), Antimycin (A: 2µg/ml; CIII inhibitor), and F0F1-ATP synthase: oligomycin (O: 4µg/ml) or Oligomycin coupled to Antimycin (O/A).

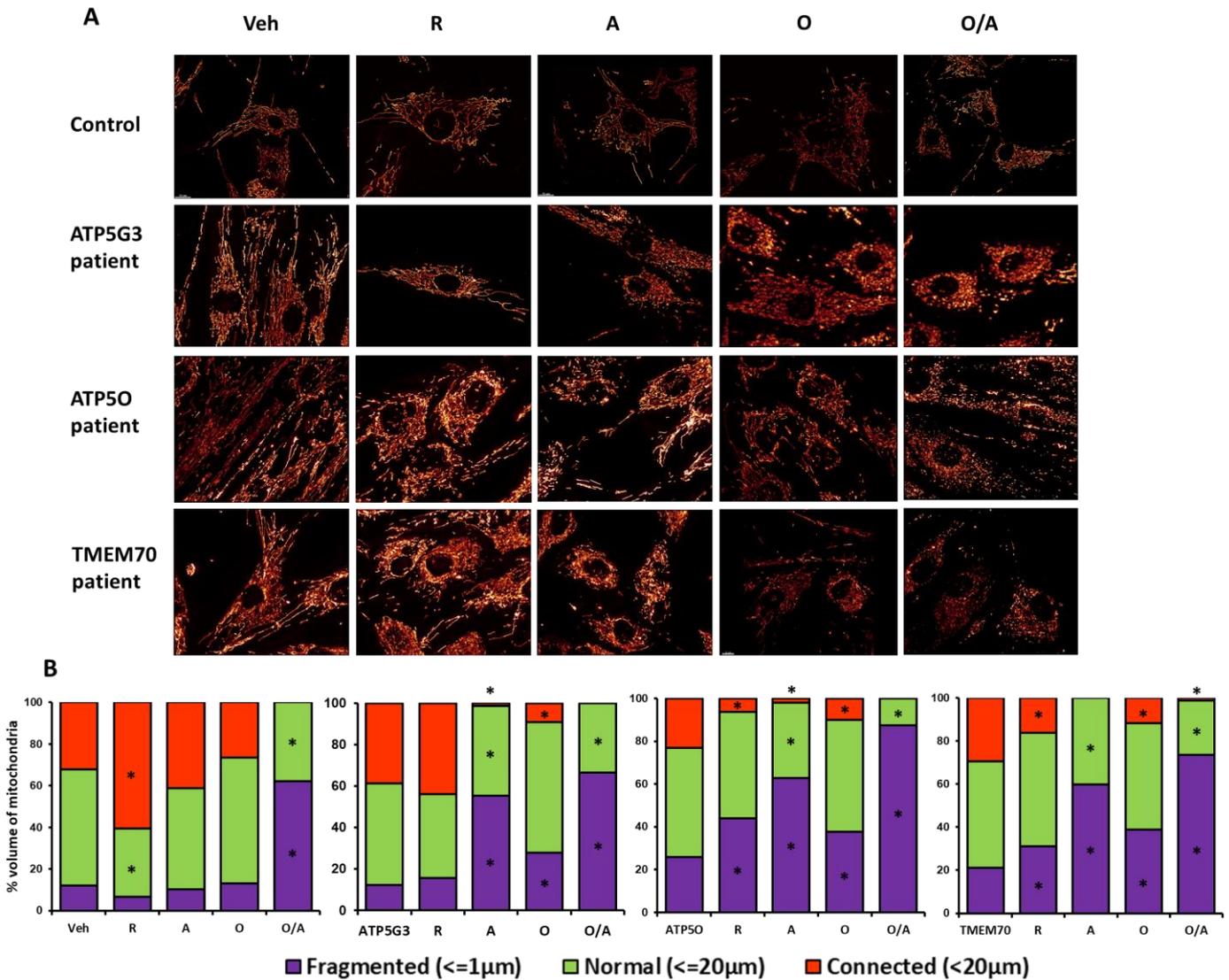
- (A) **Mitochondrial network** observed with the MitoTracker Green probe by fluorescence microscopy. Representative images of the different morphologies of the mitochondrial network observed.
- (B) **Quantification of mitochondrial volume.** Each image stack was deconvoluted with Huygens Essential Software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands) which improved the resolution and noise of the images acquired by fluorescence microscopy. The processing of the 3D images and their analysis were performed with Imaris® software (Bitplane). The isosurface module allows to quantify the length of mitochondria in µm and thus to classify mitochondria by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the percentage of hyperfragmented (<=1µm), normal (<=20µm) and hyperconnected (>20µm) mitochondria in an image, N=3, analyses were performed on 12 images on three replicate. Results are presented as means ± SEM. * indicates significant difference from control conditions (Veh).
- (C) **OPA1 protein cleavage.** Quantification of long (L) and short (S) isoforms of OPA1 and representative images of Western blots of OPA1 and SDHA (mitochondrial loading reference) performed on protein extracts from treated fibroblast cells. Quantification of the L/S ratio is expressed relative to the vehicle. N=5, in five independent biological replicates. Results are presented as means ± SEM. * indicates significant difference from control conditions (Veh).

SI Figure 3



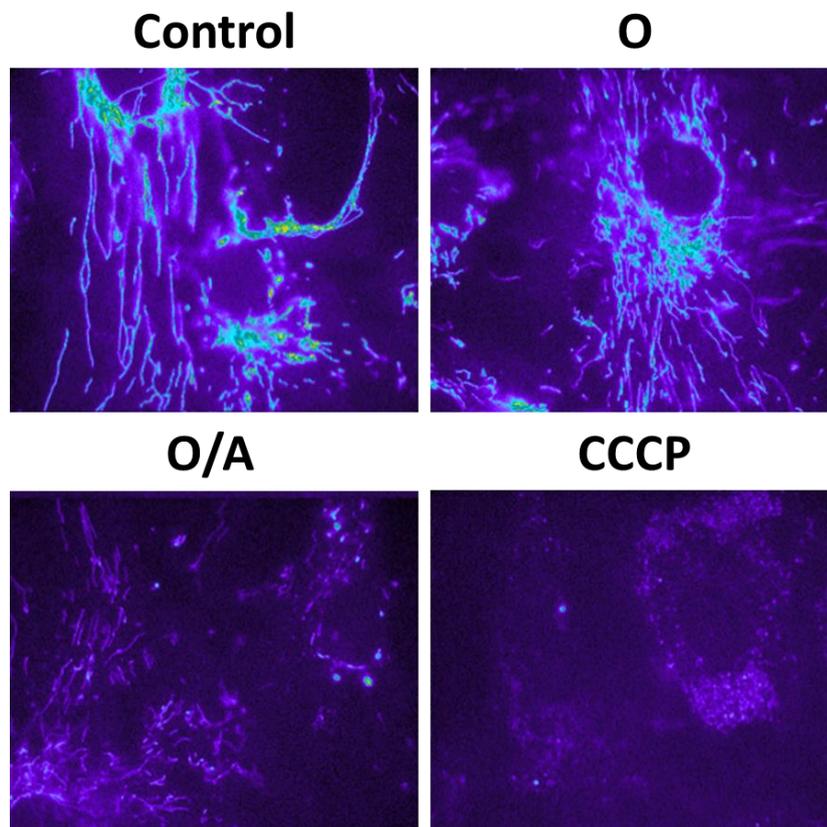
SI Figure 3: Effective dose of BMS inhibiting F0F1-ATPase on human fibroblasts. Activity of mitochondrial F0F1-ATPase (V) normalized to citrate synthase (CS). Human skin cells were treated 4 H with different concentrations of BMS in order to define the effective BMS concentration that inhibit F0F1-ATPase activity.

SI Figure 4



SI Figure 4: ETC inhibition decreases mitochondrial membrane potential and induces fission in genetic models of F0F1-ATP synthase defects. (A-B) control and patient fibroblast cells ATP5G3, ATP5O and TMEM70 were treated 4H with different inhibitors of the respiratory chain (Rotenone, R: 2.5µM or Antimycin, A: 2µg/ml), ATP synthase inhibitor Oligomycin (O: 4µg/ml) or with Oligomycin coupled to Antimycin (O/A).

- (A) **Analysis of the mitochondrial network** observed with the MitoTracker Green probe by fluorescence microscopy. Representative images of the different morphologies of the mitochondrial network observed.
- (B) **Quantification of mitochondrial volume.** The length of mitochondria in µm was quantified and mitochondria volume classified by size. The percentage of mitochondria volume thus represents the percentage of <=1µm (fragmented, violet), <=20µm (normal, green) and >20µm (connected, red) mitochondria. Controls, N=3, patient cells : three replicate. Results are presented as mean. * indicates significant difference from vehicle conditions.



SI Figure 5: Inhibition of F₀F₁-ATP synthase does not decrease the mitochondrial membrane potential.

Mitochondrial network observed with the TMRM probe by fluorescence microscopy in cells treated for 4h with Oligomycin (O: 4µg/ml), Oligomycin (4µg/ml) coupled to Antimycin (2µg/ml, O/A) and CCCP (10µM).

SI Table 1

patient	mutated gene	variant (cDNA)	Zygoty	sex	reference
Ctrl, n = 7				3M, 2F	
ATP5G3	<i>ATP5MC3</i>	c.236G > T, p.Gly79Val	heterozygous, de novo	M	Zech et al., 2021
ATP5O	<i>ATP5PO</i>	c.87+3A > G	homozygous	M	Ganapathi et al., 2022
TMEM70	<i>TMEM70</i>	c.317-2A > G	homozygous	F	

SI Table 1: Primary skin fibroblasts of healthy controls and patients with mitochondrial F0F1-ATP synthase deficiency.

2.1.2. Résultats

Afin de mieux comprendre la relation entre activité bioénergétique et induction de la fission mitochondriale, nous avons utilisé des inhibiteurs connus qui ciblent spécifiquement 1) d'une part la chaîne de transport d'électrons (ETC) et donc les oxydations : la Roténone, (inhibiteur spécifique du Complexe I, CI), inhibant ainsi l'oxydation du NADH et l'Antimycine A (inhibiteur spécifique du Complexe III, CIII), inhibant ainsi les oxydations du NADH et du FADH₂. ; 2) d'autre part, le système de phosphorylation en utilisant l'Oligomycine (inhibiteur spécifique de la F₀F₁-ATP synthase) ; 3) les oxydations et la phosphorylation (Oligomycine/Antimycine : O/A). Nous avons choisi d'utiliser un modèle cellulaire primaire non immortalisé, des fibroblastes de peau, afin d'éviter toutes dérégulations du métabolisme cellulaire et mitochondriale ou de la dynamique mitochondriale qui peuvent être rencontrées dans des lignées cellulaires immortalisées ou tumorales (Bensinger et Christofk 2012). L'efficacité des inhibiteurs a été contrôlée par le dosage de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire et/ou de la F₀F₁-ATP synthase.

L'analyse par microscopie du réseau mitochondrial montre que ni l'inhibition pharmacologique aigue de l'ETC par la Roténone ou l'Antimycine, ni les dysfonctionnements génétiques de l'ETC ne fragmentent le réseau mitochondrial. Nous n'avons plus observé aucun clivage de la protéine OPA1-L après exposition à la Roténone ou à l'Antimycine. Contrairement à l'inhibition de l'ETC, l'inhibition de la F₁F₀-ATP synthase par l'Oligomycine fragmente légèrement le réseau mitochondrial et la protéine OPA1-L se trouve clivée. De manière très intéressante, l'inhibition conjointe de l'ETC et de la F₁F₀-ATP synthase par l'Oligomycine et l'Antimycine conduit au clivage précoce de la protéine OPA1-L, suivie d'une fragmentation massive du réseau mitochondrial. Ceci suggère que l'inhibition de la F₀F₁-ATP synthase favorise la fission du réseau mitochondrial, de plus, un blocage combiné de l'ETC et de la F₀F₁-ATP synthase accélère la fission des mitochondries. De façon surprenante, nous avons montré grâce aux mesures simultanées du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et de la respiration, que 1) l'inhibition de la F₀F₁-ATP synthase induit une hyperpolarisation ; 2) ni l'inhibition du complexe I ni celle du complexe III ne diminue le $\Delta\Psi_m$, bien que la respiration mitochondriale soit bien inhibée, mais au contraire induit également une hyperpolarisation ; 3) une inhibition supplémentaire de la F₀F₁-ATP synthase entraîne la chute du $\Delta\Psi_m$. Ces résultats suggèrent que la F₀F₁-ATP synthase est un acteur majeur dans le maintien du potentiel membranaire mitochondrial sous condition d'inhibition de l'ETC. L'analyse du $\Delta\Psi_m$ sur cellules perméabilisées, permettant de forcer la synthèse d'ATP, montre que dans ce cas, le $\Delta\Psi_m$ n'est plus maintenu en cas d'inhibition de la chaîne respiratoire. Ces résultats pointent vers un mécanisme de fonctionnement réverse de la F₀F₁-ATP synthase, soit une hydrolyse de l'ATP couplée à un pompage de protons vers l'espace intermembranaire. De plus, l'inhibition spécifique de cette activité réverse F₁F₀-ATPase par le BMS-199264 (BMS) confirme que dans ce cas, l'inhibition de l'ETC par l'Antimycine induit une fragmentation du réseau mitochondrial. L'ensemble de ces données indiquent ainsi qu'en cas d'inhibition aigüe de la chaîne respiratoire, la F₀F₁-ATP synthase bascule rapidement en mode réverse, hydrolysant l'ATP pour maintenir, et même hyperpolariser, le $\Delta\Psi_m$, protégeant ainsi le réseau mitochondrial de la fission. Cette consommation accrue en ATP serait supportée par une production énergétique glycolytique. En effet, la mesure de la consommation de glucose ainsi que la production de lactate suggèrent une augmentation des besoins en

ATP suite à l'inhibition du CIII, ce qui peut correspondre à une consommation d'ATP par la F₀F₁-ATP synthase. De plus, dans des conditions de culture en milieu galactose, forçant le métabolisme mitochondrial, les cellules sont plus sensibles à la fragmentation du réseau mitochondrial en présence d'inhibiteur de l'ETC.

L'utilisation des cellules de patients fibroblastes mutées sur deux sous-unités différentes de la F₀F₁-ATP synthase, ATP5G3 et ATP5O, ou sur le facteur d'assemblage de la F₀F₁-ATP synthase : TMEM70, comme modèles de déficit chronique de la F₀F₁-ATP synthase, nous a permis de confirmer le rôle majeur de la F₀F₁-ATP synthase dans la résistance à la fission suite à une inhibition de la chaîne respiratoire. En effet, l'inhibition de l'ETC par la Roténone et l'Antimycine induit une fragmentation du réseau mitochondrial. De plus, la mesure du $\Delta\Psi_m$ suite à une inhibition de l'ETC n'a pas montré d'hyperpolarisation. Ces données indiquent que ces cellules mutantes qui ont un défaut d'activité de la F₀F₁-ATP synthase n'ont pas pu maintenir le $\Delta\Psi_m$, ce qui renforce d'autant plus le lien entre le mode de réserve de la F₀F₁-ATPase et la résistance du réseau mitochondrial à la fission.

Étonnamment, en condition basale, bien que ces cellules mutantes présentent une inhibition constitutive de la F₀F₁-ATP synthase, le réseau mitochondrial n'est pas altéré. Nous montrons également par Western-Blot que le rapport L/S OPA1 reste inchangé chez les mutants ATP5G3 et ATP5O, tandis que chez le mutant TMEM70, un clivage incomplet de la protéine OPA1-L en OPA1-S a été observé. Ainsi, ces cellules ne miment pas tout à fait les effets induits par inhibition pharmacologique de la F₀F₁-ATP synthase par l'oligomycine (clivage d'OPA1 dès 4H et fission du réseau à 6H), alors même que le $\Delta\Psi_m$ est significativement diminué chez les mutants ATP5O et TMEM70. La chute du $\Delta\Psi_m$ est pourtant généralement décrite comme un élément clé dans l'induction de la fission, notamment par l'activation d'OMA1 et le clivage consécutif d'OPA1 (Anand et al. 2014; Ishihara et al. 2006b). Nos résultats sur l'inhibition conjointe de l'ETC et de la F₀F₁-ATP synthase vont également dans ce sens (diminution $\Delta\Psi_m$, clivage rapide d'OPA1 et fragmentation massive du réseau). Cependant, le traitement par oligomycine induit à terme (6H) une fission mitochondriale, sans que nous n'ayons pu détecter de chute du $\Delta\Psi_m$.

Une différence majeure entre l'inhibition pharmacologique de la F₀F₁-ATP synthase et le défaut d'origine génétique est l'altération de structure présentes dans les cellules mutantes. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à la structure de la F₀F₁-ATP synthase, et plus particulièrement à sa superstructure, i.e. sa dimérisation. Nous avons montré par Blue Native-PAGE une augmentation du rapport dimères/monomères de la F₀F₁-ATP synthase suite à son inhibition par l'oligomycine ou O/A, suggérant une stabilisation des dimères lors de l'inhibition de l'ATP synthase, et ce avant la fission du réseau mitochondrial. Par contre, au sein des cellules mutantes, la quantité de monomères et de dimères est diminuée.

L'ensemble de ces résultats feront l'objet d'un deuxième article, en préparation.

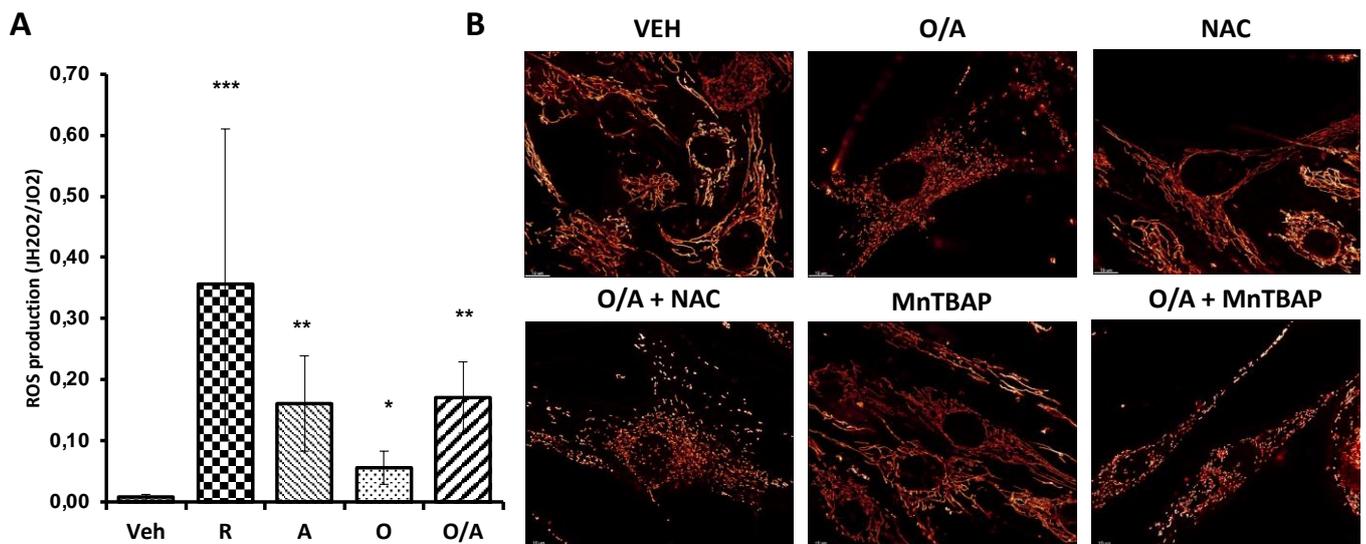


Figure 33 : Production de ROS suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase.

(A) Mesure de la production de ROS déterminée à l'aide de l'Oxygraphie couplée à la fluorescence lors de l'oxydation de l'Amplex Red pendant 30min après avoir injecté différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire dont la roténone (2,5 μ M) (inhibiteur CI), l'Antimycine (2 μ g/ml) (inhibiteur CIII), l'oligomycine (4 μ g/ml) (inhibiteur ATP synthase), et l'oligomycine couplé à l'antimycine **(B)** Observation du réseau mitochondrial à l'aide de la sonde Mito Tracker Green par microscopie à fluorescence dans des cellules humaines contrôle, traitées avec O/A 4h, traitées avec O/A 4h + NAC 24h (100mM) et traitées O/A 4h + MnTBAP 24h (100 μ M).

2.2. Une surproduction de ROS ne perturberait pas la structure du réseau mitochondrial

La relation entre oxydations, phosphorylation (synthèse d'ATP), variation du $\Delta\Psi_m$, et production de ROS est très complexe. Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont considérés comme les principaux sites de production de ROS au sein de la mitochondrie ; si cette production est généralement faible en condition physiologiques, elle peut être fortement augmentée en cas d'inhibition ou dysfonction de ces complexes (Kaminsky et Zhivotovsky 2014). Nous avons notamment émis l'hypothèse qu'une surproduction de ROS pourrait soit activer la phosphorylation de DRP1 et son recrutement à la membrane mitochondriale via une signalisation H_2O_2 dépendante (Hu et al. 2019), soit déstabiliser les supercomplexes de la chaîne respiratoire et conduire à terme, par remaniement de la structure des crêtes, à la fission du réseau mitochondrial. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons donc quantifié cette production de ROS en présence de nos différents inhibiteurs, et analysé en parallèle l'assemblage des supercomplexes par Blue-native PAGE.

2.2.1. Analyse de la production de ROS

La production de ROS (superoxyde et H_2O_2) dans nos conditions, a été quantifiée sur cellules perméabilisée par Amplex Red, sur oxygraphe couplé à la fluorométrie (figure 33A).

L'inhibition du complexe I ou du complexe III de la chaîne respiratoire génère une surproduction de ROS, qui est particulièrement importante dans le cas de l'inhibition du complexe I (production de ROS de 0.36 JH₂O₂/JO₂ après traitement par la roténone vs 0.01 JH₂O₂/JO₂ après traitement par le véhicule, $P < 0.001$, figure 33A). Celle-ci est également significativement augmentée suite à l'inhibition de l'ATP synthase, mais bien moindre que celle observée suite à l'inhibition des complexes I ou III (production de ROS de 0.06 JH₂O₂/JO₂ après traitement par l'oligomycine vs 0.01 JH₂O₂/JO₂ après traitement par le véhicule, $P < 0.05$). L'ATP synthase n'étant pas en elle-même un site de production de ROS, la génération de ROS provient dans ce cas d'une production en amont, liée à l'augmentation du $\Delta\Psi_m$ et au ralentissement du transfert d' e^- au sein de la chaîne respiratoire, suite à l'inhibition de l'ATP synthase (Symersky et al. 2012). Enfin, l'inhibition couplée du complexe III et de l'ATP synthase engendre une production de ROS similaire à l'inhibition du complexe III seul et plus importante que l'inhibition de l'ATP synthase seule (Figure 33A).

Ces niveaux de production de ROS ne semblent donc pas corrélés avec la fragmentation du réseau, puisqu'en présence de Roténone et d'Antimycine nous n'observons pas de fission. Au contraire, la production très importante de ROS par le complexe I suite à une inhibition par la roténone est associée à une augmentation de la tubulation du réseau. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette surproduction ne participait pas, au moins en partie, à l'induction de la fission observée dans les conditions O/A. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons cultivé des fibroblastes de peau sains pendant 24h en présence soit d'un piègeur de peroxyde d'hydrogène, la N-acétylcystéine (NAC), soit d'un composé mimétique de la superoxyde dismutase, le MnTBAP. Les cellules ont été marquées à l'aide de la sonde fluorescente MitoTracker Green

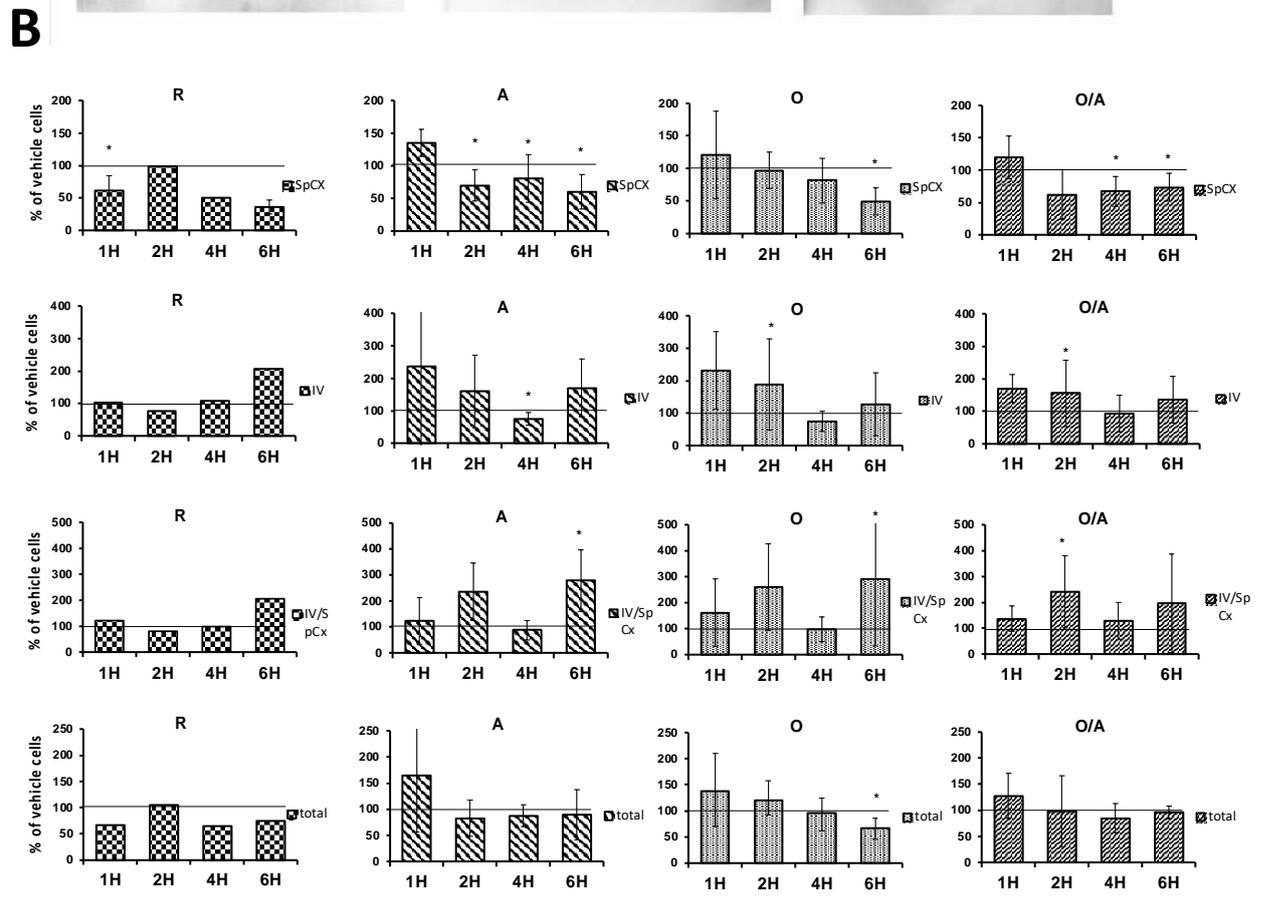
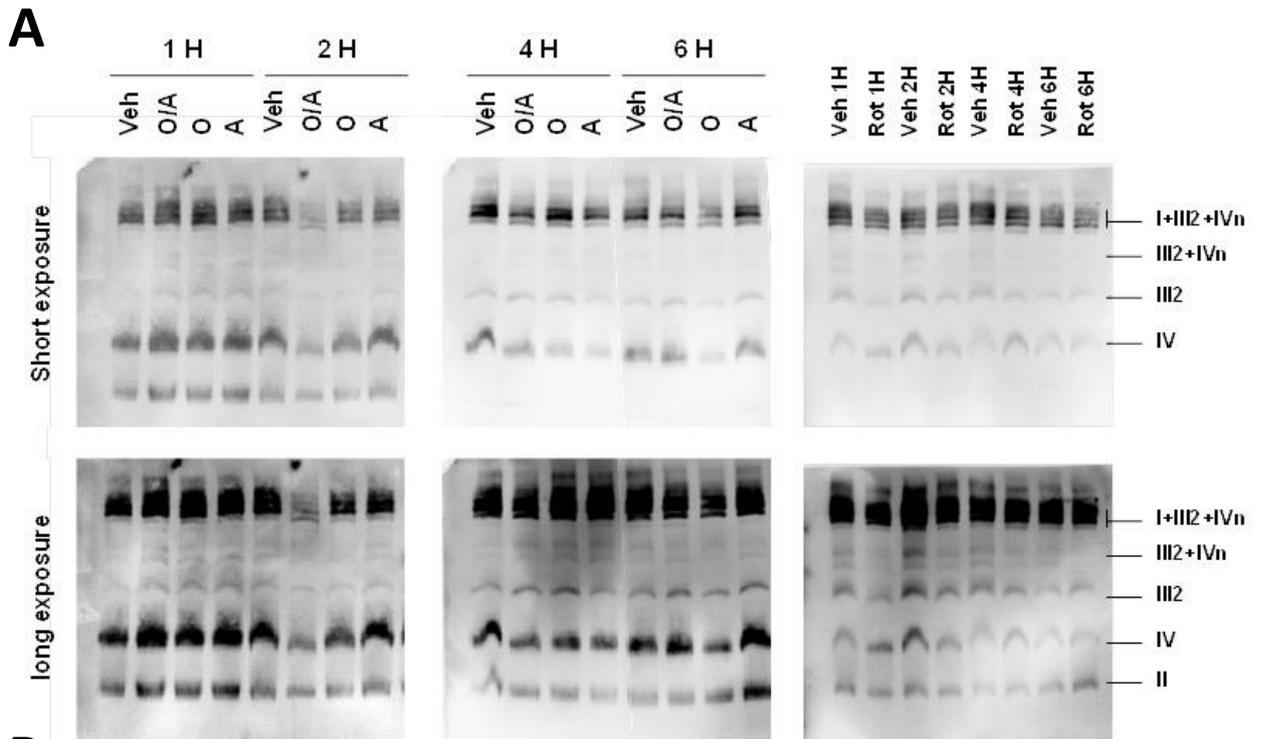


Figure 34 : Assemblage des Supercomplexes suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase

(A) Image représentation des Blue-Native PAGE des Supercomplexes I+III2+IVn, III2+IVn, III2 et IV, réalisés sur des extraits protéiques de cellules fibroblastes traitées. **(B)** La quantification des rapport III/SpCx, IV/SpCx, SpCx et total sont exprimés par rapport au véhicule. N=3 Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. * indique une différence significative par rapport aux conditions de contrôle.

(Figure 33B). Les résultats de cette figure indiquent qu'en présence des deux types d'antioxydants, l'inhibition conjointe de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase induit toujours une fragmentation du réseau mitochondrial. Ces données suggèrent donc que la surproduction de ROS intra-mitochondriale ne participe pas à l'induction de la fission du réseau mitochondrial dans nos conditions.

2.2.2. Analyse de l'assemblage des supercomplexes

Plusieurs hypothèses suggèrent que les supercomplexes, notamment le respirasome ($I_1III_2IV_{1-2}$), sont assemblés afin d'améliorer le transfert des électrons à travers la chaîne respiratoire et faciliter l'apport des substrats (Hirst 2018). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'inhibition de ce transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire et de l'oxydation des substrats pourrait fragiliser l'assemblage des supercomplexes. De plus, certaines études ont suggéré que la structure des crêtes mitochondriales détermine cet assemblage (Cogliati et al. 2013). Cette déstructuration des supercomplexes pourrait donc fragiliser la structure des crêtes mitochondriales conduisant à terme à la fission du réseau mitochondrial. Nous avons donc étudié l'assemblage des supercomplexes par Blue-Native PAGE (Figure 34A).

Cette analyse confirme une diminution de l'assemblage du supercomplexe $I+III_2+IV_n$, cependant, cette diminution concerne autant les inhibiteurs de la chaîne respiratoire (dès 1H pour l'inhibition du complexe I ($P<0,05$) et dès 2H pour l'inhibition du complexe III ($P<0,05$)) que l'inhibition de l'ATP synthase, bien que dans ce cas, beaucoup plus tardivement (à partir de 6H $P<0,05$). Il ne s'agit pas d'une dégradation globale des complexes, puisque le taux total de complexes ne semble pas diminuer au cours du temps. De plus, nous avons observé une augmentation des complexes III et IV libre dans nos conditions (Figure 34B).

Ainsi, une déstabilisation ou un défaut d'assemblage du supercomplexe $I+III_2+IV_n$ est retrouvée quel que soit l'inhibiteur utilisé. Néanmoins, l'inhibition de la chaîne respiratoire ne conduit pas à la fragmentation du réseau mitochondrial, ce qui suggère que la déstabilisation de l'assemblage du supercomplexe $I+III_2+IV_n$ n'est pas corrélée aux événements de la fission mitochondriale. En revanche, la diminution de l'assemblage du supercomplexe $I+III_2+IV_n$ est la plus rapide avec les inhibiteurs du complexe I, la roténone, et du complexe III, l'antimycine, qui sont les principaux producteurs de ROS. Aussi, ces résultats suggèrent qu'une surproduction de ROS déstabilise l'assemblage du Supercomplexes $I+III_2+IV_n$. Une altération de l'assemblage des supercomplexes suite à une surproduction d' H_2O_2 ou un stress oxydant ont en effet déjà été décrit dans la littérature (Diaz, Enríquez, et Moraes 2012).

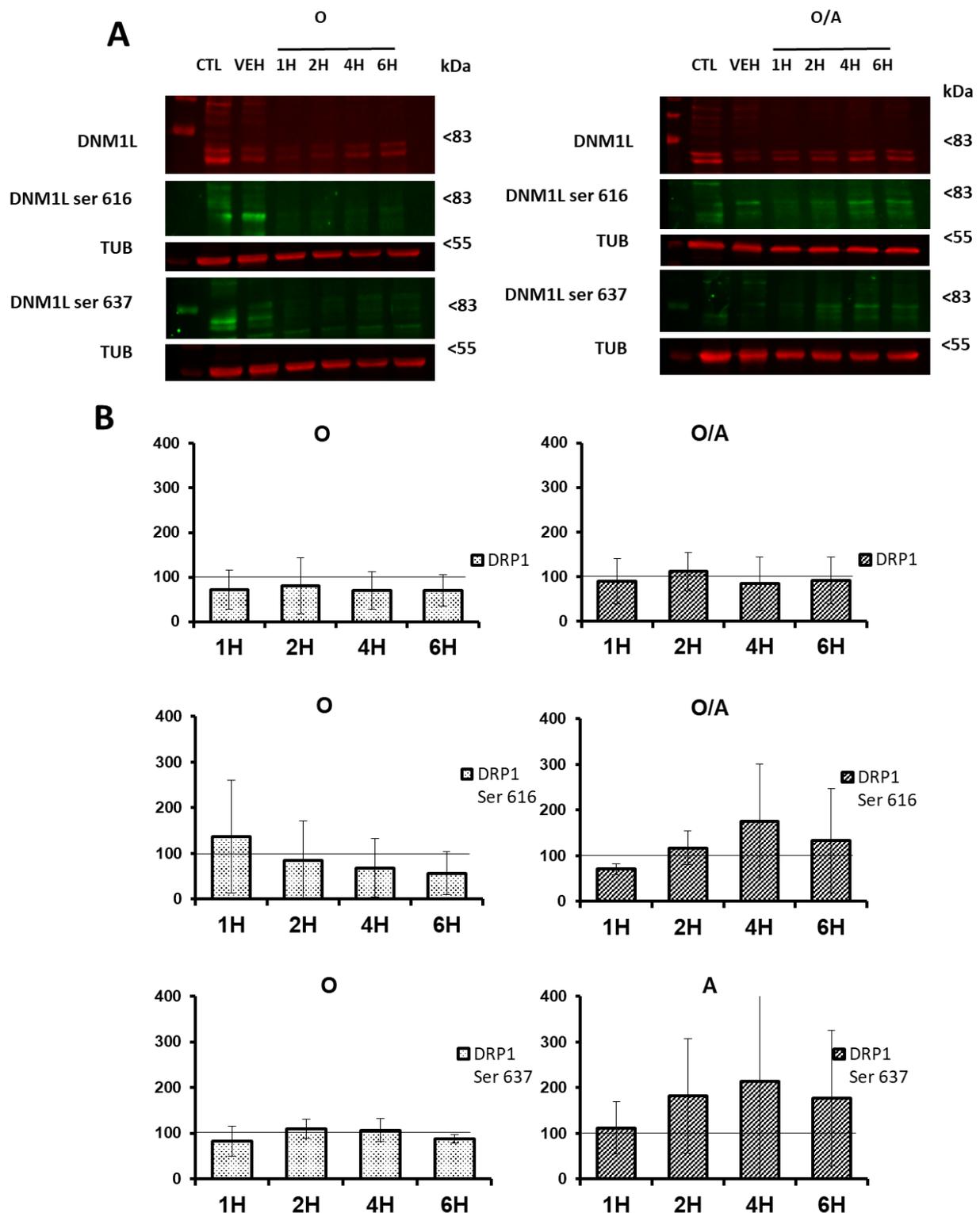


Figure 35 : La phosphorylation de DRP1 n'a pas lieu lors d'une inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase.

(A) Western-Blot des protéines DRP1 ; DRP1 ser616 OPA1 ; DRP1 ser637 et α -tubuline (TUB) comme référence de charge réalisées sur des extraits protéiques de cellules fibroblastes traitées. **(B)** La quantification des protéines est exprimée par rapport au véhicule. N=4. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes par rapport aux conditions de contrôle (Veh).

2.3. Recrutement de la protéine DRP1 au cours du temps

Afin de déterminer si la protéine responsable de la fission mitochondriale DRP1 est recrutée à la mitochondrie dans nos conditions de fission, soit oligomycine et O/A, nous avons quantifié par Western-Blot son expression ainsi que les phosphorylations clés sur les sérines 616 et 637 (Phosphorylation de DRP1) (Figure 35A). La phosphorylation de la sérine 616 est décrite comme étant pro-fission, tandis que la phosphorylation de la sérine 637 est décrite comme étant pro-fusion.

L'analyse des Western-blot montre d'une part que la protéine DRP1 est stable au cours du temps dans nos différentes conditions (Figure 35B1). D'autre part, il ne semble pas y avoir de phosphorylation des sérines 616 et 637 de DRP1 au cours du temps (résultats non significatif) (Figure 35B2 et B3). En effet, le signal de phosphorylation de DRP1 est à la limite de quantification, proche du bruit de fond. Ces résultats soulèvent plusieurs questions, puisque nous avons pu voir dans la partie 3.1.5, que la protéine DRP1 peut être régulé de plusieurs manières. De ce fait, la phosphorylation des sérines 616 et 637 n'est pas la seule façon de recruter ou non la protéine DRP1 à la mitochondrie. Il est également possible que la fission mitochondriale qui se produit lors de l'inhibition de l'ATP synthase et de l'inhibition conjointe de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase soit indépendant de la protéine DRP1. Nous suggérons ainsi qu'il en résulte plutôt un défaut de fusion des membranes internes conduisant à terme à la fission des mitochondries. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé le complexe III et l'ATP synthase chez un mutant DMN1L p.Thr59Asn et OPA1 DelTTAG (Figure 36). Nous avons observé par microscopie à fluorescence une résistance à la fission chez ces deux patients comparés au contrôle traité.

2.4. Discussion

L'équilibre dynamique entre la fusion et la fission des mitochondries est nécessaire afin de répondre à la demande métabolique et assurer le contrôle qualité en éliminant les mitochondries endommagées. Ainsi, le réseau tubulaire des mitochondries permet la distribution cellulaire de l'ATP. Parmi les acteurs principaux de cette dynamique, la dynamine GTPase mitochondriale OPA1 partage un rôle avec les complexes MICOS dans la jonction de crêtes et participe avec les dimères de l'ATP synthase à la courbure de la membrane interne. Bien que la fission mitochondriale dépende du facteur cytosolique DRP1, il a été suggéré que celui-ci ne pouvait conduire à la fission des membranes internes (Cho et al. 2017). Ainsi la perturbation de l'organisation interne avec le clivage de la protéine OPA1 participerait à la séquence de fission de cette membrane interne. Cependant, le rôle d'OPA1, de même qu'une perturbation des composants de la membrane interne dans la fission mitochondriale ne sont pas connus. Une inhibition aiguë de la phosphorylation oxydative est généralement associée à la fragmentation du réseau mitochondrial, mais les données de la littérature restent très hétérogènes, et le signal ou seuil bioénergétique à l'origine de cette éventuelle fission peu précis. Nous avons donc inhibé chimiquement l'ETC et/ou l'ATP synthase et étudié au cours du temps les modifications de la respiration mitochondriale, du potentiel de membrane mitochondriale et de la production de ROS ainsi que les

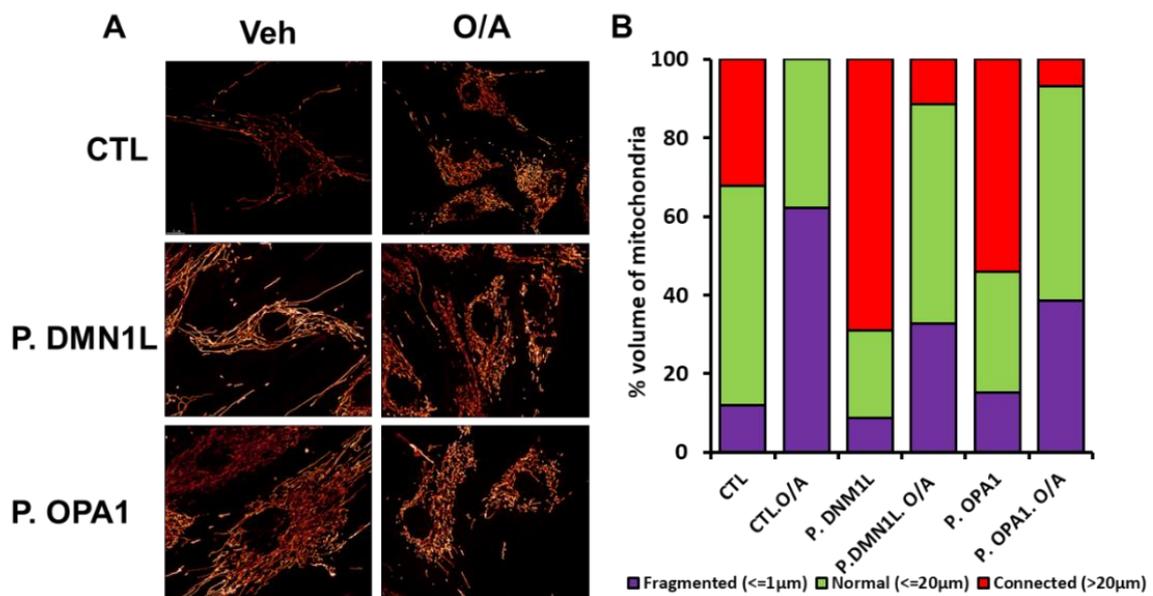


Figure 36 : Structure du réseau mitochondrial après 4H d'inhibition de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase (O/A)

A) Analyse du réseau mitochondrial observé chez des fibroblastes de peau contrôles et des patients *DMN1L* Thr59Asn et *OPA1*^{delTTAG} avec la sonde MitoTracker Green par microscopie à fluorescence. Images représentatives des différentes morphologies du réseau mitochondrial observé. **B)** Quantification du volume mitochondrial. Chaque pile d'images a été déconvoluée avec le logiciel Huygens Essential (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Pays-Bas) qui a amélioré la résolution et le bruit des images acquises par microscopie à fluorescence. Le traitement des images 3D et leur analyse ont été réalisés avec le logiciel Imaris® (Bitplane). Le module isosurface permet de quantifier la longueur des mitochondries en µm et ainsi de classer les mitochondries par taille. Le pourcentage de volume de mitochondries représente donc le pourcentage de

événements de fission associés, en nous focalisant sur les phases précoces d'adaptation du réseau mitochondrial à ces inhibitions.

Nos résultats confirment que les inhibitions des complexes I ou III, principaux sites de production de ROS, induisent une surproduction de ces espèces réactives de l'oxygène (Ueno et al. 1994; L. Huang et al. 2005; Symersky et al. 2012). Une augmentation très modérée de ROS a également été retrouvée suite à l'inhibition de l'ATP synthase, ce que nous pouvons mettre en lien avec l'augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (Symersky et al. 2012). De manière très intéressante, cette production accrue de ROS semble déstabiliser l'assemblage des supercomplexes I+III₂+IV_n, en effet nos résultats ont montré que, quel que soit le complexe inhibé, les supercomplexes sont déstabilisés. Le niveau de production de ROS semble de plus corrélé à l'altération de l'assemblage du supercomplexe, en effet, plus il y a de ROS produit, notamment suite à l'inhibition du complexe I, plus l'assemblage des supercomplexes est perturbé précocement. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Diaz et al (2012) qui montre également qu'une surproduction d'H₂O₂ fragilise l'assemblage des supercomplexes (Diaz, Enríquez, et Moraes 2012). Cependant, ni la surproduction de ROS au niveau matriciel (complexe I), ni au niveau de l'espace inter-membranaire (complexe III) ne conduit à la fission du réseau, puisque 1) nous n'observons dans ce cas aucune altération du réseau mitochondrial, et 2) l'utilisation d'anti-oxydants comme le MnTBAP ou le N-acétylcystéine n'ont pas permis d'empêcher la fragmentation du réseau lors d'une inhibition combinée de l'ETC et de l'ATP synthase. Certaines études ont pourtant montré qu'un stress oxydant est associé à la fission mitochondriale et favoriserait le recrutement mitochondrial de la protéine cytosolique DRP1 (Hu et al. 2019). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le site intracellulaire de production de ROS. En effet, dans la plupart des études, le stress oxydant n'est pas lié directement à une surproduction de ROS par la chaîne respiratoire, mais est induit soit en ajoutant directement de l'H₂O₂ (Q. Huang et al. 2016), soit par radiation-UV (Bo et al., 2018) ou encore indirectement, par exemple suite à une inhibition de l'autophagie (Hu et al. 2019). De plus, la mitochondrie n'est pas le seul site producteur de ROS, en effet la NAD(P)H oxydase membranaire (NOX) est une enzyme capable de produire de l'O₂⁻ en catalysant la réduction de l'O₂, en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (Bedard et Krause 2007). Cette production de ROS cytosolique a également été suggérée comme impliquée dans l'altération de la dynamique mitochondriale (Shen et al. 2016). Les ROS ne sont pas uniquement des molécules délétères, mais également des molécules de signalisation intracellulaire, en particulier l'H₂O₂ (Gough et Cotter 2011). L'H₂O₂ régule notamment les voies sous le contrôle de kinases, telles que les voies PI3K/Akt ou CAMKII (Hu et al. 2019; Wu et al. 2021). CAMKII module la phosphorylation de Drp1 (S616) (Chang et Blackstone 2007), ainsi, une augmentation intra-cytosolique d'H₂O₂ permettrait la phosphorylation et le recrutement de DRP1. La mitochondrie dispose d'un équipement très efficace de détoxification des ROS (Calabrese, Morgan, et Riemer 2017; Moloney et Cotter 2018), aussi surproduction intra-mitochondriale d'anion superoxyde pourrait être insuffisante pour entraîner des variations significatives d'H₂O₂ cytosolique et induire cette voie de signalisation. Nous n'avons cependant pas mesuré celle-ci ou ces conséquences (marqueurs de stress oxydants) dans nos modèles d'inhibitions.

Bien que dans nos conditions, une surproduction de ROS ne conduise pas à la fission du réseau mitochondrial, il n'est pas le seul paramètre bioénergétique à être modulé lors d'une inhibition de l'ETC et/ou de l'ATP synthase. En effet, le potentiel de membrane mitochondrial dépend de l'activité de l'ETC mais également de celle de l'ATP synthase (Mitchell 1961). Dans cette deuxième publication actuellement en préparation, nous montrons que l'ATP synthase conditionne la réponse à la fission de par son fonctionnement. En effet, lors d'une inhibition de l'ETC, nos résultats montrent que l'ATP synthase fonctionne immédiatement comme une pompe à protons en hydrolysant l'ATP : activité ATPase. Ce pompage des protons vers l'espace intermembranaire des crêtes permet de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial (Devenish, Prescott, et Rodgers 2008; Kubo, Niina, et Takada 2020). La dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial après inhibition de l'ATP synthase confirme que son fonctionnement en mode ATPase participe au maintien du $\Delta\Psi_m$, suite à l'inhibition du complexe III. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Forkink et al (2014) qui montre également sur cellules HEK293 intactes que le potentiel de membrane mitochondrial est maintenu par l'activité ATPase suite à une inhibition de l'ETC (Forkink et al. 2014). Notre étude va cependant plus loin en montrant en plus que cette activité ATPase permet à la structure tubulaire du réseau de résister à la fission mitochondriale, puisque l'inhibition combinée du complexe III et de l'activité ATPase par le BMS-199264 fragmente partiellement le réseau mitochondrial.

De nombreux travaux décrivent dans différents modèles, du tissu cardiaque aux lignées tumorales, que l'activité ATPase est régulée par un facteur nommé IF1 (inhibit factor 1). IF1 se lierait au site catalytique du domaine F1 bloquant ainsi l'hydrolyse de l'ATP (Pullman et Monroy 1963; Esparza-Moltó, Nuevo-Tapióles, et Cuezva 2017). Nos résultats montrent que dans les fibroblastes primaires de peau, bien que le facteur IF1 soit exprimé, celui-ci ne permet pas d'inhiber la fonction ATPase suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : IF1 est activé par modification post-traductionnelle suite à une acidification de la matrice (Cabezón et al. 2000). De ce fait, il se peut que dans nos conditions, la matrice mitochondriale ne soit pas suffisamment acidifiée pour permettre l'activation d'IF1, cependant l'étude de Forkink (2014) a montré lors de l'inhibition du complexe III une acidification importante de la matrice. Il est donc également possible que le niveau d'expression d'IF1 dans les fibroblastes ne soit pas suffisant pour obtenir une inhibition complète de l'ATPase, contrairement aux cellules cancéreuses. En effet, plusieurs études ont montré que IF1 est largement surexprimé dans les cellules cancéreuses (Luciaková et Kuzela 1984; Capuano, Guerrieri, et Papa 1997; Bravo et al. 2004; Solaini, Sgarbi, et Baracca 2021) et inhibe efficacement l'ATPase afin d'éviter une consommation de l'ATP glycolytique. Ceci pourrait expliquer le fait que les cellules tumorales sont très sensibles à la fragmentation de leurs réseaux mitochondriaux suite à une inhibition de l'ETC, beaucoup plus que les cellules primaires (Legros et al. 2002; De Vos et al. 2005; Barsoum et al. 2006; Pletjushkina et al. 2006; Zhao et al. 2013; Wan et al. 2014). Nos résultats suggèrent que cette activité ATPase est soutenue par le métabolisme glycolytique, qui se ferait via une importation d'ATP par les translocases ATP/ADP. Bien que diverses études montrent une association entre un métabolisme cellulaire glycolytique et un réseau mitochondrial plutôt fragmenté, ces études sont pour la plupart réalisées sur cellules cancéreuses dont le métabolisme et la fonctionnalité mitochondriale sont perturbés. De nos propres observations, les cellules tumorales ont généralement des mitochondries peu organisées en réseau et présentent une grande diversité au

sein du tapis cellulaire. Ainsi, la différence de métabolisme dans certains tissus pourrait sensibiliser les mitochondries à la fission mitochondriale.

Quel que soit le type cellulaire utilisé, il a été décrit dans la littérature la chute du potentiel de membrane mitochondrial conduit à la fission du réseau mitochondrial (Legros et al. 2002; Olichon et al. 2003; Anand et al. 2014; Baker et al. 2014; Wai et Langer 2016). Les découplants tels que le CCCP ou le FCCP ont ainsi été utilisés dans la plupart des études pour initier la fission mitochondriale (Legros et al. 2002; De Vos et al. 2005; Malka et al. 2005; Pletjushkina et al. 2006; Guillery et al. 2008; Quintana-Cabrera et al. 2018; Salewskij et al. 2020). Etant donné les nombreux effets de ces découplants au niveau cellulaire, de dérégulation des voies de signalisation, d'effets annexes sur le réticulum endoplasmique et sur le cytosquelette (Kane et al. 2018), nous n'avons pas choisi d'utiliser ces molécules plus largement. Avec l'utilisation des inhibiteurs spécifiques O/A, nous avons effectivement constaté que lors d'une chute du $\Delta\Psi_m$, le réseau mitochondrial fragmente plus rapidement et massivement. Néanmoins, l'inhibition de l'ATP synthase, qui induit une hyperpolarisation, conduit également à une fragmentation du réseau (van der Stel et al. 2022). Ceci suggère que la baisse du $\Delta\Psi_m$ n'est pas indispensable à la fission du réseau mitochondrial, mais permettrait d'accélérer sa fragmentation, puisque cette fragmentation se produit plus rapidement et massivement lors d'une inhibition conjointe de l'ETC et de l'ATP synthase.

Il a été suggéré que l'organisation spatiale et la dimérisation de l'ATP synthase dépend de son activité (Salewskij et al. 2020) et nos résultats indiquent que l'inhibition de toute activité ATP synthase conduit à accumuler les formes dimériques ou stabilise les dimères. Il est maintenant bien établi que la dimérisation de l'ATP synthase et le rapport entre monomères et dimères jouent un rôle clé dans la structuration des crêtes mitochondriales. Tout comme le réseau mitochondrial, les membranes internes, les crêtes mitochondriales représentent des structures très dynamiques (Zick, Rabl, et Reichert 2009) capables de remodelage en fonction de l'activité OXPHOS (Hackenbrock 1966; 1968; Rossignol et al. 2004) ou suite à un stress métabolique comme le jeûne (Gomes, Di Benedetto, et Scorrano 2011). Le rôle d'OPA1 dans ce remodelage dynamique semble central (Frezza et al. 2006; Merkwirth et al. 2008), mais nous émettons l'hypothèse que l'ATP synthase, via sa capacité à percevoir les variations de potentiel de membrane et à changer sa superstructure et/ou sa stabilisation participerait également à ce remodelage, voir précéderait l'action d'OPA1. Lors d'un stress cellulaire, l'altération de la morphologie de la membrane interne et des jonctions des crêtes participent à la fois à la résistance (Frezza et al. 2006) et/ou à l'induction de l'apoptose en contrôlant le relargage du cytochrome c (Scorrano et al. 2002), cependant, il n'est pas connu si de telles modifications structurelles pourraient également sensibiliser les mitochondries à la fission. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les patients mutés sur les différentes sous-unités de l'ATP synthase, présentant une sous expression de l'ATP synthase et plus particulièrement de sa forme dimérique, ne sont pas fragmentés, accumulant des mitochondries défectueuses. Des mesures de sensibilité à l'apoptose seraient intéressantes à effectuer dans ce cas.

Dans cette étude, nous nous sommes essentiellement concentrés sur les constantes induisant la fission mitochondriale, néanmoins nous avons également étudié le recrutement de la protéine de fission DRP1. Il est désormais clair que les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles régulent l'activité de la protéine DRP1. Il a notamment été étudié la phosphorylation des sérines 616 et 637 de DRP1, qui sont respectivement considérées comme activatrices et inhibitrices. Nous avons d'une part constaté que l'expression de la protéine DRP1 est stable quel que soit nos conditions et d'autre part, que DRP1 ne semble pas phosphorylé sur les sérines 616 et 637. Néanmoins, ce ne sont que deux façons de réguler DRP1 parmi tant d'autres. En effet, il a été montré que lors d'une inhibition de l'ATP synthase, l'augmentation de la glycolyse augmente la phosphorylation de l'AMPK (Contreras-Lopez et al. 2021). En outre, il a été constaté que l'activation de l'AMPK déclenche la fission mitochondriale dans des cellules traitées avec des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative (Toyama et al. 2016). Une fois activé, l'AMPK phosphoryle le récepteur MFF entraînant le recrutement de la protéine de fission DRP1. Les données d'imagerie par immunofixation du facteur DRP1 n'ont pas encore permis de montrer à quel moment, à quelle étape DRP1 est recruté au niveau mitochondrial suite aux différents traitements appliqués. L'imagerie de DRP1 et sa visualisation effective essentiellement sous forme de cluster de DRP1 est complexe et nos données nécessitent d'être consolidées.

Discussion générale et perspectives

Depuis de nombreuses années le laboratoire MitoLab s'est spécialisé dans l'étude de la relation complexe entre la structure et la fonction mitochondriale en s'appuyant essentiellement sur des modèles cellulaires ou animaux de pathologies mitochondriales. Les pathologies mitochondriales, des maladies héréditaires du métabolisme, regroupent un ensemble de caractéristiques cliniques complexes associées à des atteintes de l'activité bioénergétique et de la morphologie des mitochondries mais également de leur dynamique. Bien que les données de la littérature attestent d'un lien entre la bioénergétique mitochondriale et sa dynamique, mon travail de synthèse bibliographique au cours de cette thèse montre que ces nombreuses données sont complexes, souvent contradictoires et font débat. Nos propres analyses conduisaient également parfois à des incompréhensions concernant l'impact d'une mutation dans une sous-unité de la chaîne respiratoire ou dans un gène de la fusion/fission sur la mitochondrie. Notre objectif était donc d'éclaircir l'impact d'une variation de paramètres clés du métabolisme mitochondrial que sont le potentiel de membrane mitochondrial, la production de radicaux libre (ROS) et la synthèse d'ATP, sur la dynamique mitochondriale. Nous avons pour ce faire utilisé un modèle de cellules primaires, les fibroblastes de peau. En effet, ces cellules constituent le modèle le plus accessible au niveau des patients et présentent l'avantage 1) d'un réseau tubulé et homogène sur l'ensemble de la cellule, 2) d'un métabolisme oxido-glycolytique, et 3) largement caractérisé auparavant au sein du laboratoire. Afin de suivre l'induction de la fission, nous avons étudié ces différents paramètres lors des premières étapes, précédant la mitophagie, soit des temps entre 15 minutes et 19h, ce qui impliquait dans un premier temps l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ; dans un deuxième temps nous avons cherché à confirmer ces données sur des modèles d'inhibition chronique, présentant des défauts d'origine génétiques des OXPHOS (fibroblastes de patients atteints de pathologies mitochondriales).

La caractérisation précise des constantes bioénergétiques mitochondriales, notamment de la production de ROS, de la synthèse d'ATP et du potentiel de membrane mitochondrial, nous a permis de clarifier le mode d'induction de la fission. Nous avons recherché une induction responsable d'une fragmentation homogène du réseau mitochondrial, où chaque tubule finit par se fissionner, et ce sans subir de gonflement ni de formation de donut (Eisner, Picard, et Hajnóczky 2018). Ni le niveau de production de ROS intra-mitochondriaux, ni le niveau de synthèse d'ATP ne semblent ainsi participer à cette induction. Le contrôle du potentiel de membrane semble par ailleurs un élément clé, bien que non-indispensable. Le terme « stress mitochondrial » est souvent utilisé dans la littérature de façon très imprécise, pour parler de la variation de l'une ou l'autre des constantes bioénergétiques sans les définir. Grâce à ces résultats, nous avons ainsi précisé quelle constante bioénergétique influence le remodelage des membranes mitochondriales.

Nos résultats ont montré premièrement qu'une surproduction de ROS intra-mitochondriale n'est pas l'inducteur de cette fission, puisque qu'une augmentation importante de la production de ROS, soit au niveau matriciel (complexe I), soit au niveau de l'espace inter-membranaire (complexe III) (Plecitá-Hlavatá et Ježek 2016) ne fragmente pas le réseau mitochondrial ; pas plus que l'utilisation d'anti-oxydants n'empêche la fission suite à une inhibition de l'ETC et de l'ATP synthase. Nous n'avons pas non plus retrouvé dans la littérature

d'études liant directement une surproduction de ROS par la chaîne respiratoire à la fission du réseau. Il est connu qu'une élévation chronique des taux de ROS intra-mitochondriaux, quand ceux-ci finissent par dépasser les capacités anti-oxydantes, peuvent induire des altérations de l'ADNmt (Larsson 2010; Trifunovic et al. 2005), d'activités et/ou de structure de la chaîne respiratoire, comme nous l'avons montré par BN-PAGE. Nous n'avons pas poussé nos analyses sur des temps au-delà de 24h de traitement par nos inhibiteurs, nous ne pouvons donc exclure qu'une inhibition chronique stimulerait à terme la fragmentation du réseau. Cependant, sur modèles génétiques de dysfonction du complexe I, les études précédentes du laboratoire ont montré une production accrue de superoxyde et la présence d'un stress oxydant (Desquirit-Dumas et al. 2019; Leman et al. 2015). Pour autant, aucune fragmentation du réseau n'a été observée dans ces fibroblastes.

Nous nous intéressons ici aux signaux intra-mitochondriaux pouvant induire la fission. Ce résultat ne signifie pour autant pas qu'une élévation cytosolique des ROS, en particulier de la molécule de signalisation H_2O_2 , ou l'induction d'un stress oxydant, ne provoquent pas de fragmentation du réseau, comme l'ont montré différentes études (Bedard et Krause 2007; Chuang et al. 2020; Huang et al. 2016; Rainbolt et al. 2015). Cette fission induite par un stress oxydant « externe » impliquerait une/des voies de signalisation extra-mitochondriale, telle que la phosphorylation de DRP1 par des kinases telles que CAMKII (Chang et Blackstone 2007). De plus, si la mitochondrie est un site majeur de production de ROS, elle en est aussi une cible privilégiée, et différentes études ont démontré que les ROS, induits au niveau cytosolique, provoquent secondairement une chute du potentiel de membrane mitochondrial (Rizwan et al. 2020; Xie et al. 2021), laquelle pourrait également participer à l'induction de la fission (Chuang et al. 2020).

La deuxième information porte sur la baisse de la synthèse d'ATP qui n'est pas non plus l'inducteur de la fission, puisque l'inhibition de l'ETC qui empêche cette synthèse ne fragmente pas le réseau mitochondrial. Ce résultat est en accord avec la récente étude de Van der Stel (2022). Dans cette étude, les auteurs ont de plus analysé les niveaux d'ATP cytosolique et mitochondrial suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire par la roténone et l'antimycine et montrent une diminution des taux d'ATP à la fois mitochondriaux, mais également cytosoliques, sans fragmentation du réseau mitochondrial. Les mitochondries sont souvent positionnées sur des sites intracellulaires à forte demande énergétique (Li et al. 2004; Ogata et Murata 1969; T et Y 1985), démontrant une adaptation de la distribution et de la morphologie des mitochondries aux besoins énergétiques des cellules différenciées. Chez la levure, une augmentation de l'activité respiratoire induit un réseau interconnecté qui favoriserait l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Egner et al. 2002). Si la dynamique et le réseau mitochondrial semblent donc répondre aux besoins en ATP cellulaires, à l'inverse une diminution de la synthèse d'ATP mitochondrial ne paraît donc pas induire en elle-même la fission de ce réseau. Les oxydations, ou respiration mitochondriales, ne sont pas non plus nécessaire à la dynamique mitochondriale, puisque l'inhibition de la chaîne respiratoire ne fragmente pas le réseau mitochondrial.

La troisième information concerne la variation du potentiel de membrane mitochondrial, dont la chute est décrite dans la littérature comme un paramètre majeur conduisant à la fission du réseau (Legros et al. 2002; Olichon et al. 2003; Anand et al. 2014; Baker et al. 2014; Wai et Langer 2016). Nos résultats ont effectivement montré qu'après une chute du potentiel de membrane mitochondrial, le réseau se fragmente

rapidement et massivement. Lorsque le $\Delta\Psi_m$ chute fortement, les formes longues L-OPA1 sont clivées par la métalloprotéase OMA1 en isoformes S-OPA1 courtes et inactives pour la fusion (Ehres et al. 2009; Head et al. 2009); cette perte de fusion provoquerait une fission mitochondriale sans opposition et une fragmentation du réseau mitochondrial. Nos données vont dans ces sens, en effet, nous montrons une chute quasi immédiate du potentiel de membrane après inhibition de l'ETC et de l'ATP synthase suivie d'un clivage très rapide d'OPA1 (dès 15 minutes), précédant donc la fission. Quelles soient les conditions d'induction de cette fission, nous avons toujours retrouvé un clivage d'OPA1 précédant celle-ci. Ainsi, le processing protéolytique d'OPA1 apparaît comme un acteur crucial de la fission, qui relierait directement le potentiel de membrane mitochondrial et la structure mitochondriale. La nécessité de ce processing suggère également que le remaniement des crêtes et/ou de la membrane interne mitochondriale est un élément précoce de la fragmentation.

Néanmoins, nous avons également constaté un clivage d'OPA1 et une fragmentation du réseau sans baisse du $\Delta\Psi_m$ suite à l'inhibition de l'ATP synthase. Sur modèle HepG2, Van der Stel et al (2022) retrouvaient également une fragmentation du réseau suite au traitement par oligomycine (van der Stel et al. 2022). Chez des patients présentant des mutations de différentes sous-unités de l'ATP synthase, le réseau mitochondrial n'est pas fragmenté tandis que leur $\Delta\Psi_m$ est diminué. Ceci nous a permis de suggérer qu'une chute du $\Delta\Psi_m$ permettrait d'accélérer la fission du réseau mitochondrial, mais n'est pas suffisante et/ou nécessaire pour l'induire.

Le quatrième point qui découle de ces travaux, permet de proposer que l'ATP synthase joue un rôle majeur dans la réponse à la fission. En effet, nos résultats indiquent que lors d'un défaut de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase préserve le potentiel de membrane mitochondrial en fonctionnant en mode réverse (mode ATPase). De plus, nous apportons un résultat novateur puisque nous avons montré que ce mode ATPase permet au réseau tubulaire de la mitochondrie de résister à la fission. Ce lien direct entre l'activité de l'ATP synthase et la dynamique mitochondriale n'a à notre connaissance pas été décrit dans la littérature. Néanmoins, quelques questions restent encore à éclaircir. Un fonctionnement réverse en mode ATPase nécessite une hydrolyse de l'ATP, lequel ne peut être fourni par la synthèse mitochondriale. Nos résultats pointent vers une utilisation de l'ATP glycolytique pour soutenir ce mode ATPase, le métabolisme glycolytique étant par ailleurs stimulé par l'inhibition de la chaîne respiratoire. Afin de mieux comprendre ce mécanisme de résistance à la fission, nous supposons que l'ATP cytosolique nécessaire au fonctionnement ATPasique est importé par le transporteur ADP/ATP (ANT). En effet, la membrane mitochondriale interne étant imperméable, l'ANT importe l'ADP nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase, mais ce même transporteur est également capable d'importer l'ATP provenant du cytosol en échange d'une sortie d'ADP, alimentant ainsi l'ATPase (Ley-Ngardigal et Bertolin 2021; Ruprecht et al. 2019). De ce fait, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ANT comme l'acide bongkrelic ou l'atractyloside (Jaiquel Baron et al. 2021) devrait avoir les mêmes effets qu'une privation de glucose lors d'une inhibition de l'ETC (Kano, Iwasaki, et Shindo 2019). Par ailleurs, le fait que l'activité ATPase consomme une part de la production glycolytique d'ATP pose question quant à la tissu-spécificité de ce mécanisme de résistance. Le remplacement du glucose dans le milieu de culture par du galactose, qui limite les capacités glycoliques cellulaires sensibilise en effet les mitochondries à la fragmentation. L'étude de cette réponse dans des cellules ou tissus fortement oxydatifs, où la glycolyse est minoritaire comme le cardiomyocyte

serait donc très complémentaire. De prime abord, ce mécanisme de maintien du $\Delta\Psi_m$ et de résistance à la fission peut sembler protecteur. Cependant, il implique un coût énergétique important, de par la consommation supplémentaire d'ATP. Dans des tissus fortement oxydatifs avec des capacités glycolytique réduite, il est probable qu'un mode réverse de l'ATP synthase exacerbe les atteintes cellulaires, comme cela a pu être montré dans le cœur lors d'une ischémie-reperfusion (Cao et Zheng 2019; Wyant et al. 2022). De même, chez les patients atteints de déficit de la chaîne respiratoire, le métabolisme glycolytique est déjà fortement stimulé pour tenter de subvenir aux besoins énergétiques cellulaires (Desquiret-Dumas et al. 2019), une surconsommation d'ATP risque donc d'augmenter le déficit énergétique cellulaire. Notre étude devrait donc également être complétée par la mesure des variations d'ATP cytosolique et mitochondriale suite à l'inhibition de l'ETC, mais également sur nos modèles de déficits génétiques +/- BMS-199264, l'inhibiteur spécifique du mode réverse ATPase. Une étude de la phosphorylation de l'AMPK (Toyama et al. 2016), senseur majeur du statut énergétique cellulaire pourrait compléter ces analyses (Ley-Ngardigal et Bertolin 2021).

Chez les patients atteints de déficits de la chaîne respiratoire, le mécanisme de résistance à la fission médié par l'ATPase peut également être délétère en protégeant de la fission les mitochondries défectueuses. L'élimination de ces mitochondries endommagées est aujourd'hui un défi thérapeutique. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes ainsi intéressés à l'induction de la fission mitochondriale, nous avons donc travaillé sur des temps précoces, bien en amont de la mitophagie. Or, il est bien établi que la fission mitochondriale permet la distribution et la migration de nouvelles mitochondries, mais également de séparer les parts endommagées des mitochondries pour leur élimination par mitophagie (Onishi et al. 2021). Nos résultats obtenus dans les cellules primaires montrent ainsi un rôle sous-estimé de la fonction reverse de l'ATP synthase : le fait que l'activité ATPase puisse maintenir rapidement et efficacement le $\Delta\Psi_m$ lors d'un déficit de l'ETC. En absence d'atteinte du $\Delta\Psi_m$, les mitochondries restent connectées et ne sont pas pris en charge par le système mitophagique ce qui favoriserait une accumulation des mitochondries défectueuses. Afin d'éliminer ces mitochondries défectueuses, il serait donc intéressant de réussir à contrôler l'inhibition de cette fonction ATPase et ce en fonction des types d'altération de l'ETC. Il a déjà été montré que l'inhibition de la fonction ATPase par IF1 dans les neurones a un effet neuroprotecteur durant une ischémie, soit en absence de respiration (Matic et al. 2016). Le BMS-199264, inhibiteur de l'activité ATPase représente une piste pharmacologique pour moduler cette activité et tenter de favoriser la fission et la mitophagie dans ces cellules de patients atteints de déficit(s) de la chaîne respiratoire. Nous disposons d'un modèle très intéressant pour tester cette hypothèse : nous proposons d'utiliser des cellules avec des mutations de l'ADNmt hétéroplasmique, en particulier des cellules de patients porteurs de la mutation m.3243G>A responsable du syndrome du MELAS (Myopathie, Encéphalopathie, Acidose Lactique et pseudo-Stroke) afin de favoriser la mitophagie et ainsi tenter de diminuer le taux d'hétéroplasmie dans cette pathologie.

Comme évoqué ci-dessus, le traitement des cellules par la molécule oligomycine induit à elle seule une fragmentation du réseau, bien que moins rapide que celle induite par le traitement conjoint oligomycine/antimycine. Cette fragmentation ne s'explique pas par une diminution du $\Delta\Psi_m$, et ne semble être liée à l'une ou l'autre des perturbations du métabolisme mitochondrial : production de ROS, diminution de la synthèse d'ATP ou des oxydations (cf paragraphes ci-dessus). Cet effet ne peut non plus s'expliquer par la seule

inhibition de l'activité de l'ATP synthase, puisque les mutants de cette enzyme ne présentent pas de réseau altéré en condition basale. De manière très intéressante, nous avons également montré que l'inhibition de l'ATP synthase augmente l'assemblage de son dimère ou le stabilise. Il est très clair dans la littérature que l'ATP synthase joue un rôle dans la structuration des crêtes mitochondriales (Paumard et al. 2002; R. Quintana-Cabrera et al. 2018; Rampelt et van der Laan 2017). Le dimère de l'ATP synthase est notamment impliqué dans la courbure des crêtes (Hahn et al. 2016). De récentes publications montrent également que son activité régit son organisation spatiale et sa dimérisation (Salewskij et al. 2020; Weissert et al. 2021). Cependant, le lien entre structure/remodelage des crêtes et fission mitochondriale n'est, à notre connaissance, pas décrit dans la littérature, il est cependant tentant de spéculer qu'une altération morphologique de ces crêtes pourrait sensibiliser les mitochondries à la fission, notamment la fission de la membrane interne. D'autant plus que l'étude de Cho et al, a suggéré que la protéine de fission DRP1 n'était pas suffisante pour induire la fission des membranes internes (Cho et al. 2017) et qu'une pré-constriction est indispensable. De récentes études par nanoscopie super-resolution ont mis en évidence que les crêtes sont très dynamiques, pouvant rapidement se remodeler et même subir des événements de fission et de fusion membranaires (Kondadi, Anand, et Reichert 2020). Ici, nous proposons donc un mécanisme inédit de remodelage des membranes internes. En effet, nous émettons l'hypothèse que la stabilisation des dimères et le remodelage des crêtes mitochondriales pourraient permettre à celle-ci de les rapprocher et favoriser une pré-constriction ce qui prépare les mitochondries à la fission. Cette hypothèse reliant l'activité de l'ATP synthase, sa dimérisation et la dynamique mitochondriale, pourrait expliquer pourquoi les patients mutés sur les différentes sous-unités de l'ATP synthase, présentant une sous expression de l'ATP synthase et plus particulièrement de sa forme dimérique, ne sont pas fragmentés, accumulant des mitochondries défectueuses. Cette hypothèse reste cependant très spéculative, et demande de nombreuses validations expérimentales. Des analyses de la structure des membranes internes par microscopie électronique à transmission et par microscopie à super-résolution sont en cours.

Le changement de structure de l'ATP synthase intervient dès 1h, donc en amont du clivage de la protéine OPA1. Or, le rôle d'OPA1 dans le remodelage des crêtes mitochondriales a bien été décrit (Frezza et al. 2006; Merkwirth et al. 2008). De plus, une étude suggère que OPA1 et l'ATP synthase interagissent ensemble, permettant de préserver la dynamique des membranes internes (Rubén Quintana-Cabrera et al. 2018). Nous avons également montré que chez des patients présentant un défaut de la protéine OPA1 ou DRP1 (figure 36), le réseau mitochondrial résiste à une fragmentation suite à l'inhibition de l'ETC et de l'ATP synthase. Ceci suggère d'autant plus que l'ATP synthase et OPA1 participent à un remodelage des membranes internes, sensibilisant les cellules à la fission. Kondadi et al., (2020) ont également montré que ce remodelage des crêtes favorisait des changements très localisés de $\Delta\Psi_m$, qui ne seraient donc pas détectable par une mesure du $\Delta\Psi_m$ globale, comme nous l'avons analysé (Kondadi et al. 2020). Il est possible que ceux-ci induisent localement le clivage d'OPA1, défavorisant in fine la fusion des membranes internes. Il serait donc également intéressant d'étudier en super-résolution STED ou Airyscan (Wolf et al. 2019) les variations locales de $\Delta\Psi_m$ suite au traitement par oligomycine et de suivre plus précisément les variations de morphologie du réseau sur des mutants OPA1 traités à l'oligomycine.

Conclusion générale

Mes travaux de thèse sont inscrits dans un contexte d'étude physiopathologique des maladies mitochondriales et plus largement sur la compréhension des mécanismes qui régissent l'activité bioénergétique et la structure des mitochondries. Ce travail aura permis de mieux définir quel « stress bioénergétique mitochondrial » conduit à la fission du réseau. En effet, nous avons vu que ni une surproduction de ROS intra-mitochondriale, ni une baisse de la synthèse d'ATP ne permettent la fission mitochondriale, contrairement à une chute du potentiel de membrane mitochondrial.

Nous avons été plus loin en montrant que l'ATP synthase conditionne la réponse à la fission en fonctionnant en mode réverse. L'implication du mode ATPase dans la dynamique mitochondriale n'a à ce jour pas été décrit. De plus, nous suggérons un lien entre l'activité de l'ATP synthase, sa structure ainsi que la dynamique des membranes internes mitochondriales dans une étape qui précéderait le recrutement de DRP1. Ainsi, la stabilisation des dimères de l'ATP synthase sensibiliserait les mitochondries à la fission.

Ce travail a contribué à mieux comprendre la relation entre la structure et la fonction des mitochondries, ce qui est essentiel pour permettre de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques aux pathologies mitochondriales héréditaires ou commune.

Fiches techniques

Fiche technique n°1 : Culture primaire de fibroblaste de peau

Milieus et réactifs :

- DMEM-F12 (PAN Biotech ; #P04-41250)
- Amniomax (Gibco ; #10744274)
- SVF (PAN Biotech ; #P40-37500)
- Sodium Pyruvate (1mM – Gibco ; #11360-093)
- Uridine (5mg/ml – Sigma ; U3750)
- Trypsine-EDTA (10X 0,5%/0,2% - PAN Biotech; #P10-024100)
- Phosphate Buffer Saline (PBS, Pan Biotech ; #P04-53500)

Drogues :

PRODUIT	REFERENCE	STOCK	CONCENTRATION FINALE
ANTIMYCINE A	A8674 - sigma	10mg/ml	10µg/ml
OLIGOMYCINE	O4876 - sigma	4mg/ml	4µg/ml
ROTENONE	R8875 - sigma	2.5mM	2µM
BMS-199264	Bm0017 - sigma	5mg/ml	30µM
HYDROCHLORIDE			

Culture des cellules :

Les fibroblastes de peau sont cultivés à 37°C, en atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans un milieu constitué de 2/3 de DMEM-F12, 1/3 d'Amnimax, 10% de SVF (concentrations finales en glucose : 1.8 g/L, glutamine : 1 mM). L'entretien des fibroblastes se fait dans un milieu supplémenté de 100µg/ml de sodium pyruvate et 50µg/ml d'uridine. Un jour avant le traitement des cellules, le milieu de culture est remplacé par un milieu sans uridine et sans sodium pyruvate afin de ne pas modifier leur métabolisme.

Récolte et utilisation des cellules :

Tous nos travaux sont réalisés sur des cellules à 50% de confluence pour l'imagerie et à 80% de confluence pour les autres expérimentations et à des passages inférieurs à 25 afin d'éviter les biais liés à la sénescence cellulaire. Les cellules sont lavées par du tampon PBS 1X puis décollées à l'aide de la trypsine-EDTA 1X. Elles sont ensuite suspendues dans du milieu de culture puis centrifugées 5min à 900 rpm. Enfin les cellules sont soit

plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C afin de réaliser des culots secs, soit elles sont directement utilisées par exemple pour les oxygraphies (fiche technique n°3).

Fiche technique n°2 : Dosage des protéines par spectrophotométrie

Ce dosage est un dosage colorimétrique réalisé à l'aide du kit BCA Protein Assay ® (FisherScientifique ; #10 678 484)

Réactifs :

- Solution d'acide bicinchoninique (solution A)
- Solution de sulfate de cuivre (solution B)
- Solution de BSA (Bovine serum albumine) à 2mg/ml

Principe :

Les protéines en milieu alcalin vont réduire les ions cuivre Cu^{2+} en ions Cu^{+} . Ces ions Cu^{+} forment un complexe soluble violet avec l'acide bicinchoninique capable d'absorber à 562nm. L'absorbance à 562nm est directement proportionnelle à la concentration protéique qui mesurée à l'aide d'une gamme étalon de BSA.

Technique :

Une gamme étalon est préparée à partir de la solution de BSA à 2mg/ml (0.125mg/ml, 0.250mg/ml, 500mg/ml et 0.750mg/ml) La dilution de la gamme étalon étant réalisée dans du NaCl, les échantillons sont également dilués dans le NaCl de façon à ce que les valeurs soient comprises dans la gamme étalon. 10µl du blanc (NaCl), des points de gamme étalon ainsi que d'échantillons sont déposés en duplicats dans une microplaque 96 puits. La solution de travail est réalisée : Le réactif B est dilué au 1/50^{ème} dans le réactif A. Puis 200µl de la solution de travail est ajoutée dans chaque puits. Enfin, la plaque est incubée 30 minutes à 37°C puis l'absorbance est lue à 562nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar® (BMG Labtech).

Fiche technique n°3 : Mesure de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial sur cellules intactes par oxygraphie

Réactifs :

- Milieu de culture
 - o DMEM-F12 (PAN Biotech ; #P04-41250)
 - o Amniomax (Gibco ; #10744274)
 - o SVF (PAN Biotech ; #P40-37500)
 - o Sodium Pyruvate (1mM – Gibco ; #11360-093)
 - o Uridine (5mg/ml – Sigma ; U3750)
- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France ; R8875) 2,5µM
- Antimycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A8674) 2µg/ml
- Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; O4876) 4µg/ml
- CCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2759) 10µM
- FCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2920) 1µM
- TMRM (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T5428) 0,5µM

Principe :

Cette technique consiste à mesurer la vitesse de consommation d'oxygène des cellules intactes par oxygraphie ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde fluorescence, l'ester métyllique de tétraméthylrhodamine (TMRM). Les cellules utilisent leurs substrats endogènes ainsi que ceux contenus dans le milieu de culture pour maintenir leur métabolisme oxydatif. La mesure de la respiration cellulaire est réalisée à l'aide d'un Oxygraphe contenant une électrode « Clark » sensible à l'oxygène (Oroboros Instrument). Cette électrode est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent, immergées dans une solution de KCl à demi saturée et isolées de la cuve par une membrane semi-perméable laissant diffuser l'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'oxygène traversant la membrane va être réduite au niveau de la cathode. Le courant créé, proportionnelle à la concentration en oxygène du milieu, est utilisé pour déterminer la concentration en oxygène et le flux, enregistrés à partir du logiciel OROBOROS Datlab. La mesure du potentiel de membrane mitochondrial est réalisée simultanément à l'aide de filtres d'excitation/émission de 525/587nm. Le TMRM s'accumule dans les mitochondries actives et émet de la fluorescence qui varie en fonction du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). Les valeurs mesurées sont inversement proportionnelles au $\Delta\Psi_m$, c'est-à-dire que plus les valeurs mesurées sont élevées, plus le TMRM est accumulé hors des mitochondries, donc le $\Delta\Psi_m$ est bas et inversement.

Technique :

L'oxygraphe est constitué de deux chambres thermostatée de 2mL, disposant d'une agitation magnétique. Avant chaque mesure, l'appareil doit être calibré dans le milieu de culture. Le 100% en oxygène est réalisé en laissant la cuve ouverte, tandis que le 0% (milieu privé en oxygène) est réalisé à l'aide de dithionite de sodium (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 71699). Pour l'étude de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondriale sur cellules fibroblastique, toutes les mesures s'effectuent à 37°C. Le signal du TMRM est calibré par étalonnage avec des ajouts progressifs de 0.125µM de TMRM pour une concentration finale de 0.5µM avant et à la fin de chaque expérience afin de s'assurer de la stabilité du signal.

Protocole :

Les cellules contenues dans 2T75 sont récoltées par action de la trypsine. $7 \cdot 10^6$ cellules sont nécessaires à la réalisation de l'expérience. Les cellules sont reprises dans 200µl de milieu de culture, puis 100µl sont ajoutés à la seringue dans chaque cuve de l'oxygraphe. Lorsque les pentes correspondant à la respiration basale ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial sont stabilisées, la séquence d'injection peut commencer. Il a été réalisé 6 protocoles d'injections différents :

<i>Protocole 1</i>	<i>Protocole 2</i>	<i>Protocole 3</i>	<i>Protocole 4</i>	<i>Protocole 5</i>	<i>Protocole 6</i>
Injection de 2µl d'éthanol	Injection de 2µl de Roténone (2.5µM)	Injection de 2µl d'Antimycine A (2µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml) + 1µl d'Antimycine A (2µg/ml)	Injection de 2µl de CCCP (10µM)
Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min
Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl de CCCP (10µM)	Injection de 2µl de CCCP (10µM)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)
Injection de 2µl de CCCP (10µM)	Injection de 1µl de CCCP (10µM)	Injection de 1µl de CCCP (10µM)	Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM
Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM			

A la fin de l'oxygraphie, 1,5ml de suspension de chaque chambre est prélevé afin de doser les protéines et rapporter chaque respiration par mg de protéines.

Fiche technique n°4 : Mesure de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondrial sur cellules perméabilisées par oxygraphie

Réactifs :

- Tampon Rustin avec ou sans BSA :
 - o KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P9791) 10 mM
 - o Mannitol (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M9647) 300 mM
 - o Potassium chloride (KCl) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P3911) 10 mM
 - o MgCl₂ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M1028) 5mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1 mg/ml
 - o Ajuster à pH 7,4
- Digitonine (Sigma Aldrich, Lyon, France; D141) 5 mg/ml, chauffer à 95°C, 2.5 min.
- Malate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M1000) 5 mM, pH 7,4
- Sodium Pyruvate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P2256) 2,5 mM
- Succinate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S3674) 5 mM pH 7,4
- ADP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 01905) 0.5 mM
- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France ; R8875) 2,5µM
- Antimycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A8674) 2µg/ml
- Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; O4876) 4µg/ml
- CCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2759) 10µM
- FCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2920) 1µM
- TMRM (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T5428) 0,5µM

Principe :

Cette technique consiste à mesurer la vitesse de consommation d'oxygène des cellules perméabilisées ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde fluorescence, TMRM. En opposition à la technique n°3 sur cellules intactes, les substrats sont apportés à la chaîne respiratoire. Les mesures sont réalisées à l'aide oxygraphe Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Autriche) contenant une électrode de « Clark » sensible à l'oxygène fonctionnant ainsi que des filtres détectant la fluorescence selon le même principe que celui décrit dans la fiche n°3.

Technique :

De la même façon que la fiche n°3, avant chaque mesure, l'appareil doit être calibré dans le tampon Rustin. Le 100% en oxygène est réalisé en laissant la cuve ouverte, tandis que le 0% (milieu privé en oxygène) est réalisé

à l'aide de dithionite de sodium. Pour l'étude de la respiration cellulaire et du potentiel de membrane mitochondriale sur cellules fibroblastique, toutes les mesures s'effectuent à 37°C. Le signal du TMRM est calibré par étalonnage avec des ajouts progressifs de 0.125µM de TMRM pour une concentration finale de 0.5µM avant et à la fin de chaque expérience afin de s'assurer de la stabilité du signal.

Protocole :

Les cellules contenues dans 2T75 sont récoltées par action de la trypsine. 7.10⁶ cellules sont nécessaires à la réalisation de l'expérience. Les cellules sont reprises dans 50µl par million de cellules dans du tampon Rustin sans BSA. Puis, les cellules sont perméabilisées à l'aide de la digitonine à raison de 15µg (3µl) de digitonine par million de cellules et mises sous agitation douce pendant 2,5min. L'action de la digitonine est stoppée par l'ajout de 5 volumes de tampon Rustin avec BSA. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation 2min30s à 800g. Enfin, le culot cellulaire est repris avec 200µl de tampon Rustin avec BSA et ajouté à la seringue au 1,9ml de ce même tampon contenu dans la cuve de l'oxygraphe. Lorsque les pentes correspondant à la respiration basale ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial sont stabilisées, la séquence d'injection peut commencer. De la même manière que la fiche n°3, il a été réalisé 6 protocoles d'injections différents :

<i>Protocole 1</i>	<i>Protocole 2</i>	<i>Protocole 3</i>	<i>Protocole 4</i>	<i>Protocole 5</i>	<i>Protocole 6</i>
Injection de 10µl de Pyruvate	Injection de 10µl de Pyruvate	Injection de 10µl de Pyruvate	Injection de 10µl de Pyruvate	Injection de 10µl de Pyruvate	Injection de 10µl de Pyruvate
Injection de 20µl de Malate	Injection de 20µl de Malate	Injection de 20µl de Malate	Injection de 20µl de Malate	Injection de 20µl de Malate	Injection de 20µl de Malate
Injection de 20µl de Succinate	Injection de 20µl de Succinate	Injection de 20µl de Succinate	Injection de 20µl de Succinate	Injection de 20µl de Succinate	Injection de 20µl de Succinate
Injection de 10µl d'ADP	Injection de 10µl d'ADP	Injection de 10µl d'ADP	Injection de 10µl d'ADP	Injection de 10µl d'ADP	Injection de 10µl d'ADP
Injection de 2µl d'éthanol	Injection de 2µl de Roténone (2.5µM)	Injection de 2µl d'Antimycine A (2µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml) + 2µl d'Antimycine A (2µg/ml)	Injection de 2µl de FCCP (1µM)
Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min	Attendre 30min
Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl de CCCP (10µM)	Injection de 2µl de CCCP (10µM)	Injection de 2µl d'oligomycine (4µg/ml)
Injection de 2µl de FCCP (10µM)	Injection de 1µl de FCCP (10µM)	Injection de 1µl de FCCP (10µM)	Injection de 0.125µM de	Injection de 0.125µM de	Injection de 0.125µM de

			TMRM	TMRM	TMRM
Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM	Injection de 0.125µM de TMRM			

A la fin de l'oxygraphie, 1,5ml de suspension de chaque chambre est prélevé afin de doser les protéines et rapporter chaque respiration par mg de protéines.

Fiche technique n°5 : Mesure de la respiration cellulaire et des espèces réactives de l'oxygène sur cellules perméabilisées par oxygraphie

Réactifs :

- Tampon Rustin avec ou sans BSA :
 - o KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P9791) 10 mM
 - o Mannitol (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M9647) 300 mM
 - o Potassium chloride (KCl) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P3911) 10 mM
 - o MgCl₂ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M1028) 5mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1 mg/ml
 - o Ajuster à pH 7,4
- Digitonine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D141) 5 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- Malate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M1000) 5 mM, pH 7,4
- Pyruvate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P2256) 2.5 mM
- Succinate (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S3674) 10 mM, pH 7.4
- ADP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 01905) 0.5 mM
- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France ; R8875) 2,5µM
- Antimycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A8674) 2µg/ml
- Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; O4876) 4µg/ml
- CCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2759) 10µM
- FCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2920) 10µM
- Hydrogène peroxyde stabilisé (H₂O₂) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 516813) 0,1µM
- Amplex Red (Invitrogen ; A122222) 10µM
- Horse Raddish Peroxydase (HRP) 1U/ml
- Superoxyde dismutase (SOD) 5U/ml

Principe :

Cette technique consiste à mesurer la vitesse de consommation d'oxygène des cellules perméabilisées ainsi que les ions superoxydes (O₂⁻) produit par la chaîne respiratoire à l'aide de la sonde fluorescence l'Amplex Red en présence d'HRP. Combiné à l'HRP, l'Amplex Red est oxydé par l'H₂O₂ en résorufine, une molécule fluorescente. Les ions superoxydes O₂⁻ sont convertis en H₂O₂ par un excès de superoxyde dismutase (SOD). Cette analyse mesure donc la production à la fois de superoxyde et d'H₂O₂. Les mesures sont réalisées à l'aide oxygraphe Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Autriche) contenant une électrode de « Clark » sensible à l'oxygène fonctionnant ainsi que d'un capteur optique à LED et d'une photodiode spécifique qui émettent des photons

d'excitation à 525nm et détectent la fluorescence émise à 587nm, le principe est le même que celui décrit dans la fiche n°3.

Technique :

De la même façon que la fiche n°3, avant chaque mesure, l'appareil doit être calibré dans le tampon Rustin. Le 100% en oxygène est réalisé en laissant la cuve ouverte, tandis que le 0% (milieu privé en oxygène) est réalisé à l'aide de dithionite de sodium. Pour l'étude de la respiration cellulaire et des ions superoxydes sur cellules fibroblastique, toutes les mesures s'effectuent à 37°C. Le signal fluorescent est calibré par ajout de 2µl d'Amplex Red, 4µl d'HRP, 2µl de SOD et un étalonnage avec des ajouts progressifs de 5µl d' H₂O₂ afin de s'assurer de la stabilité du signal.

Protocole :

Les cellules contenues dans 2T75 sont récoltées par action de la trypsine. 7.10⁶ cellules sont nécessaires à la réalisation de l'expérience. Les cellules sont reprises dans 50µl par million de cellules dans du tampon Rustin sans BSA. Puis, les cellules sont perméabilisées à l'aide de la digitonine à raison de 15µg de digitonine par million de cellules et mises sous agitation douce pendant 2,5min. L'action de la digitonine est stoppée par l'ajout de 5 volumes de tampon Rustin avec BSA. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation 2min30s à 800g. Enfin, le culot cellulaire est repris avec 200µl de tampon Rustin avec BSA et ajouté à la seringue au 1,9ml de ce même tampon contenu dans la cuve de l'oxygraphe. Lorsque les pentes correspondant à la respiration basale ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial sont stabilisées, la séquence d'injection peut commencer. Il a été réalisé 5 protocoles d'injections différents :

<i>Protocole 1</i>	<i>Protocole 2</i>	<i>Protocole 3</i>	<i>Protocole 4</i>	<i>Protocole 5</i>
Injection de 10µl de Pyruvate				
Injection de 20µl de Malate				
Injection de 20µl de Succinate				
Calibrer le signal en injectant 3x5µl d'H2O2				
Injection de 10µl d'ADP				
Laisser agir 10min				
Calibrer le signal en injectant 2x5µl				

d'H2O2	d'H2O2	d'H2O2	d'H2O2	d'H2O2
Injection de 2µl d'éthanol	Injection de 2µl de Roténone (2.5µM)	Injection de 2µl d'Antimycine A (2µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml)	Injection de 2µl d'Oligomycine (4µg/ml) + 2µl d'Antimycine A (2µg/ml)
Calibrer le signal en injectant 3x5µl d'H2O2	Calibrer le signal en injectant 2x5µl d'H2O2			
Attendre 15min				

A la fin de l'oxygraphie, 1,5ml de suspension de chaque chambre est prélevé afin de doser les protéines et rapporter chaque respiration par mg de protéines.

Fiche technique n°6 : Western-Blot

Réactifs :

- Tampon Tris-SDS 2X pH 8.8 (Stocké à 4°C)
 - Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 1M
 - Sodium dodecyl sulfate (SDS) (BioRad, Paris, France ; 1610418) 0.2%
 - Ajuster à pH 8.8
- Tampon Tris-SDS 2X pH 6.8 (Stocké à 4°C)
 - Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 325mM
 - Sodium dodecyl sulfate (SDS) (BioRad, Paris, France ; 1610418) 0.2%
 - Ajuster à pH 6.8
- Tampon électrophorèse 10X pH 8.3 (Stocké à 4°C)
 - Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 25mM
 - Sodium dodecyl sulfate (SDS) (BioRad, Paris, France ; 1610418) 1%
 - Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; G7126) 192mM
 - Ajuster à pH 8.3
- Tampon TBS 10X pH 7.4 (Stocké à 4°C)
 - NaCl (Fischer Scientifique, France ; S3161) 0,2M
 - KCL (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P3911) 2,5 mM
 - Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 25 mM
 - Ajuster à pH 7.4

Principe :

Le western blot est constitué d'une étape d'électrophorèse pour la séparation des protéines, celle-ci se fait en condition dénaturante (présence du détergent SDS (dodécylsulfate de sodium), de DTT et 2-mercaptoéthanol). De par la présence du détergent anionique SDS (charge négative des protéines), la séparation des protéines sur le gel d'électrophorèse se fait selon leur poids moléculaire. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de rétention protéique, la détection des protéines cibles se base sur la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire qui est à son tour reconnu par un anticorps secondaire fluorescent. La détection du complexe immunologique s'effectue par fluorescence par l'excitation en infra-rouge des anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorophore à 680nm (Abcam 186694) et anti-lapin à 790nm (Abcam 186697). Cette technique permet donc de déterminer la présence ou non, ainsi que la quantité (méthode semi-quantitative) d'une protéine contenue dans un échantillon.

Technique :

1. Préparation des gels :

Les gels sont coulés entre deux plaques en verre fixe sur un support en plastique et un peigne de 10 puits (1.5mm) est inséré entre les deux plaques (BioRad, Paris, France ; 1658051). Les gels sont constitués de deux parties :

Gels de séparation :

Pour deux gels :					
Réactifs	7%	8%	10%	12,5%	15%
TRIS-SDS pH 8,8	12,5 mL				
Acrylamide 30% (BioRad, Paris, France ; 161-0158)	5,8 mL	6,7 mL	8,3 mL	10,4 mL	12,5 mL
H ₂ O	6,5 mL	5,6 mL	4,5 mL	3.9 mL	-
Ammonium persulfate (APS) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A3678)	250 µL				
TEMED (Fisher BioReagents FLBP15020)	12,5 µL				

Gel de concentration ou « stacking » :

Pour deux gels :	
TRIS-SDS pH 6,8	5 mL
Acrylamide	1 mL
H ₂ O	3.9 mL
APS	100 µL
TEMED	10 µL

2. Préparation des échantillons :

Les western-Blots ont été réalisés à partir de culots cellulaires secs issus de la culture de fibroblastes. Les échantillons ont été repris dans du tampon RIPA 1X + anti-protéases (Roche 11836145001) à hauteur de 15µl

par millions de cellules. Une étape de centrifugation à 16 000g pendant 1 min est nécessaire afin d'éliminer la fraction insoluble et récupérer les protéines solubles contenues dans le surnageant. Un dosage de protéines a été réalisé afin de déterminer la concentration protéique de chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite dilués dans une solution d'anti-protéases + du tampon Laemmli 1X final (Bio Rad Ref. 1610747) et du 2-Mercaptoethanol (Sigma M6250). Enfin ils sont dénaturés en les chauffant à une température de 55°C pendant 10min.

3. L'électrophorèse sur gel :

Les échantillons sont chargés dans les puits des gels d'électrophorèse Afin de contrôler la migration et vérifier la taille des protéines cibles, un marqueur standard protéique de masses moléculaires connues a été utilisé : Ladder Protein PageRuler (Thermo Scientific 26616). La migration des protéines se fait dans une cuve contenant du tampon électrophorèse 1X 10min à 100V afin que les protéines rentrent dans le gel de concentration puis 1h30 à 2h à 150V afin de séparer les protéines.

4. Transfert sur membrane nitrocellulose :

Les protéines sont transférées par transfert semi-sec sur une membrane nitrocellulose (Invitrogen IB23001) grâce au système de transfert sec iBlot (Invitrogen IB21001).

5. Saturation des membranes :

Une fois le transfert sur membrane effectué, la membrane est incubée 2h sous agitation et à température ambiante dans une solution de 75% de Odyssey Blocking Buffer TBS (Licor 927-60001) et 25% de TBS 1X. La membrane est ensuite rincée deux fois avec du TBS 1X.

6. Incubation des anticorps primaires et secondaires :

La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour cette technique se trouve

Tableau 11 et

Tableau 12.

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire correspondant à la protéine recherchée pendant 2h sous agitation à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'anticorps est dilué selon les indications du fournisseur dans du TBS 1X – Tween20 0.1% supplémenté à 25% d'Odyssey Blocking Buffer TBS (Licor 927-60001). La membrane est ensuite rincée deux fois au TBS 1X - Tween20 0.1%, puis incubée 2h sous agitation à température ambiante avec un anticorps secondaire. Les membranes sont ensuite révélées avec la méthode de détection par fluorescence par le LI-COR®, et analysées par le logiciel Image Studio Ver 2.1.

Anticorps primaires et secondaire utilisés :

Anticorps primaire						
Sous-unité	Nom	Cible	Dilution	Espèce	Référence	Type d'expérience
	ATP5a	Sous unité α de l'ATP synthase	1/1000	Souris	Ab 110273	BN-page chimi
	ATP5b	Sous unité β de l'ATP synthase	1/1000	Souris	Ab 14730	BN-page chimi
	SDHA	Complexe II	1/1000	Souris	Ab 14715	BN-Page chimi/fluo et Western-Blot
	NDUFS1	Complexe I	1/1000	Lapin	Ab 169540	BN-page fluo
	IIICore2	Complexe III	1/1000	Souris	Ab 14745	BN-page fluo
	COX1	Complexe IV	1/1000	Souris	Ab 14705	BN-page fluo
	COXIV	Complexe IV	1/1000	Souris	Ab 14744	BN-page fluo
	OPA1	OPA1	1/1000	Souris	BD Biosciences 612607	Western-Blot
	OMA1	OMA1	1/1000	Lapin	NBP2-30971	Western-Blot
	DRP1	DRP1	1/1000	Souris		Western-Blot
	DRP1 Ser 616	Ser 616	1/1000	Lapin		Western-Blot
	DRP1 Ser 637	Ser 637	1/1000	Lapin		Westner-Blot
	α-Tubuline	α -Tubuline	1/1000	Souris	Ab 7291	Western-Blot

Tableau 11 : Anticorps primaires nécessaires aux Western-Blot et BN-PAGE

Anticorps secondaire						
Cible	Espèce	Fournisseur	Dilution	Référence	Marqueur fluorescent	Type d'expérience
Anti-souris	Chèvre	Abcam	1/10000	Ab 186694	Alexa Fluor 680	BN-page fluo et Western- Blot
Anti-lapin	horseradish peroxidase- conjugated α -mouse IgG	GE Healthcare UK limited	1/10000	LNA931V/AH		BN-page chimi
Anti-souris	Chèvre	Abcam	1/10000	Ab 186697	Alexa Fluor 790	BN-page fluo et Western- Blot
Anti-lapin	horseradish peroxidase- conjugated α -rabbit IgG	GE Healthcare UK limited	1/10000	LNA932V/AH		BN page- chimi

Tableau 12 : Anticorps secondaires nécessaires aux Western-Blot et BN-PAGE

Fiche technique n°7 : Enrichissement en mitochondries de fibroblastes

L'enrichissement des mitochondries se base sur le principe de centrifugations différentielles.

Réactifs :

- | | |
|--|-----------------------------------|
| - Digitonine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D141) | 4 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min. |
| - Phosphate Buffer Saline (PBS, Pan Biotech ; #P04-53500) | 1X |
| - Acide aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A7824) | 2M |
| - Bis-tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; B7535) | 500mM |
| - Anti-protéase (Roche 11836145001) | 1X |
| - Tampon AC/BT | |
| o Acide aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A7824) | 1,5M |
| o Bis-tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; B7535) | 75mM |
| o Ajuster à pH 7 | |

Technique :

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Deux boîtes de T75 à 80-90% de confluence sont nécessaires pour l'isolement des mitochondries. Les boîtes sont trypsinées et les cellules sont poolées afin d'obtenir un culot sec d'environ 5 à 7 millions de cellules. Le culot sec peut être conservé à -80°C avant l'isolement.

Le culot sec de 7 millions de cellules est re-suspendu dans 100µl de PBS 1X, puis la digitonine diluée dans du PBS 1X est ajoutée à volume égal. Le culot est ensuite incubé 10min sous agitation douce en chambre froide (4°C). L'action de la digitonine est alors stoppée par l'ajout de 1ml de PBS 1X, puis le culot est centrifugé 10min à 10 000g à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est de nouveau rincé avec 1ml de PBS 1X. Enfin les échantillons sont de nouveau centrifugés pour les enrichir en mitochondries. Le surnageant est retiré et les échantillons sont dilués dans un tampon AC/BT + anti-protéase selon une concentration protéique d'environ 10mg/ml. 2x2µl sont prélevés pour réaliser un dosage de protéine sur les échantillons et vérifier la concentration protéique obtenue.

Fiche technique n°8 : Blue native poly-acrylamide gel electrophoresis (Blue Native-PAGE)

Réactifs et matériels :

Solubilisation des complexes :

- Digitonine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D141) 50 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- Acide aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A7824) 2M
- Bis-tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; B7535) 500mM
- EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 100mM
- Anti-protéase (Roche 11836145001) 1X
- Ferritine forme quine spleen (Sigma Aldrich, Lyon, France ; F4503)
- Tampon AC/BT (Stocker à 4°C)
 - o Acide aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A7824) 1,5M
 - o Bis-tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; B7535) 75mM
 - o Ajuster à pH 7
- Loading Sample Buffer pH 7 (Stocker à 4°C)
 - o Acide aminocaproïque (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A7824) 750mM
 - o Bis-tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; B7535) 50mM
 - o EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 0.5mM
 - o Blue G-250 (BioRad, Paris, France ; 161-0406) 5%
 - o Ajuster pH 7

Pour la migration :

- Tampon électrophorèse A (Anode Buffer) (Stocker à 4°C)
 - o Running Buffer 20X (Fischer Scientifique, France ; 10423092) 1X
- Tampon électrophorèse B (Cathode Buffer) (Stocker à 4°C)
 - o Cathode buffer Additive 20X (Fischer Scientifique, France ; 10779663) 1X
- NativePage 3-12% Bis tris Gel (Fischer Scientifique, France ; BN1001BOX)

Pour le transfert :

- Tampon de transfert (Stocker à 4°C)
 - o Trizma Base (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 25mM

- Glycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; G7126) 26,9mM
- Méthanol (VWR Prolabo, France ; 20847.295) 20%

Principe :

A la différence du Western-Blot, cette technique permet d'analyser l'expression de protéines ou de complexes multi-protéine en condition native. Grâce à des détergents zwitterioniques et non-inioniques, les protéines ou les complexes multi-protéiques sont solubilisés et séparés en condition non dénaturante selon leur poids moléculaire sur un gel de gradient d'acrylamide. Le bleu de coomassie ou Blue G-250 en se liant aux protéines permet à la fois la visualisation des protéines mais également une meilleure « résolution » des bandes protéiques. Comme pour le Western-Blot, l'électrophorèse est suivie d'un transfert sur membrane puis d'une révélation des protéines par détection d'un motif antigénique (anticorps primaire).

Technique :

1. Solubilisation des complexes :

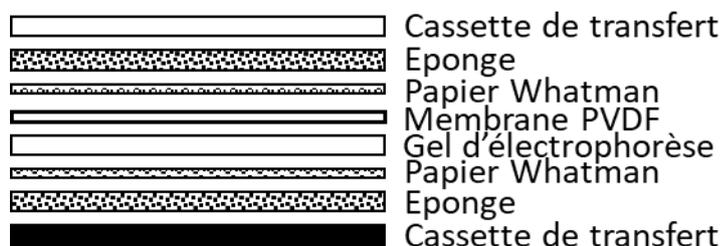
Pour l'analyse des Supercomplexes, 60 µg des échantillons enrichis en mitochondries (fiche technique n°7) sont repris dans du tampon AC/BT + anti-protéase 1X QSP 30µl. La solubilisation des Supercomplexes s'effectue grâce à l'ajout de 6g de digitonine par gramme de protéines. Pour l'analyse du dimère de l'ATP synthase, 30µg de l'échantillon enrichi en mitochondries est repris dans du tampon AC/BT + anti-protéase 1X QSP 30µl. La solubilisation du dimère de l'ATP synthase s'effectue grâce à l'ajout de 3g de digitonine par gramme de protéines. Les échantillons sont ensuite mis sous agitation douce 10min à 4°C. Afin de culoter les débris membranaires, les échantillons sont centrifugés à 20 000g pendant 20 min à 4°C. Enfin, les échantillons sont supplémentés avec 0.75µl de tampon de charge pour 25µl de surnageant (1/4 de Blue G-250 / g de détergent).

2. Electrophorèse sur gel :

Les échantillons sont chargés dans les puits où les protéines sont séparées par électrophorèse et migrent selon leur poids moléculaire. Afin de déterminer leur taille, un marqueur de masse moléculaire connue a été utilisé : la ferritine. La migration des complexes protéiques se fait dans une cuve (Système Surelock Xcell ; Fischer Scientifique, France ; EI0002) contenant au niveau externe de l'anode buffer et au niveau interne le cathode buffer. 30min à 100V sont nécessaire pour que les échantillons pénètrent dans le gel de concentration, puis 30min environ à 150V sont nécessaire pour atteindre le premier tiers du gel. Une fois atteint, le tampon cathode buffer contenant du bleu de Coomassie est retiré et remplacé par du tampon anode buffer. La migration continue à 200V jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel.

3. Transfert sur membrane :

Le transfert est réalisé sur une membrane PVDF (GE Healthcare 10600023) hydratée préalablement par immersion dans un bain de méthanol, puis dans du tampon de transfert. Le gel d'électrophorèse est préparé en « sandwich » comme le modèle ci-dessous pour le transfert : il est placé sur la membrane PVDF, qui est placé sur du papier Whatman, placé lui-même sur une éponge, le tout immergé dans le tampon de transfert.



La cassette de transfert contenant le sandwich est placée dans le système Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell ® (BioRad, Paris, France ; 1703930) contenant du tampon de transfert. Le transfert s'effectue en chambre froide à 4°C dans un bac rempli de glace pendant 1H45 à 100V pour 2 gels.

Pour l'analyse des Supercomplexes (analyse par fluorescence), la membrane est rincée 3x5min au méthanol afin d'enlever toute trace de bleu de Coomassie qui pourrait gêner la révélation en fluorescence.

4. Saturation des membranes :

Pour l'analyse des Supercomplexes, une fois le transfert sur membrane effectué, la membrane est incubée 2h sous agitation et à température ambiante dans une solution de 75% de Odyssey Blocking Buffer PBS (Licor 927-75001) et 25% de PBS 1X. La membrane est ensuite rincée deux fois avec du PBS 1X.

Pour l'analyse du dimère de l'ATP synthase, une fois le transfert sur membrane effectué, la membrane est incubée 2h sous agitation et à température ambiante dans une solution de lait 5% dilué dans du TBS 1X - Tween20 0.1%. La membrane est ensuite rincée deux fois avec du TBS 1X.

6. Incubation des anticorps primaires et secondaires :

La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour cette technique se trouve

Tableau 11 et

Tableau 12.

Pour l'analyse des Supercomplexes, la membrane est incubée avec les anticorps primaires correspondant aux protéines recherchées pendant 2h sous agitation à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'anticorps est dilué selon les indications du fournisseur dans 25% de TBS 1X - Tween20 0.1% et 75% de Odyssey Blocking Buffer PBS. La membrane est ensuite rincée deux fois au TBS 1X - Tween20 0.1%, puis incubée 2h sous

agitation à température ambiante avec les anticorps secondaires fluorescents. Les membranes sont ensuite révélées avec la méthode de détection par fluorescence par le LI-COR®, et analysées par le logiciel Image Studio Ver 2.1.

Pour l'analyse du dimère de l'ATP synthase, la membrane est incubée avec les anticorps primaires correspondant aux protéine recherchées pendant 2h sous agitation à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'anticorps est dilué selon les indications du fournisseur dans du lait 1% dilué dans du TBS 1X - Tween20 0.1%. La membrane est ensuite rincée deux fois au TBS 1X - Tween20 0.1%, puis incubée 2h sous agitation à température ambiante avec les anticorps secondaires (couplés au substrat de la HRP). Les membranes sont ensuite révélées avec la méthode de détection par chimiluminescence avec le kit de révélation « Pierce™ ECL Western-Blotting Substrat » (Fischer Scientifique, France ; 32109) par le LI-COR®, et analysées par le logiciel Image Studio Ver 2.1.

Fiche technique n°9 : Microscopie à fluorescence sur fibroblastes en culture

Préparation des échantillons :

Les cellules sont mises en culture dans des chambres à deux ou quatre puits (Labtek, Nunc International, Naperville, IL) 24h avant l'expérience pour l'étude de la morphologie du réseau mitochondrial. Les cellules des témoins et des patients sont ensemencées dans du milieu DMEM F12-SVF 10% sans uridine, ni sodium pyruvate à raison de 30 000 cellules dans les chambres à deux puits et de 15 000 cellules dans les chambres à quatre puits.

Marquage de la mitochondrie :

Les fluorophores utilisés sont : le Mitotracker® Green (Molecular Probes, CA, USA) : Les fibroblastes sont incubés avec 100 nM de Mitotracker® Green pendant 30 minutes à 37°C avant l'acquisition. Le milieu est changé avant de réaliser l'acquisition. Ces molécules ont la propriété de se fixer sur les membranes chargées des mitochondries, même si le potentiel de membrane mitochondrial est affecté . Le potentiel de membrane mitochondrial peut-être évalué par la sonde TMRM (Molecular Probes, CA, USA) : Les fibroblastes sont incubés avec 20 nM de TMRM pendant 30 minutes à 37°C avant l'acquisition. Le milieu est conservé pendant la réalisation de l'expérience (Ref : Perry biotechnique 2011).

Principe :

Le microscope utilisé est un microscope inversé à champ large Nikon eclipse Ti (Nikon, Tokyo, Japon) équipé d'une caméra Andor NEO sCOMS avec des filtres. Il est composé d'une source de lumière LED, permettant un éclairage puissant et stable dont le spectre de la lumière émit possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores. Le principe de ce type de microscopie est de marquer les molécules ou les structures d'intérêt avec une sonde fluorescente capable d'émettre elle-même de la lumière qui est récupérée par les capteurs de la caméra. Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon d'une énergie suffisante, elle se désexcite en émettant un photon d'énergie plus basse. L'observation des cellules se fait ensuite avec l'objectif à immersion dans l'huile x100 auquel est ajouté une lentille x1,5 (Nikon Plan Apo100x, Tokyo, Japon, N.A. 1.45). Le logiciel d'acquisition utilisé est MetaMorph® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). 35 plans d'images en z sont pris avec des incréments de 0.1 µm à l'aide d'une surplatine piezo de précision. Au minimum, 12 acquisitions sont réalisées par puits.

La déconvolution et le traitement d'images :

Afin de corriger les aberrations optiques (dus aux objectifs, aux vibrations, à l'huile utilisée sur l'objectif 100X) un processus est utilisé : la déconvolution. Le logiciel utilisé pour la déconvolution est Huygens®. La déconvolution permet de corriger ces aberrations optiques et réattribuer la fluorescence qui s'est dispersée à son emplacement d'origine. Ainsi on améliore la qualité des images en obtenant un meilleur rapport signal/bruit. Le logiciel Imaris® (Bitplane, Zurich, Switzerland) a ensuite été utilisé pour la reconstruction en 3D des images. Ce logiciel permet grâce au module iso-surface d'étudier la longueur des mitochondries, la fragmentation du réseau, l'état de connectivité des mitochondries, ainsi que le volume mitochondrial.

Fiche technique n°10 : Microscopie Super-Résolution (dSTORM)

Principe :

La microscopie optique à fluorescence, à une résolution xy de 200 nm et de 600 en z, ce qui n'est pas adaptée pour certaines études. C'est pourquoi des techniques dite de microscopie super-résolution ont été développées. La techniques de microscopie super-résolution utilisée ici est le dSTORM, le principe se base sur la localisation de molécules uniques, c'est-à-dire que chaque signal obtenu correspond au signal d'une seule molécule. On obtient ainsi différentes images avec un clignotement de molécules fluorescentes/fluorophores activées, ce qui permet d'éviter le chevauchement des signaux. De plus, un même fluorophore émet un signal plusieurs fois, ce qui permet une meilleure information statistique de sa localisation. L'ensemble de ces paramètres permet d'atteindre une résolution de l'ordre de 20nm en xy et 50 en Z. La résolution en Z est obtenue grâce à une lentille supplémentaire placée dans le trajet optique qui permet de contrôler la déformation des PSF (point spread function).

Préparation des échantillons :

Pour la microscopie super-résolution, les cellules sontensemencées 24h auparavant dans des plaques 6 puits contenant une lamelle dégraissée. Chaque puit contient environ 150 000 cellules pour un volume final de 2 ml de milieu DMEM-F12-SVF 10%, sans uridine, ni sodium pyruvate. Après 24h d'incubation dans le puits, les cellules sont fixées à l'aide de 1ml de méthanol absolu incubé 4min a -20°C. Cette étape est suivie de trois lavages au PBS. Les sites de marquages aspécifiques sont saturés pendant 15 minutes avec une solution de PBS-BSA 5% (Sigma) et 1% de Triton X-100 (Sigma) pour la perméabilisation des membranes. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et incubées avec l'anticorps primaires de notre choix dilué selon les indications du fournisseur dans la solution de PBS-BSA 5%, Triton 1%. La préparation est placée à 4°C sur table agitante overnight.

Microscopie directe à reconstruction optique stochastique (dSTORM) :

La microscopie de reconstruction optique stochastique (STORM) est basée sur le clignotement de molécules fluorescentes par excitation et extinction. Après lavages au PBS 1X, les anticorps secondaires sont incubés 2h sous agitation après dilution au 1/10 000. Trois lavages au PBS sont ensuite effectués. Les cellules sont conservées dans une solution de PBS 1X contenant de la streptomycine et de la pénicilline 1X (Gibco). Des microbilles fluorescentes résistantes au photoblanchiment (TetraSpeck microsphères, 0,1µm T7279 INVITROGEN) sont déposées sur la lamelle et laissées sédimenter pendant 20 minutes à l'abri de la lumière afin de servir de Fiducial, un marqueur de position XY permanent. Le montage des lamelles pour la microscopie dSTORM se réalise à partir de lame ayant un cavité centrale concave. 50 µl de tampon oxydoreducteur (Nanoscopy Smart Kit Abbelight) est déposé sur la lame puis la lamelle portant les cellules est retournée,

déposée et scellée à la lame avec de la pâte dentaire. Le tampon utilisé permet d'être dans des conditions oxydoréductrices idéales pour le dSTORM, en effet en condition basale les fluorophores s'éteignent complètement après leur excitation à une forte intensité laser alors que ce tampon permet au fluorophore d'atteindre un état intermédiaire (sombre) après leur excitation qui permet le retour de la fluorescence et créer un cycle de clignotements des fluorophores.

Principe :

L'acquisition est réalisée avec le même microscope que précédemment, cependant la caméra utilisée est l'Evolve (Photometrics®) et la puissance laser est augmentée. La lame est placée dans une enceinte thermostatée opaque de 25 °C. L'objectif utilisée est le x100 à immersion auquel est ajouté une lentille x1,5. Les fluorophores sont excités par des lasers de différentes longueurs d'ondes. Nous utilisons la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) qui consiste en l'illumination de la préparation par le laser via un angle qui permet d'exciter uniquement les fluorophores présents sur une partie la plus proche de la lamelle (100aine de nanomètres). Cela limite ainsi le bruit de fond et permet d'obtenir une meilleure résolution. Le logiciel iLas® est utilisé pour définir l'intensité du laser et les images sont ensuite acquises par le logiciel MetaMorph® (Molecular Devices). Le seuil du signal fluorescent que l'on souhaite enregistrer est réglé via Wavetracer®. Le dSTORM nécessite un temps d'exposition de 60 ms lors de l'acquisition. L'image est obtenue en 10 MHz avec un gain de 300. 3 000 images sont acquises et cela est répété 3 à 6 fois de suite.

Traitement des images :

Le logiciel PalmTracer® extrait des différentes images, les coordonnées des signaux en XYZ enregistrés lors de l'acquisition. A partir de ces coordonnées le logiciel Imaris® est utilisé pour effectuer le traitement 3D et reconstituer l'image formée par le clignotement des molécules uniques.

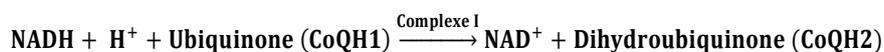
Fiche technique n°11 : Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (complexe I) sur fibroblastes

Réactifs :

- Tampon A pH 7.2 (tampon de re-suspension des cellules)
 - o Saccharose (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S5016) 250mM
 - o Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 20mM
 - o EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 2mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1mg/ml
- Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P9791) pH 7.4 100mM
- Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 60178) 500mM
- Azide de sodium (NaN₃) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S2002) 1M
- BSA (sérum albumine bovine) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 50mg/ml
- Ubiquinone 1 (CoQH₁) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C7956) 2,5mM
- 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D1875) 5mM
- NADH (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 10128023001) 12mM
- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France ; R8875) 2,5mM

Principe :

Le complexe I transfère les 2 électrons issus de l'oxydation du NADH, H⁺ à un accepteur quinone qui ici est l'Ubiquinone 1 (CoQH₁). La réaction est donc :



Ce dosage est réalisé en présence d'un accepteur d'électrons artificiel qui est le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP). Ceci permet d'éviter l'inhibition de la réaction en acceptant les électrons de la dihydroubiquinone (CoQH₂). La réaction est donc :



Ainsi l'activité est mesurée en suivant l'oxydation du DCPIP à une absorbance de 600nm. Cependant, la cytochrome b₅ réductase peut également oxyder le NADH. De la roténone (inhibiteur du complexe I) est donc ajoutée pour soustraire l'activité non spécifique du complexe I.

Technique :

1. Préparation des cellules :

Les cellules issues de la culture de fibroblastes primaires sont récoltées et congelées en culot sec. Les cellules sont décongelées à température ambiante, puis reprises dans du tampon A à hauteur de 50µl par million de cellules. La suspension cellulaire est ensuite plongée 3min dans de l'azote liquide et décongelée rapidement au bain marie à 37°C. Enfin la suspension est centrifugée 1 min à 20 000g, le surnageant contenant la fraction cytosolique est retiré pour garder uniquement le culot enrichi en mitochondries. Le culot est de nouveau repris par 50µl de tampon A par millions de cellules. 200µl de la suspension sont prélevées et transférées dans un truc en verre résistant à la sonication. Pour la sonication, les tubes sont complétés QSP 250µl par million de cellules de tampon A. Les cellules maintenues dans la glace sont soniquées 6 x 5s avec 30s de repos entre chaque sonication.

2. Préparation de la réaction :

Deux tubes à hémolyse en verre sont préparés avec 530µl de solution suivante :

REACTIFS	CONCENTRATION EN MM	VOLUME EN µL	CONCENTRATION FINALE EN MM
KH2PO4 PH 7.4	100	12 000	80
KCN	500	30	1
NAN3	1000	30	2
BSA	50mg/ml	300	1mg/ml
COQH1	2.5	600	0.1
DCPIP	5	225	0.075

Les tubes sont incubés 2min à 37°C, puis 250 000 cellules sont ajoutées. La réaction est déclenchée par l'ajout de 15µl de NADH (12mM). L'absorbance est lue sur 40s à 600nm grâce à un spectrophotomètre (UVmc2, SAFAS, Monaco). Enfin, 4µl de roténone est ajoutée et l'absorbance est de nouveau lue 40s à 600nm.

3. Analyse des résultats et calcul des activités :

L'activité du complexe I est déterminée grâce à la formule suivant :

$$AS(\text{cellules}) = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{molécule}} \times S_{\text{molécule}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times \rho}$$

$$AS \text{ (cellules)} = \frac{(\Delta DO^{-Rot} - \Delta DO^{+Rot})}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{n_{DCPIP}}} \times \frac{V_{total}}{V_{essai} \times \rho}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO^{-Rot} : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée sans roténone

ΔDO^{+Rot} : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM⁻¹.cm⁻¹

$S_{n_{DCPIP}}$: nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_{total} : volume total dans la cuve, en ml soit : 1

V_{essai} : volume ajouté dans la cuve, en ml, QSP 1ml de mix réactionnel soit :

ρ : masse de protéines (mg.ml⁻¹) dans 1ml de suspension

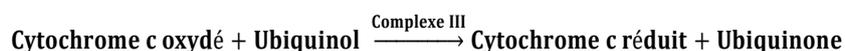
Fiche technique n°12 : Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome c Réductase (complexe III) sur fibroblastes

Réactifs :

- Tampon A pH 7.2 (tampon de re-suspension des cellules)
 - o Saccharose (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S5016) 250mM
 - o Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 20mM
 - o EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 2mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1mg/ml
- Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P9791) pH 7.8 20mM
- Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 60178) 10mM
- EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 10mM
- Azide de sodium (NaN₃) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S2002) 1M
- BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 50mg/ml
- Antimycine A (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A8674) 1 mg/ml
- Laurylmaltoside (LM) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D4641) 125mM
- Cytochrome c oxydé (Acros, Noisy-Le-Grand, France ; C7752) 1 mM
- Décyubiquinol (Enzo Life Science, Villeurbanne, France ; BML-CM115-0010) 25mM

Principe :

Cette technique se base sur la capacité du complexe III à réduire le cytochrome c oxydé grâce à l'oxydation de l'ubiquinol. Le cytochrome c réduit absorbe à 550nm, ainsi l'augmentation de l'absorbance à cette longueur d'onde sera proportionnelle à l'activité du complexe III. Afin de déterminer spécifiquement l'activité du complexe III, le dosage est réalisé avec ou sans antimycine, un inhibiteur spécifique de ce complexe. Cette technique a été adaptée à partir de celle décrite par Rustin et al (1993). La réaction catalytique est la suivante :



Technique :

1. Préparation des cellules :

Les cellules issues de la culture de fibroblastes primaires sont récoltées et congelées en culot sec. Les cellules sont décongelées à température ambiante, puis reprises dans du tampon A à hauteur de 50µl par million de cellules. La suspension cellulaire est ensuite plongée 3min dans de l'azote liquide et décongelée rapidement au bain marie à 37°C. Enfin la suspension est centrifugée 1 min à 20 000g, le surnageant contenant la fraction

cytosolique est retirée pour garder uniquement le culot enrichi en mitochondries. Le culot est de nouveau repris par 50µl de tampon A par millions de cellules.

2. Préparation de la réaction :

Deux tubes à hémolyse en verre sont préparés avec 595µl de solution suivante :

REACTIFS	CONCENTRATION EN MM	VOLUME EN µL	CONCENTRATION FINALE EN MM
KH2PO4 PH 7.8	20	15 000	10
EDTA	10	6000	2
BSA	50mg/ml	600	1mg/ml
KCN	10	900	0.24
CYTOCHROME C OXYDE	1	1200	0.04
LM	125	125	0.6
ANTIMYCINE +/-	1mg/ml	2.5	4µg/ml
H2O		6000	
CELLULES		6	200 000 cellules

Les tubes sont incubés 2min à 37°C, puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 2.5µl de décylubiquinol (DQH2) 25mM. Immédiatement après l'ajout, l'absorbance à 550nm est lue sur 60s (spectrophotomètre UVmc2, SAFAS, Monaco).

3. Analyse des résultats et calcul des activités :

L'activité du complexe III est déterminée grâce à la formule suivant :

$$AS \text{ (cellules)} = \frac{(\Delta DO^{-Ant} - \Delta DO^{+Ant})}{l \times \epsilon_{C_{yt}c} \times S_{n_{C_{yt}c}}} \times \frac{V_{total}}{V_{essai} \times \rho}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO^{-Ant} : variation de densité optique par minute à 550 nm mesurée sans antimycine

ΔDO^{+Ant} : variation de densité optique par minute à 550 nm mesurée avec antimycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε_{C_{yt}c}: coefficient d'extinction molaire du Cytochrome c à 550 nm = 18,5 mM⁻¹.cm⁻¹

S_{n_{C_{yt}c}} : nombre stoechiométrique du Cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_{total} : volume total dans la cuve, en ml soit : 1

V_{essai} : volume ajouté dans la cuve, en ml, QSP 1ml de mix réactionnel soit :

ρ : masse de protéines (mg.ml⁻¹) dans 1ml de suspension

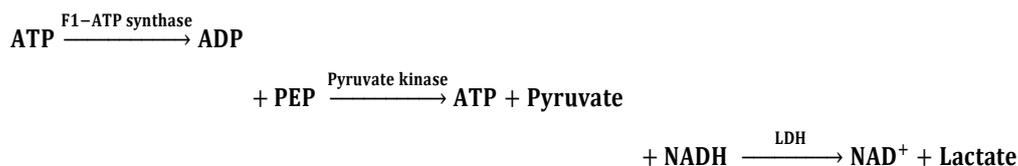
Fiche technique n°13 : Dosage de l'activité F1-ATP synthase sur fibroblaste

Réactifs :

- Tampon A pH 7.2 (tampon de re-suspension des cellules)
 - o Saccharose (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S5016) 250mM
 - o Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 20mM
 - o EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 2mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1mg/ml
- Tampon KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P9791) pH 8.1 100mM
- Pyruvate Kinase (PK) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 10109045001) 2000U/ml
- Lactate déshydrogénase (LDH) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 10127230001) 2750U/ml
- KCl (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P3911) 3.5M
- MgCl₂ (Sigma Aldrich, Lyon, France ; M1028) 1M
- Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; O4876) 1mg/ml
- Antimycine (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A8674) 1mg/ml
- FCCP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; C2920) 10mM
- NADH (Roche, Rosny-sous-bois, France ; 10128023001) 12mM
- ATP (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A1852) 10mM
- Phosphoenolpyruvate (PEP) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; P3637) 40mM

Principe :

Cette technique est basé sur la capacité de la F₀F₁ ATP synthase à hydrolyser l'ATP en ADP + Pi. En effet, lors de la phosphorylation oxydative, la F₀F₁ ATP synthase catalyse la synthèse d'ATP à partir d'ADP + Pi, cependant cette réaction est réversible. En présence de phosphoenolpyruvate (PEP), de NADH, de pyruvate kinase (PK) et de lactate déshydrogénase (LDH), l'hydrolyse de l'ATP aboutit l'oxydation du NADH, H⁺ en NAD⁺. Ce qui donne la réaction suivante :



L'hydrolyse de l'ATP est donc suivie par la mesure de l'oxydation du NADH. Néanmoins, comme il peut également être oxydé par le Cytochrome b5 réductase, la spécificité de la réaction est contrôlée par dosage en

parallèle en présence d'oligomycine (inhibiteur de la F0F1 ATP synthase). Cette technique est également adaptée à partir de celle décrite par Rustin et al 1994.

Technique :

1. Préparation des cellules :

Les cellules issues de la culture de fibroblastes primaires sont récoltées et congelées en culot sec. Les cellules sont décongelées à température ambiante, puis reprises dans du tampon A à hauteur de 50µl par million de cellules. La suspension cellulaire est ensuite plongée 3min dans de l'azote liquide et décongelée rapidement au bain marie à 37°C. Enfin la suspension est centrifugée 1 min à 20 000g, le surnageant contenant la fraction cytosolique est retirée pour garder uniquement le culot enrichi en mitochondries. Le culot est de nouveau repris par 50µl de tampon A par millions de cellules. 200µl de la suspension sont prélevées et transférées dans un truc en verre résistant à la sonication. Pour la sonication, les tubes sont complétés QSP 250µl par million de cellules de tampon A. Les cellules maintenues dans la glace sont soniquées 6 x 5s avec 30s de repos entre chaque sonication.

2. Préparation de la réaction :

Deux tubes à hémolyse en verre sont préparés avec 510 µl de solution suivante :

REACTIFS	CONCENTRATION EN MM	VOLUME EN µL	CONCENTRATION FINALE EN MM
KH2PO4 PH 8.1	100	600	20
H2O		19 800	
MGCL2	1000	30	1
KCL	200	300	2
PK	20U/ml	15	1U/ml
LDH	27U/ml	15	1.7U/ml
PEP	40	600	0.4
NADH	12	375	0.15
FCCP	1	18	0.6µM
ANTIMYCINE +/-	1mg/ml	5	0.1µg/ml

Les tubes sont incubés 2min à 37°C, puis 75µl cellules soniquées sont ajoutées, avec plus ou moins 2,5µl d'oligomycine. La réaction est déclenchée par l'ajout de 12µl d'ATP 10mM. Immédiatement après l'ajout, l'absorbance est suivie sur 120s à 340nm (spectrophotomètre UVmc2, SAFAS, Monaco).

3. Analyse des résultats et calcul des activités :

L'activité de la F0F1 ATP synthase est déterminée grâce à la formule suivant :

$$AS \text{ (cellules)} = \frac{(\Delta DO^{-Oligo} - \Delta DO^{+Olygo})}{l \times \epsilon_{NADH} \times S_{n_{NADH}}} \times \frac{V_{total}}{V_{essai} \times \rho}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO^{-Oligo} : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée sans oligomycine

ΔDO^{+Ant} : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du Cytochrome c à 340 nm = 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹

$S_{n_{NADH}}$: nombre stoechiométrique du Cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1

Vtotal : volume total dans la cuve, en ml soit : 1

Vessai : volume ajouté dans la cuve, en ml, QSP 1ml de mix réactionnel soit :

ρ : masse de protéines (mg.ml⁻¹) dans 1ml de suspension

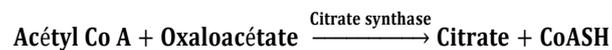
Fiche technique n°14 : Dosage de l'activité Citrate synthase (CS) sur fibroblastes

Réactifs :

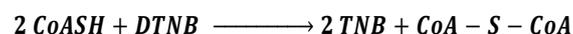
- Tampon A pH 7.2 (tampon de re-suspension des cellules)
 - o Saccharose (Sigma Aldrich, Lyon, France ; S5016) 250mM
 - o Tris (Sigma Aldrich, Lyon, France ; T1503) 20mM
 - o EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; E5134) 2mM
 - o BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France ; A6003) 1mg/ml
- 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma Aldrich, Lyon, France ; D8130) 1mM
- Acide oxaloacétique (Fisher Scientifique; 10188752) 10mM
- Triton 100X (Fisher Scientifique ; 10102913) 10%
- Acétyl Co-enzyme A (Sigma Aldrich, Lyon, France ; 10101907001) 30mM

Principe :

La citrate synthase (CS) est une enzyme mitochondriale du cycle de Krebs. Sa régulation étant essentiellement allostérique, elle est utilisée comme une référence de masse mitochondriale lors des dosages. Elle catalyse la formation de l'acide citrique à partir d'oxaloacétate et de l'acétyl Co A. La réaction catalytique est la suivante :



Au cours de la réaction, du CoASH est formé et va réagir avec le 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) pour former du trinitrobenzène (TNB) qui peut être lue à 412nm. La réaction est la suivante :



Technique :

1. Préparation des cellules :

Pour la citrate synthase 1, les cellules sont préparées comme pour le complexe III (fiche technique n°11). Pour la citrate synthase 2, les cellules sont préparées comme pour le complexe I et la F0F1 ATP synthase (fiche technique n°10 et 12).

2. Préparation de la réaction :

Deux tubes à hémolyse en verre sont préparés avec 965µl de solution suivante :

REACTIFS	CONCENTRATION EN MM	VOLUME EN µL	CONCENTRATION FINALE EN MM
H2O		37 500	
TRITON 10X	10%	500	0.1%
DTNB	1	7500	0.15
OA	10	2500	0.5

$0.1 \cdot 10^6$ cellules sont ajoutées dans chaque tube. Les tubes sont incubés 2min à 37°C, la réaction est déclenchée par l'ajout de 30µl d'Acétyl CoA 30mM. Immédiatement après, l'absorbance est lue pendant 1 min 30s à 412nm spectrophotomètre UVmc2, SAFAS, Monaco).

3. Analyse des résultats et calcul des activités :

L'activité de la citrate synthase est déterminée grâce à la formule suivant :

$$AS (\text{cellules}) = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{TNB} \times S_{n_{TNB}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{essai}} \times \rho}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO : variation de densité optique par minute à 412 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε_{TNB}: coefficient d'extinction molaire du Cytochrome c à 340 nm = 13,6 mM⁻¹.cm⁻¹

S_{n_{TNB}} : nombre stœchiométrique du Cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1

V_{total} : volume total dans la cuve, en ml soit : 1

V_{essai} : volume ajouté dans la cuve, en ml, QSP 1ml de mix réactionnel soit :

ρ : masse de protéines (mg.ml⁻¹) dans 1ml de suspension

Bibliographie

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter, et J. E. Walker. 1994. « Structure at 2.8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria ». *Nature* 370(6491):621-28. doi: 10.1038/370621a0.
- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, et Jose Antonio Enriquez. 2008. « Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes ». *Molecular Cell* 32(4):529-39. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.
- Ackerman, S. H., et A. Tzagoloff. 1990. « Identification of Two Nuclear Genes (ATP11, ATP12) Required for Assembly of the Yeast F1-ATPase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(13):4986-90. doi: 10.1073/pnas.87.13.4986.
- Adachi, Yoshihiro, Kie Itoh, Tatsuya Yamada, Kara L. Cervený, Takamichi L. Suzuki, Patrick Macdonald, Michael A. Frohman, Rajesh Ramachandran, Miho Iijima, et Hiromi Sesaki. 2016. « Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division ». *Molecular Cell* 63(6):1034-43. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.013.
- Adebayo, Mary, Seema Singh, Ajay Pratap Singh, et Santanu Dasgupta. 2021. « Mitochondrial Fusion and Fission: The Fine-Tune Balance for Cellular Homeostasis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35(6):e21620. doi: 10.1096/fj.202100067R.
- Akepati, Vasudheva Reddy, Eva-Christina Müller, Albrecht Otto, Holger M. Strauss, Michael Portwich, et Christiane Alexander. 2008. « Characterization of OPA1 Isoforms Isolated from Mouse Tissues ». *Journal of Neurochemistry* 106(1):372-83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x.
- Alavi, Marcel V., Stefanie Bette, Simone Schimpf, Frank Schuettauf, Ulrich Schraermeyer, Hans F. Wehrl, Lukas Ruttiger, Susanne C. Beck, Felix Tonagel, Bernd J. Pichler, Marlies Knipper, Thomas Peters, Juergen Laufs, et Bernd Wissinger. 2007. « A Splice Site Mutation in the Murine Opa1 Gene Features Pathology of Autosomal Dominant Optic Atrophy ». *Brain: A Journal of Neurology* 130(Pt 4):1029-42. doi: 10.1093/brain/awm005.
- Alavi, Marcel V., Nico Fuhrmann, Huu Phuc Nguyen, Patrick Yu-Wai-Man, Peter Heiduschka, Patrick F. Chinnery, et Bernd Wissinger. 2009. « Subtle Neurological and Metabolic Abnormalities in an Opa1 Mouse Model of Autosomal Dominant Optic Atrophy ». *Experimental Neurology* 220(2):404-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.026.
- Alexander, C., M. Votruba, U. E. Pesch, D. L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S. S. Bhattacharya, et B. Wissinger. 2000. « OPA1, Encoding a Dynamin-Related GTPase, Is Mutated in Autosomal Dominant Optic Atrophy Linked to Chromosome 3q28 ». *Nature Genetics* 26(2):211-15. doi: 10.1038/79944.
- Amiott, Elizabeth A., Paul Lott, Jamie Soto, Peter B. Kang, J. Michael McCaffery, Salvatore DiMauro, E. Dale Abel, Kevin M. Flanigan, Victoria H. Lawson, et Janet M. Shaw. 2008. « Mitochondrial Fusion and Function in Charcot-Marie-Tooth Type 2A Patient Fibroblasts with Mitofusin 2 Mutations ». *Experimental Neurology* 211(1):115-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.01.010.
- Anand, Ruchika, Timothy Wai, Michael J. Baker, Nikolay Kladt, Astrid C. Schauss, Elena Rugarli, et Thomas Langer. 2014. « The I-AAA Protease YME1L and OMA1 Cleave OPA1 to Balance Mitochondrial Fusion and Fission ». *The Journal of Cell Biology* 204(6):919-29. doi: 10.1083/jcb.201308006.

- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden, et I. G. Young. 1981. « Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome ». *Nature* 290(5806):457-65. doi: 10.1038/290457a0.
- Anon. s. d. « SUBMITTING ILLUMINATIONS FOR REVIEW ». Consulté 16 août 2022 (<https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/advances.2001.25.2.70>).
- Anselmi, Claudio, Karen M. Davies, et José D. Faraldo-Gómez. 2018. « Mitochondrial ATP Synthase Dimers Spontaneously Associate Due to a Long-Range Membrane-Induced Force ». *The Journal of General Physiology* 150(5):763-70. doi: 10.1085/jgp.201812033.
- Appleby, R. D., W. K. Porteous, G. Hughes, A. M. James, D. Shannon, Y. H. Wei, et M. P. Murphy. 1999. « Quantitation and Origin of the Mitochondrial Membrane Potential in Human Cells Lacking Mitochondrial DNA ». *European Journal of Biochemistry* 262(1):108-16. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00350.x.
- Archer, Stephen L. 2013. « Mitochondrial Dynamics--Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases ». *The New England Journal of Medicine* 369(23):2236-51. doi: 10.1056/NEJMra1215233.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart, et H. Schägger. 1998. « Yeast Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits ». *The EMBO Journal* 17(24):7170-78. doi: 10.1093/emboj/17.24.7170.
- Ashrafi, G., et T. L. Schwarz. 2013. « The Pathways of Mitophagy for Quality Control and Clearance of Mitochondria ». *Cell Death and Differentiation* 20(1):31-42. doi: 10.1038/cdd.2012.81.
- Bach, Daniel, Sara Pich, Francesc X. Soriano, Nathalie Vega, Bernhard Baumgartner, Josep Oriola, Jens R. Dugaard, Jorge Lloberas, Marta Camps, Juleen R. Zierath, Rémi Rabasa-Lhoret, Harriet Wallberg-Henriksson, Martine Laville, Manuel Palacín, Hubert Vidal, Francisca Rivera, Martin Brand, et Antonio Zorzano. 2003. « Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. A Novel Regulatory Mechanism Altered in Obesity ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(19):17190-97. doi: 10.1074/jbc.M212754200.
- Bahri, Hela, Jeremie Buratto, Manuel Rojo, Jim Paul Dompierre, Bénédicte Salin, Corinne Blancard, Sylvain Cuvellier, Marie Rose, Amel Ben Ammar Elgaaied, Emmanuel Tetaud, Jean-Paul di Rago, Anne Devin, et Stéphane Duvezin-Caubet. 2021. « TMEM70 Forms Oligomeric Scaffolds within Mitochondrial Cristae Promoting in Situ Assembly of Mammalian ATP Synthase Proton Channel ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1868(4):118942. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118942.
- Baker, Lindsay A., Ian N. Watt, Michael J. Runswick, John E. Walker, et John L. Rubinstein. 2012. « Arrangement of Subunits in Intact Mammalian Mitochondrial ATP Synthase Determined by Cryo-EM ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(29):11675-80. doi: 10.1073/pnas.1204935109.
- Baker, Michael J., Philipp A. Lampe, Diana Stojanovski, Anne Korwitz, Ruchika Anand, Takashi Tatsuta, et Thomas Langer. 2014. « Stress-Induced OMA1 Activation and Autocatalytic Turnover Regulate OPA1-Dependent Mitochondrial Dynamics ». *The EMBO Journal* 33(6):578-93. doi: 10.1002/embj.201386474.
- Barsoum, Mark J., Hua Yuan, Akos A. Gerencser, Géraldine Liot, Yulia Kushnareva, Simone Gräber, Imre Kovacs, Wilson D. Lee, Jenna Waggoner, Jiankun Cui, Andrew D. White, Blaise Bossy, Jean-Claude Martinou, Richard J. Youle, Stuart A. Lipton, Mark H. Ellisman, Guy A. Perkins, et Ella Bossy-Wetzel.

2006. « Nitric Oxide-Induced Mitochondrial Fission Is Regulated by Dynamin-Related GTPases in Neurons ». *The EMBO Journal* 25(16):3900-3911. doi: 10.1038/sj.emboj.7601253.
- Bedard, Karen, et Karl-Heinz Krause. 2007. « The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 87(1):245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- Belous, Andrey, Clayton Knox, Ian B. Nicoud, Janene Pierce, Christopher Anderson, C. Wright Pinson, et Ravi S. Chari. 2003. « Reversed Activity of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator in Ischemia-Reperfusion ». *Transplantation* 75(10):1717-23. doi: 10.1097/01.TP.0000063829.35871.CE.
- Benard, Giovanni, Nadège Bellance, Dominic James, Philippe Parrone, Helder Fernandez, Thierry Letellier, et Rodrigue Rossignol. 2007. « Mitochondrial Bioenergetics and Structural Network Organization ». *Journal of Cell Science* 120(Pt 5):838-48. doi: 10.1242/jcs.03381.
- Benda, C. 1898. « Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertibraten, I. Theil: Ueber die vegetativen Geschlechtszellen ». -, Benda, C.: *Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertibraten, I. Theil: Ueber die vegetativen Geschlechtszellen, -: - -*.
- Bensinger, Steven J., et Heather R. Christofk. 2012. « New Aspects of the Warburg Effect in Cancer Cell Biology ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23(4):352-61. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.02.003.
- Bereiter-Hahn, J., et M. Vöth. 1994. « Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria ». *Microscopy Research and Technique* 27(3):198-219. doi: 10.1002/jemt.1070270303.
- Berrisford, John M., et Leonid A. Sazanov. 2009. « Structural Basis for the Mechanism of Respiratory Complex I ». *The Journal of Biological Chemistry* 284(43):29773-83. doi: 10.1074/jbc.M109.032144.
- Bertholet, A. M., T. Delerue, A. M. Millet, M. F. Moulis, C. David, M. Daloyau, L. Arnauné-Pelloquin, N. Davezac, V. Mils, M. C. Miquel, M. Rojo, et P. Belenguer. 2016. « Mitochondrial Fusion/Fission Dynamics in Neurodegeneration and Neuronal Plasticity ». *Neurobiology of Disease* 90:3-19. doi: 10.1016/j.nbd.2015.10.011.
- Biel, T. G., S. Lee, J. A. Flores-Toro, J. W. Dean, K. L. Go, M. H. Lee, B. K. Law, M. E. Law, W. A. Dunn, I. Zendejas, K. E. Behrns, et J. S. Kim. 2016. « Sirtuin 1 Suppresses Mitochondrial Dysfunction of Ischemic Mouse Livers in a Mitofusin 2-Dependent Manner ». *Cell Death and Differentiation* 23(2):279-90. doi: 10.1038/cdd.2015.96.
- Birrell, James A., Martin S. King, et Judy Hirst. 2011. « A Ternary Mechanism for NADH Oxidation by Positively Charged Electron Acceptors, Catalyzed at the Flavin Site in Respiratory Complex I ». *FEBS Letters* 585(14):2318-22. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.065.
- Bisetto, Elena, Paola Picotti, Valentina Giorgio, Vera Alverdi, Irene Mavelli, et Giovanna Lippe. 2008. « Functional and Stoichiometric Analysis of Subunit e in Bovine Heart Mitochondrial F(0)F(1)ATP Synthase ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40(4):257-67. doi: 10.1007/s10863-008-9183-5.
- Bleazard, W., J. M. McCaffery, E. J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, et J. M. Shaw. 1999. « The Dynamin-Related GTPase Dnm1 Regulates Mitochondrial Fission in Yeast ». *Nature Cell Biology* 1(5):298-304. doi: 10.1038/13014.
- Blum, Thorsten B., Alexander Hahn, Thomas Meier, Karen M. Davies, et Werner Kühlbrandt. 2019. « Dimers of Mitochondrial ATP Synthase Induce Membrane Curvature and Self-Assemble into Rows ».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116(10):4250-55.
doi: 10.1073/pnas.1816556116.

- Boissan, Mathieu, Guillaume Montagnac, Qinfang Shen, Lorena Griparic, Jérôme Guitton, Maryse Romao, Nathalie Sauvonnet, Thibault Lagache, Ioan Lascu, Graça Raposo, Céline Desbourdes, Uwe Schlattner, Marie-Lise Lacombe, Simona Polo, Alexander M. van der Bliek, Aurélien Roux, et Philippe Chavier. 2014. « Membrane Trafficking. Nucleoside Diphosphate Kinases Fuel Dynamin Superfamily Proteins with GTP for Membrane Remodeling ». *Science (New York, N.Y.)* 344(6191):1510-15. doi: 10.1126/science.1253768.
- Bouche, Laura, Rima Kamel, Sophie Tamareille, Gabriel Garcia, Camille Villedieu, Bruno Pillot, Naïg Gueguen, Ahmad Chehaitly, Juan Manuel Chao de la Barca, Justine Beaumont, Delphine Baetz, Michel Ovize, Hiromi Sesaki, Daniel Henrion, Pascal Reynier, Guy Lenaers, Fabrice Prunier, et Delphine Mirebeau-Prunier. 2021. « DRP1 Haploinsufficiency Attenuates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injuries ». *PloS One* 16(3):e0248554. doi: 10.1371/journal.pone.0248554.
- Boveris, A., et B. Chance. 1973. « The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen ». *The Biochemical Journal* 134(3):707-16. doi: 10.1042/bj1340707.
- Brand, M. D. 2005. « The Efficiency and Plasticity of Mitochondrial Energy Transduction ». *Biochemical Society Transactions* 33(Pt 5):897-904. doi: 10.1042/BST0330897.
- Brand, Martin D. 2010. « The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production ». *Experimental Gerontology* 45(7-8):466-72. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
- Brand, Martin D. 2016. « Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling ». *Free Radical Biology & Medicine* 100:14-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
- Brandt, Tobias, Laetitia Cavellini, Werner Kühlbrandt, et Mickaël M. Cohen. 2016. « A Mitofusin-Dependent Docking Ring Complex Triggers Mitochondrial Fusion in Vitro ». *ELife* 5:e14618. doi: 10.7554/eLife.14618.
- Braschi, Emélie, Rodolfo Zunino, et Heidi M. McBride. 2009. « MAPL Is a New Mitochondrial SUMO E3 Ligase That Regulates Mitochondrial Fission ». *EMBO Reports* 10(7):748-54. doi: 10.1038/embor.2009.86.
- Bravo, Concepción, Fernando Minauro-Sanmiguel, Edgar Morales-Ríos, José S. Rodríguez-Zavala, et José J. García. 2004. « Overexpression of the Inhibitor Protein IF(1) in AS-30D Hepatoma Produces a Higher Association with Mitochondrial F(1)F(0) ATP Synthase Compared to Normal Rat Liver: Functional and Cross-Linking Studies ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36(3):257-64. doi: 10.1023/b:jobb.0000031977.99479.ea.
- Brischigliaro, Michele, Denis Badocco, Rodolfo Costa, Carlo Viscomi, Massimo Zeviani, Paolo Pastore, et Erika Fernández-Vizarrá. 2022. « Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Defects Alter Cellular Homeostasis of Transition Metals ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:892069. doi: 10.3389/fcell.2022.892069.
- Bruni, A., et S. Luciani. 1962. « Effects of Atractyloside and Oligomycin on Magnesium-Stimulated Adenosine Triphosphatase and on Adenosine Triphosphate-Induced Contraction of Swollen Mitochondria ». *Nature* 196:578-80. doi: 10.1038/196578a0.
- Buck, Michael D., David O'Sullivan, Ramon I. Klein Geltink, Jonathan D. Curtis, Chih-Hao Chang, David E. Sanin, Jing Qiu, Oliver Kretz, Daniel Braas, Gerritje J. W. van der Windt, Qiongyu Chen, Stanley

- Ching-Cheng Huang, Christina M. O'Neill, Brian T. Edelson, Edward J. Pearce, Hiromi Sesaki, Tobias B. Huber, Angelika S. Rambold, et Erika L. Pearce. 2016. « Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming ». *Cell* 166(1):63-76. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.035.
- Bulthuis, Elianne P., Merel J. W. Adjobo-Hermans, Peter H. G. M. Willems, et Werner J. H. Koopman. 2019. « Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells ». *Antioxidants & Redox Signaling* 30(18):2066-2109. doi: 10.1089/ars.2018.7534.
- Burchell, Victoria S., David E. Nelson, Alvaro Sanchez-Martinez, Marta Delgado-Camprubi, Rachael M. Ivatt, Joe H. Pogson, Suzanne J. Randle, Selina Wray, Patrick A. Lewis, Henry Houlden, Andrey Y. Abramov, John Hardy, Nicholas W. Wood, Alexander J. Whitworth, Heike Laman, et Helene Plun-Favreau. 2013. « The Parkinson's Disease-Linked Proteins Fbxo7 and Parkin Interact to Mediate Mitophagy ». *Nature Neuroscience* 16(9):1257-65. doi: 10.1038/nn.3489.
- Bustos, Diego M., et Jean Velours. 2005. « The Modification of the Conserved GXXXG Motif of the Membrane-Spanning Segment of Subunit g Destabilizes the Supramolecular Species of Yeast ATP Synthase ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(32):29004-10. doi: 10.1074/jbc.M502140200.
- Cabezón, E., P. J. Butler, M. J. Runswick, et J. E. Walker. 2000. « Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by PH ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(33):25460-64. doi: 10.1074/jbc.M003859200.
- Cabezón, E., M. J. Runswick, A. G. Leslie, et J. E. Walker. 2001. « The Structure of Bovine IF(1), the Regulatory Subunit of Mitochondrial F-ATPase ». *The EMBO Journal* 20(24):6990-96. doi: 10.1093/emboj/20.24.6990.
- Cabezón, Elena, Martin G. Montgomery, Andrew G. W. Leslie, et John E. Walker. 2003. « The Structure of Bovine F1-ATPase in Complex with Its Regulatory Protein IF1 ». *Nature Structural Biology* 10(9):744-50. doi: 10.1038/nsb966.
- Cadena, Lawrence Rudy, Ondřej Gahura, Brian Panicucci, Alena Zíková, et Hassan Hashimi. 2021. « Mitochondrial Contact Site and Cristae Organization System and F1FO-ATP Synthase Crosstalk Is a Fundamental Property of Mitochondrial Cristae ». *MSphere* e0032721. doi: 10.1128/mSphere.00327-21.
- Calabrese, Gaetano, Bruce Morgan, et Jan Riemer. 2017. « Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions ». *Antioxidants & Redox Signaling* 27(15):1162-77. doi: 10.1089/ars.2017.7121.
- Cao, Yang-Po, et Ming Zheng. 2019. « Mitochondrial Dynamics and Inter-Mitochondrial Communication in the Heart ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 663:214-19. doi: 10.1016/j.abb.2019.01.017.
- Cao, Yu-Lu, Shuxia Meng, Yang Chen, Jian-Xiong Feng, Dong-Dong Gu, Bing Yu, Yu-Jie Li, Jin-Yu Yang, Shuang Liao, David C. Chan, et Song Gao. 2017. « MFN1 Structures Reveal Nucleotide-Triggered Dimerization Critical for Mitochondrial Fusion ». *Nature* 542(7641):372-76. doi: 10.1038/nature21077.
- Capuano, F., F. Guerrieri, et S. Papa. 1997. « Oxidative Phosphorylation Enzymes in Normal and Neoplastic Cell Growth ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29(4):379-84. doi: 10.1023/a:1022402915431.
- Carroll, Joe, Ian M. Fearnley, J. Mark Skehel, Richard J. Shannon, Judy Hirst, et John E. Walker. 2006. « Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(43):32724-27. doi: 10.1074/jbc.M607135200.

- Cassereau, J., C. Casasnovas, N. Gueguen, M. C. Malinge, V. Guillet, P. Reynier, D. Bonneau, P. Amati-Bonneau, I. Banchs, V. Volpini, V. Procaccio, et A. Chevrollier. 2011. « Simultaneous MFN2 and GDAP1 Mutations Cause Major Mitochondrial Defects in a Patient with CMT ». *Neurology* 76(17):1524-26. doi: 10.1212/WNL.0b013e318217e77d.
- Cassereau, Julien, Arnaud Chevrollier, Naïg Gueguen, Valérie Desquret, Christophe Verny, Guillaume Nicolas, Frédéric Dubas, Patrizia Amati-Bonneau, Pascal Reynier, Dominique Bonneau, et Vincent Procaccio. 2011. « Mitochondrial Dysfunction and Pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth Disease Involving GDAP1 Mutations ». *Experimental Neurology* 227(1):31-41. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.09.006.
- Chan, David C. 2020. « Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease ». *Annual Review of Pathology* 15:235-59. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711.
- Chandel, Navdeep S. 2021. « Glycolysis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(5):a040535. doi: 10.1101/cshperspect.a040535.
- Chandra, Ramesh, Cali A. Calarco, et Mary Kay Lobo. 2019. « Differential Mitochondrial Morphology in Ventral Striatal Projection Neuron Subtypes ». *Journal of Neuroscience Research* 97(12):1579-89. doi: 10.1002/jnr.24511.
- Chang, Chuang-Rung, et Craig Blackstone. 2007. « Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(30):21583-87. doi: 10.1074/jbc.C700083200.
- Chao de la Barca, Juan Manuel, Delphine Prunier-Mirebeau, Patrizia Amati-Bonneau, Marc Ferré, Emmanuelle Sarzi, Céline Bris, Stéphanie Leruez, Arnaud Chevrollier, Valérie Desquret-Dumas, Naïg Gueguen, Christophe Verny, Christian Hamel, Dan Miléa, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Guy Lenaers, et Pascal Reynier. 2016. « OPA1-Related Disorders: Diversity of Clinical Expression, Modes of Inheritance and Pathophysiology ». *Neurobiology of Disease* 90:20-26. doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.015.
- Cheeseman, A. J., et J. B. Clark. 1988. « Influence of the Malate-Aspartate Shuttle on Oxidative Metabolism in Synaptosomes ». *Journal of Neurochemistry* 50(5):1559-65. doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb03044.x.
- Chen, Hsiuchen, Anne Chomyn, et David C. Chan. 2005. « Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(28):26185-92. doi: 10.1074/jbc.M503062200.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, et David C. Chan. 2003. « Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development ». *The Journal of Cell Biology* 160(2):189-200. doi: 10.1083/jcb.200211046.
- Chen, Hsiuchen, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2007. « Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum ». *Cell* 130(3):548-62. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.026.
- Chen, Hsiuchen, Marc Vermulst, Yun E. Wang, Anne Chomyn, Tomas A. Prolla, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2010. « Mitochondrial Fusion Is Required for MtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of MtDNA Mutations ». *Cell* 141(2):280-89. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.026.
- Chevrollier, Arnaud, Virginie Guillet, Dominique Loiseau, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Marc Ferre, Hélène Dollfus, Sylvie Odent, Dan Milea, Cyril Goizet, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, et Pascal Reynier. 2008a. « Hereditary Optic

Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect ». *Annals of Neurology* 63(6):794-98. doi: 10.1002/ana.21385.

Chevrollier, Arnaud, Virginie Guillet, Dominique Loiseau, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Christophe Verny, Marc Ferre, Hélène Dollfus, Sylvie Odent, Dan Milea, Cyril Goizet, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, et Pascal Reynier. 2008b. « Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect ». *Annals of Neurology* 63(6):794-98. doi: 10.1002/ana.21385.

Cho, Bongki, Hyo Min Cho, Youhwa Jo, Hee Dae Kim, Myungjae Song, Cheil Moon, Hyongbum Kim, Kyungjin Kim, Hiromi Sesaki, Im Joo Rhyu, Hyun Kim, et Woong Sun. 2017. « Constriction of the Mitochondrial Inner Compartment Is a Priming Event for Mitochondrial Division ». *Nature Communications* 8:15754. doi: 10.1038/ncomms15754.

Cho, Dong-Hyung, Tomohiro Nakamura, Jianguo Fang, Piotr Cieplak, Adam Godzik, Zezong Gu, et Stuart A. Lipton. 2009. « S-Nitrosylation of Drp1 Mediates Beta-Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury ». *Science (New York, N.Y.)* 324(5923):102-5. doi: 10.1126/science.1171091.

Chuang, Kai-Cheng, Chuang-Rung Chang, Shu-Hao Chang, Shi-Wei Huang, Show-Mei Chuang, Zheng-Yi Li, Sin-Ting Wang, Jun-Kai Kao, Yi-Ju Chen, et Jeng-Jer Shieh. 2020. « Imiquimod-Induced ROS Production Disrupts the Balance of Mitochondrial Dynamics and Increases Mitophagy in Skin Cancer Cells ». *Journal of Dermatological Science* 98(3):152-62. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.03.009.

Church, C., et R. O. Poyton. 1998. « Neither Respiration nor Cytochrome c Oxidase Affects Mitochondrial Morphology in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Experimental Biology* 201(Pt 11):1729-37. doi: 10.1242/jeb.201.11.1729.

Cino, M., et R. F. Del Maestro. 1989. « Generation of Hydrogen Peroxide by Brain Mitochondria: The Effect of Reoxygenation Following Postdecapitative Ischemia ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 269(2):623-38. doi: 10.1016/0003-9861(89)90148-3.

Cipolat, Sara, Tomasz Rudka, Dieter Hartmann, Veronica Costa, Lutgarde Serneels, Katleen Craessaerts, Kristine Metzger, Christian Frezza, Wim Annaert, Luciano D'Adamio, Carmen Derks, Tim Dejaegere, Luca Pellegrini, Rudi D'Hooge, Luca Scorrano, et Bart De Strooper. 2006. « Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling ». *Cell* 126(1):163-75. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.021.

Clinton, Ryan W., Christopher A. Francy, Rajesh Ramachandran, Xin Qi, et Jason A. Mears. 2016. « Dynamin-Related Protein 1 Oligomerization in Solution Impairs Functional Interactions with Membrane-Anchored Mitochondrial Fission Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 291(1):478-92. doi: 10.1074/jbc.M115.680025.

Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, Veronica Costa, Alberto Casarin, Ligia C. Gomes, Ester Perales-Clemente, Leonardo Salviati, Patricio Fernandez-Silva, Jose A. Enriquez, et Luca Scorrano. 2013. « Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency ». *Cell* 155(1):160-71. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.032.

Consolato, Francesco, Francesca Maltecca, Susanna Tulli, Irene Sambri, et Giorgio Casari. 2018. « M-AAA and i-AAA Complexes Coordinate to Regulate OMA1, the Stress-Activated Supervisor of Mitochondrial Dynamics ». *Journal of Cell Science* 131(7). doi: 10.1242/jcs.213546.

Corcoran, Aoife, et Thomas G. Cotter. 2013. « Redox Regulation of Protein Kinases ». *The FEBS Journal* 280(9):1944-65. doi: 10.1111/febs.12224.

- Coronado, Michael, Giovanni Fajardo, Kim Nguyen, Mingming Zhao, Kristina Kooiker, Gwanghyun Jung, Dong-Qing Hu, Sushma Reddy, Erik Sandoval, Aleksandr Stotland, Roberta A. Gottlieb, et Daniel Bernstein. 2018. « Physiological Mitochondrial Fragmentation Is a Normal Cardiac Adaptation to Increased Energy Demand ». *Circulation Research* 122(2):282-95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310725.
- Cretin, Emma, Priscilla Lopes, Elodie Vimont, Takashi Tatsuta, Thomas Langer, Anastasia Gazi, Martin Sachse, Patrick Yu-Wai-Man, Pascal Reynier, et Timothy Wai. 2021. « High-Throughput Screening Identifies Suppressors of Mitochondrial Fragmentation in OPA1 Fibroblasts ». *EMBO Molecular Medicine* 13(6):e13579. doi: 10.15252/emmm.202013579.
- Cribbs, J. Thomas, et Stefan Strack. 2007. « Reversible Phosphorylation of Drp1 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Cell Death ». *EMBO Reports* 8(10):939-44. doi: 10.1038/sj.embor.7401062.
- Dai, Wenting, Zhichao Wang, Qiong A. Wang, David Chan, et Lei Jiang. 2022. « Metabolic Reprogramming in the OPA1-Deficient Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 79(10):517. doi: 10.1007/s00018-022-04542-5.
- Davies, Karen M., Claudio Anselmi, Ilka Wittig, José D. Faraldo-Gómez, et Werner Kühlbrandt. 2012. « Structure of the Yeast F1Fo-ATP Synthase Dimer and Its Role in Shaping the Mitochondrial Cristae ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(34):13602-7. doi: 10.1073/pnas.1204593109.
- De Vos, Kurt J., Victoria J. Allan, Andrew J. Grierson, et Michael P. Sheetz. 2005. « Mitochondrial Function and Actin Regulate Dynamin-Related Protein 1-Dependent Mitochondrial Fission ». *Current Biology: CB* 15(7):678-83. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.064.
- Del Dotto, Valentina, Mario Fogazza, Valerio Carelli, Michela Rugolo, et Claudia Zanna. 2018. « Eight Human OPA1 Isoforms, Long and Short: What Are They For? ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1859(4):263-69. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.01.005.
- Del Dotto, Valentina, Prashant Mishra, Sara Vidoni, Mario Fogazza, Alessandra Maresca, Leonardo Caporali, J. Michael McCaffery, Martina Cappelletti, Enrico Baruffini, Guy Lenaers, David Chan, Michela Rugolo, Valerio Carelli, et Claudia Zanna. 2017. « OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions ». *Cell Reports* 19(12):2557-71. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.073.
- Delettre, C., J. M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, et C. P. Hamel. 2001. « Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene ». *Human Genetics* 109(6):584-91. doi: 10.1007/s00439-001-0633-y.
- Delettre, C., G. Lenaers, J. M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelléc, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, et C. P. Hamel. 2000. « Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy ». *Nature Genetics* 26(2):207-10. doi: 10.1038/79936.
- Desquiret-Dumas, Valérie, Naïg Gueguen, Géraldine Leman, Stéphanie Baron, Valérie Nivet-Antoine, Stéphanie Chupin, Arnaud Chevrollier, Emilie Vessières, Audrey Ayer, Marc Ferré, Dominique Bonneau, Daniel Henrion, Pascal Reynier, et Vincent Procaccio. 2013. « Resveratrol Induces a Mitochondrial Complex I-Dependent Increase in NADH Oxidation Responsible for Sirtuin Activation in Liver Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(51):36662-75. doi: 10.1074/jbc.M113.466490.
- Desquiret-Dumas, Valerie, Geraldine Leman, Celine Wetterwald, Stephanie Chupin, Anaïs Lebert, Salim Khiati, Morgane Le Mao, Guillaume Geffroy, Mariame Selma Kane, Arnaud Chevrollier, David

- Goudenege, Cedric Gadras, Lydie Tessier, Magalie Barth, Stephanie Leruez, Patrizia Amati-Bonneau, Daniel Henrion, Dominique Bonneau, Vincent Procaccio, Pascal Reynier, Guy Lenaers, et Naig Gueguen. 2019. « Warburg-like Effect Is a Hallmark of Complex I Assembly Defects ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1865(9):2475-89. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.05.011.
- Detmer, Scott A., et David C. Chan. 2007. « Complementation between Mouse Mfn1 and Mfn2 Protects Mitochondrial Fusion Defects Caused by CMT2A Disease Mutations ». *The Journal of Cell Biology* 176(4):405-14. doi: 10.1083/jcb.200611080.
- Detmer, Scott A., Christine Vande Velde, Don W. Cleveland, et David C. Chan. 2008. « Hindlimb Gait Defects Due to Motor Axon Loss and Reduced Distal Muscles in a Transgenic Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Type 2A ». *Human Molecular Genetics* 17(3):367-75. doi: 10.1093/hmg/ddm314.
- Devenish, Rodney J., Mark Prescott, et Andrew J. W. Rodgers. 2008. « The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 267:1-58. doi: 10.1016/S1937-6448(08)00601-1.
- Diaz, Francisca, José Antonio Enríquez, et Carlos T. Moraes. 2012. « Cells Lacking Rieske Iron-Sulfur Protein Have a Reactive Oxygen Species-Associated Decrease in Respiratory Complexes I and IV ». *Molecular and Cellular Biology* 32(2):415-29. doi: 10.1128/MCB.06051-11.
- Dietrich, Marcelo O., Zhong-Wu Liu, et Tamas L. Horvath. 2013. « Mitochondrial Dynamics Controlled by Mitofusins Regulate Agrp Neuronal Activity and Diet-Induced Obesity ». *Cell* 155(1):188-99. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.004.
- Dröse, Stefan, et Ulrich Brandt. 2008. « The Mechanism of Mitochondrial Superoxide Production by the Cytochrome Bc1 Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(31):21649-54. doi: 10.1074/jbc.M803236200.
- Dudek, Jan, Peter Rehling, et Martin van der Laan. 2013. « Mitochondrial Protein Import: Common Principles and Physiological Networks ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833(2):274-85. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.028.
- Dudkina, Natalia V., Holger Eubel, Wilko Keegstra, Egbert J. Boekema, et Hans-Peter Braun. 2005. « Structure of a Mitochondrial Supercomplex Formed by Respiratory-Chain Complexes I and III ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9):3225-29. doi: 10.1073/pnas.0408870102.
- Duee, E. D., et P. V. Vignais. 1965. « [Exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides] ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 107(1):184-88. doi: 10.1016/0304-4165(65)90419-8.
- Dukan, S., et T. Nyström. 1999. « Oxidative Stress Defense and Deterioration of Growth-Arrested Escherichia Coli Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(37):26027-32. doi: 10.1074/jbc.274.37.26027.
- Egner, Alexander, Stefan Jakobs, et Stefan W. Hell. 2002. « Fast 100-Nm Resolution Three-Dimensional Microscope Reveals Structural Plasticity of Mitochondria in Live Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6):3370-75. doi: 10.1073/pnas.052545099.
- Ehses, Sarah, Ines Raschke, Giuseppe Mancuso, Andrea Bernacchia, Stefan Geimer, Daniel Tondera, Jean-Claude Martinou, Benedikt Westermann, Elena I. Rugarli, et Thomas Langer. 2009. « Regulation of OPA1 Processing and Mitochondrial Fusion by M-AAA Protease Isoenzymes and OMA1 ». *The Journal of Cell Biology* 187(7):1023-36. doi: 10.1083/jcb.200906084.

- Eisner, Verónica, Martin Picard, et György Hajnóczky. 2018. « Mitochondrial Dynamics in Adaptive and Maladaptive Cellular Stress Responses ». *Nature Cell Biology* 20(7):755-65. doi: 10.1038/s41556-018-0133-0.
- Elachouri, Ghizlane, Sara Vidoni, Claudia Zanna, Alexandre Pattyn, Hassan Boukhaddaoui, Karen Gaget, Patrick Yu-Wai-Man, Giuseppe Gasparre, Emmanuelle Sarzi, Cécile Delettre, Aurélien Olichon, Dominique Loiseau, Pascal Reynier, Patrick F. Chinnery, Agnès Rotig, Valerio Carelli, Christian P. Hamel, Michela Rugolo, et Guy Lenaers. 2011. « OPA1 Links Human Mitochondrial Genome Maintenance to MtDNA Replication and Distribution ». *Genome Research* 21(1):12-20. doi: 10.1101/gr.108696.110.
- Elchuri, Sailaja, Terry D. Oberley, Wenbo Qi, Richard S. Eisenstein, L. Jackson Roberts, Holly Van Remmen, Charles J. Epstein, et Ting-Ting Huang. 2005. « CuZnSOD Deficiency Leads to Persistent and Widespread Oxidative Damage and Hepatocarcinogenesis Later in Life ». *Oncogene* 24(3):367-80. doi: 10.1038/sj.onc.1208207.
- Esparza-Moltó, Pau B., et José M. Cuezva. 2018. « The Role of Mitochondrial H⁺-ATP Synthase in Cancer ». *Frontiers in Oncology* 8:53. doi: 10.3389/fonc.2018.00053.
- Esparza-Moltó, Pau B., Cristina Nuevo-Tapióles, et José M. Cuezva. 2017. « Regulation of the H⁺-ATP Synthase by IF1: A Role in Mitohormesis ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74(12):2151-66. doi: 10.1007/s00018-017-2462-8.
- Estabrook, R. W., et B. Sacktor. 1958. « Alpha-Glycerophosphate Oxidase of Flight Muscle Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 233(4):1014-19.
- Eura, Yuka, Naotada Ishihara, Sadaki Yokota, et Katsuyoshi Mihara. 2003. « Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion ». *Journal of Biochemistry* 134(3):333-44. doi: 10.1093/jb/mvg150.
- Eydt, Katharina, Karen M. Davies, Christina Behrendt, Ilka Wittig, et Andreas S. Reichert. 2017. « Cristae Architecture Is Determined by an Interplay of the MICOS Complex and the F1FO ATP Synthase via Mic27 and Mic10 ». *Microbial Cell (Graz, Austria)* 4(8):259-72. doi: 10.15698/mic2017.08.585.
- Faccenda, Danilo, Choon H. Tan, Michael R. Duchon, et Michelangelo Campanella. 2013. « Mitochondrial IF₁ Preserves Cristae Structure to Limit Apoptotic Cell Death Signaling ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12(16):2530-32. doi: 10.4161/cc.25840.
- Faelber, Katja, Lea Dietrich, Jeffrey K. Noel, Florian Wollweber, Anna-Katharina Pfitzner, Alexander Mühleip, Ricardo Sánchez, Misha Kudryashev, Nicolas Chiaruttini, Hauke Lilie, Jeanette Schlegel, Eva Rosenbaum, Manuel Hessenberger, Claudia Matthaeus, Séverine Kunz, Alexander von der Malsburg, Frank Noé, Aurélien Roux, Martin van der Laan, Werner Kühlbrandt, et Oliver Daumke. 2019. « Structure and Assembly of the Mitochondrial Membrane Remodelling GTPase Mgm1 ». *Nature* 571(7765):429-33. doi: 10.1038/s41586-019-1372-3.
- Faelber, Katja, York Posor, Song Gao, Martin Held, Yvette Roske, Dennis Schulze, Volker Haucke, Frank Noé, et Oliver Daumke. 2011. « Crystal Structure of Nucleotide-Free Dynamin ». *Nature* 477(7366):556-60. doi: 10.1038/nature10369.
- Finkel, Toren. 2011. « Signal Transduction by Reactive Oxygen Species ». *The Journal of Cell Biology* 194(1):7-15. doi: 10.1083/jcb.201102095.
- Ford, Marijn G. J., Simon Jenni, et Jodi Nunnari. 2011. « The Crystal Structure of Dynamin ». *Nature* 477(7366):561-66. doi: 10.1038/nature10441.

- Forkink, Marleen, Ganesh R. Manjeri, Dania C. Liemburg-Apers, Esther Nibbeling, Maxime Blanchard, Aleksandra Wojtala, Jan A. M. Smeitink, Mariusz R. Wieckowski, Peter H. G. M. Willems, et Werner J. H. Koopman. 2014. « Mitochondrial Hyperpolarization during Chronic Complex I Inhibition Is Sustained by Low Activity of Complex II, III, IV and V ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1837(8):1247-56. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.04.008.
- Forquer, Isaac, Raul Covian, Michael K. Bowman, Bernard L. Trumpower, et David M. Kramer. 2006. « Similar Transition States Mediate the Q-Cycle and Superoxide Production by the Cytochrome Bc1 Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(50):38459-65. doi: 10.1074/jbc.M605119200.
- Frank, Magdalena, Stéphane Duvezin-Caubet, Sebastian Koob, Angelo Occhipinti, Ravi Jagasia, Anton Petcherski, Mika O. Ruonala, Muriel Priault, Bénédicte Salin, et Andreas S. Reichert. 2012. « Mitophagy Is Triggered by Mild Oxidative Stress in a Mitochondrial Fission Dependent Manner ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823(12):2297-2310. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.007.
- Frenzel, Monika, Hans Rommelspacher, Michiru D. Sugawa, et Norbert A. Dencher. 2010. « Ageing Alters the Supramolecular Architecture of OxPhos Complexes in Rat Brain Cortex ». *Experimental Gerontology* 45(7-8):563-72. doi: 10.1016/j.exger.2010.02.003.
- Frezza, Christian, Sara Cipolat, Olga Martins de Brito, Massimo Micaroni, Galina V. Beznoussenko, Tomasz Rudka, Davide Bartoli, Roman S. Polishuck, Nika N. Danial, Bart De Strooper, et Luca Scorrano. 2006. « OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion ». *Cell* 126(1):177-89. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.025.
- Friedman, Jonathan R., Laura L. Lackner, Matthew West, Jared R. DiBenedetto, Jodi Nunnari, et Gia K. Voeltz. 2011. « ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division ». *Science (New York, N.Y.)* 334(6054):358-62. doi: 10.1126/science.1207385.
- Fu, Min, Pascal St-Pierre, Jay Shankar, Peter T. C. Wang, Bharat Joshi, et Ivan R. Nabi. 2013. « Regulation of Mitophagy by the Gp78 E3 Ubiquitin Ligase ». *Molecular Biology of the Cell* 24(8):1153-62. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0607.
- Fujioka, Hisashi, Bernard Tandler, et Charles L. Hoppel. 2012. « Mitochondrial Division in Rat Cardiomyocytes: An Electron Microscope Study ». *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 295(9):1455-61. doi: 10.1002/ar.22523.
- Fukai, Tohru, et Masuko Ushio-Fukai. 2011. « Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15(6):1583-1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.
- Gandre-Babbe, Shilpa, et Alexander M. van der Blik. 2008. « The Novel Tail-Anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 19(6):2402-12. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1287.
- Gao, Song, et Junjie Hu. 2021. « Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out ». *Trends in Cell Biology* 31(1):62-74. doi: 10.1016/j.tcb.2020.09.008.
- Garcia, Iraselia, Wendy Innis-Whitehouse, Alma Lopez, Megan Keniry, et Robert Gilkerson. 2018. « Oxidative Insults Disrupt OPA1-Mediated Mitochondrial Dynamics in Cultured Mammalian Cells ». *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 23(1):160-67. doi: 10.1080/13510002.2018.1492766.
- García, José J., Edgar Morales-Ríos, Paulina Cortés-Hernandez, et José S. Rodríguez-Zavala. 2006. « The Inhibitor Protein (IF1) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F1F0-ATP Synthase ». *Biochemistry* 45(42):12695-703. doi: 10.1021/bi060339j.

- García-Bermúdez, Javier, et José M. Cuezva. 2016. « The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A Master Regulator of Energy Metabolism and of Cell Survival ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857(8):1167-82. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.004.
- García-Bermúdez, Javier, María Sánchez-Aragó, Beatriz Soldevilla, Araceli Del Arco, Cristina Nuevo-Tapióles, et José M. Cuezva. 2015. « PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase ». *Cell Reports* 12(12):2143-55. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.052.
- Gawlowski, Thomas, Jorge Suarez, Brian Scott, Moises Torres-Gonzalez, Hong Wang, Raphaela Schwappacher, Xuemei Han, John R. Yates, Masahiko Hoshijima, et Wolfgang Dillmann. 2012. « Modulation of Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) Function by Increased O-Linked- β -N-Acetylglucosamine Modification (O-GlcNAc) in Cardiac Myocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(35):30024-34. doi: 10.1074/jbc.M112.390682.
- Gerber, Sylvie, Majida Charif, Arnaud Chevrollier, Tanguy Chaumette, Claire Angebault, Mariame Selma Kane, Aurélien Paris, Jennifer Alban, Mélanie Quiles, Cécile Delettre, Dominique Bonneau, Vincent Procaccio, Patrizia Amati-Bonneau, Pascal Reynier, Stéphanie Leruez, Raphael Calmon, Nathalie Boddaert, Benoit Funalot, Marlène Rio, Didier Bouccara, Isabelle Meunier, Hiromi Sesaki, Josseline Kaplan, Christian P. Hamel, Jean-Michel Rozet, et Guy Lenaers. 2017. « Mutations in DNMT1, as in OPA1, Result in Dominant Optic Atrophy despite Opposite Effects on Mitochondrial Fusion and Fission ». *Brain: A Journal of Neurology* 140(10):2586-96. doi: 10.1093/brain/awx219.
- Giacomello, Marta, Aswin Pyakurel, Christina Glytsou, et Luca Scorrano. 2020. « The Cell Biology of Mitochondrial Membrane Dynamics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21(4):204-24. doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.
- Gibbons, C., M. G. Montgomery, A. G. Leslie, et J. E. Walker. 2000. « The Structure of the Central Stalk in Bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å Resolution ». *Nature Structural Biology* 7(11):1055-61. doi: 10.1038/80981.
- Giraud, Marie-France, Patrick Paumard, Vincent Soubannier, Jacques Vaillier, Geneviève Arselin, Bénédicte Salin, Jacques Schaeffer, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, et Jean Velours. 2002. « Is There a Relationship between the Supramolecular Organization of the Mitochondrial ATP Synthase and the Formation of Cristae? ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1555(1-3):174-80. doi: 10.1016/s0005-2728(02)00274-8.
- Glytsou, Christina, Enrique Calvo, Sara Cogliati, Arpit Mehrotra, Irene Anastasia, Giovanni Rigoni, Andrea Raimondi, Norihito Shintani, Marta Loureiro, Jesús Vazquez, Luca Pellegrini, Jose Antonio Enriquez, Luca Scorrano, et Maria Eugenia Soriano. 2016. « Optic Atrophy 1 Is Epistatic to the Core MICOS Component MIC60 in Mitochondrial Cristae Shape Control ». *Cell Reports* 17(11):3024-34. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.049.
- Gohil, Vishal M., et Miriam L. Greenberg. 2009. « Mitochondrial Membrane Biogenesis: Phospholipids and Proteins Go Hand in Hand ». *The Journal of Cell Biology* 184(4):469-72. doi: 10.1083/jcb.200901127.
- Gomes, Ligia C., Giulietta Di Benedetto, et Luca Scorrano. 2011. « During Autophagy Mitochondria Elongate, Are Spared from Degradation and Sustain Cell Viability ». *Nature Cell Biology* 13(5):589-98. doi: 10.1038/ncb2220.
- Gómez, Luis A., Jeffrey S. Monette, Juan D. Chavez, Claudia S. Maier, et Tory M. Hagen. 2009. « Supercomplexes of the Mitochondrial Electron Transport Chain Decline in the Aging Rat Heart ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 490(1):30-35. doi: 10.1016/j.abb.2009.08.002.

- Gray, M. W., G. Burger, et B. F. Lang. 1999. « Mitochondrial Evolution ». *Science (New York, N.Y.)* 283(5407):1476-81. doi: 10.1126/science.283.5407.1476.
- Green, David W., et Gary J. Grover. 2000. « The IF1 Inhibitor Protein of the Mitochondrial F1F0-ATPase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1458(2):343-55. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00085-2.
- Grivennikova, Vera G., et Andrei D. Vinogradov. 2013. « Partitioning of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Mitochondrial Respiratory Complex I ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1827(3):446-54. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.002.
- Grover, Gary J., Karnail S. Atwal, Paul G. Sleph, Feng-Li Wang, Hossain Monshizadegan, Thomas Monticello, et David W. Green. 2004. « Excessive ATP Hydrolysis in Ischemic Myocardium by Mitochondrial F1F0-ATPase: Effect of Selective Pharmacological Inhibition of Mitochondrial ATPase Hydrolase Activity ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287(4):H1747-1755. doi: 10.1152/ajpheart.01019.2003.
- Grover, Gary J., et Johan Malm. 2008. « Pharmacological Profile of the Selective Mitochondrial F1F0 ATP Hydrolase Inhibitor BMS-199264 in Myocardial Ischemia ». *Cardiovascular Therapeutics* 26(4):287-96. doi: 10.1111/j.1755-5922.2008.00065.x.
- Guillery, O., F. Malka, P. Frachon, D. Milea, M. Rojo, et A. Lombès. 2008. « Modulation of Mitochondrial Morphology by Bioenergetics Defects in Primary Human Fibroblasts ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 18(4):319-30. doi: 10.1016/j.nmd.2007.12.008.
- Guo, Hui, et John L. Rubinstein. 2022. « Structure of ATP Synthase under Strain during Catalysis ». *Nature Communications* 13(1):2232. doi: 10.1038/s41467-022-29893-2.
- Guo, Runyu, Shuai Zong, Meng Wu, Jinke Gu, et Maojun Yang. 2017. « Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2 ». *Cell* 170(6):1247-1257.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.050.
- Gusic, Mirjana, Gudrun Schottmann, René G. Feichtinger, Chen Du, Caroline Scholz, Matias Wagner, Johannes A. Mayr, Chae-Young Lee, Vicente A. Yépez, Norbert Lorenz, Susanne Morales-Gonzalez, Daan M. Panneman, Agnès Rötig, Richard J. T. Rodenburg, Saskia B. Wortmann, Holger Prokisch, et Markus Schuelke. 2020. « Bi-Allelic UQCRFS1 Variants Are Associated with Mitochondrial Complex III Deficiency, Cardiomyopathy, and Alopecia Totalis ». *American Journal of Human Genetics* 106(1):102-11. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.12.005.
- Hackenbrock, C. R. 1966. « Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria. I. Reversible Ultrastructural Changes with Change in Metabolic Steady State in Isolated Liver Mitochondria ». *The Journal of Cell Biology* 30(2):269-97. doi: 10.1083/jcb.30.2.269.
- Hackenbrock, C. R., T. G. Rehn, E. C. Weinbach, et J. J. Lemasters. 1971. « Oxidative Phosphorylation and Ultrastructural Transformation in Mitochondria in the Intact Ascites Tumor Cell ». *The Journal of Cell Biology* 51(1):123-37. doi: 10.1083/jcb.51.1.123.
- Hahn, Alexander, Kristian Parey, Maike Bublitz, Deryck J. Mills, Volker Zickermann, Janet Vonck, Werner Kühlbrandt, et Thomas Meier. 2016. « Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology ». *Molecular Cell* 63(3):445-56. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.037.
- Hansford, R. G., B. A. Hogue, et V. Mildaziene. 1997. « Dependence of H2O2 Formation by Rat Heart Mitochondria on Substrate Availability and Donor Age ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29(1):89-95. doi: 10.1023/a:1022420007908.

- Hanson, Bonnie J., Roderick A. Capaldi, Michael F. Marusich, et Steven W. Sherwood. 2002. « An Immunocytochemical Approach to Detection of Mitochondrial Disorders ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 50(10):1281-88. doi: 10.1177/002215540205001001.
- Hayashi, J., S. Ohta, Y. Kagawa, D. Takai, S. Miyabayashi, K. Tada, H. Fukushima, K. Inui, S. Okada, et Y. Goto. 1994. « Functional and Morphological Abnormalities of Mitochondria in Human Cells Containing Mitochondrial DNA with Pathogenic Point Mutations in TRNA Genes ». *The Journal of Biological Chemistry* 269(29):19060-66.
- He, Jiuya, Holly C. Ford, Joe Carroll, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, et John E. Walker. 2017. « Persistence of the Mitochondrial Permeability Transition in the Absence of Subunit c of Human ATP Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(13):3409-14. doi: 10.1073/pnas.1702357114.
- He, Jiuya, Holly C. Ford, Joe Carroll, Corsten Douglas, Evvia Gonzales, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, et John E. Walker. 2018. « Assembly of the Membrane Domain of ATP Synthase in Human Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(12):2988-93. doi: 10.1073/pnas.1722086115.
- Head, Brian, Lorena Griparic, Mandana Amiri, Shilpa Gandre-Babbe, et Alexander M. van der Bliek. 2009. « Inducible Proteolytic Inactivation of OPA1 Mediated by the OMA1 Protease in Mammalian Cells ». *The Journal of Cell Biology* 187(7):959-66. doi: 10.1083/jcb.200906083.
- Heldt, H. W., H. Jacobs, et M. Klingenberg. 1965. « ENDOGENOUS ADP OF MITOCHONDRIA, AN EARLY PHOSPHATE ACCEPTOR OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AS DISCLOSED BY KINETIC STUDIES WITH C14 LABELLED ADP AND ATP AND WITH ATRACTYLOSIDE ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 18:174-79. doi: 10.1016/0006-291x(65)90736-9.
- Hirst, Judy. 2018. « Open Questions: Respiratory Chain Supercomplexes-Why Are They There and What Do They Do? » *BMC Biology* 16(1):111. doi: 10.1186/s12915-018-0577-5.
- Hirst, Judy, Martin S. King, et Kenneth R. Pryde. 2008. « The Production of Reactive Oxygen Species by Complex I ». *Biochemical Society Transactions* 36(Pt 5):976-80. doi: 10.1042/BST0360976.
- Hoppins, Suzanne, Frank Edlich, Megan M. Cleland, Soojay Banerjee, J. Michael McCaffery, Richard J. Youle, et Jodi Nunnari. 2011. « The Soluble Form of Bax Regulates Mitochondrial Fusion via MFN2 Homotypic Complexes ». *Molecular Cell* 41(2):150-60. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.030.
- Hoppins, Suzanne, Laura Lackner, et Jodi Nunnari. 2007a. « The Machines That Divide and Fuse Mitochondria ». *Annual Review of Biochemistry* 76:751-80. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
- Hoppins, Suzanne, Laura Lackner, et Jodi Nunnari. 2007b. « The Machines That Divide and Fuse Mitochondria ». *Annual Review of Biochemistry* 76:751-80. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
- Hu, Chao, Li Shu, Xiaoshuai Huang, Jianglong Yu, Liuju Li, Longlong Gong, Meigui Yang, Zhida Wu, Zhi Gao, Yungang Zhao, Liangyi Chen, et Zhiyin Song. 2020. « OPA1 and MICOS Regulate Mitochondrial Crista Dynamics and Formation ». *Cell Death & Disease* 11(10):940. doi: 10.1038/s41419-020-03152-y.
- Hu, Jinjiao, Yanhao Zhang, Xiuxing Jiang, Hongwei Zhang, Ziyi Gao, Yunong Li, Ruoqiu Fu, Lirong Li, Jie Li, Hongjuan Cui, et Ning Gao. 2019. « ROS-Mediated Activation and Mitochondrial Translocation of CaMKII Contributes to Drp1-Dependent Mitochondrial Fission and Apoptosis in Triple-Negative

- Breast Cancer Cells by Isorhamnetin and Chloroquine ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 38(1):225. doi: 10.1186/s13046-019-1201-4.
- Huang, Li-shar, David Cobessi, Eric Y. Tung, et Edward A. Berry. 2005. « BINDING OF THE RESPIRATORY CHAIN INHIBITOR ANTIMYCIN TO THE MITOCHONDRIAL bc1 COMPLEX: A NEW CRYSTAL STRUCTURE REVEALS AN ALTERED INTRAMOLECULAR HYDROGEN-BONDING PATTERN. » *Journal of molecular biology* 351(3):573-97. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.053.
- Huang, Qichao, Lei Zhan, Haiyan Cao, Jibin Li, Yinghua Lyu, Xu Guo, Jing Zhang, Lele Ji, Tingting Ren, Jiase An, Bingrong Liu, Yongzhan Nie, et Jinliang Xing. 2016. « Increased Mitochondrial Fission Promotes Autophagy and Hepatocellular Carcinoma Cell Survival through the ROS-Modulated Coordinated Regulation of the NFKB and TP53 Pathways ». *Autophagy* 12(6):999-1014. doi: 10.1080/15548627.2016.1166318.
- Huckriede, A., A. Heikema, K. Sjollem, P. Briones, et E. Agsteribbe. 1995. « Morphology of the Mitochondria in Heat Shock Protein 60 Deficient Fibroblasts from Mitochondrial Myopathy Patients. Effects of Stress Conditions ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 427(2):159-65. doi: 10.1007/BF00196521.
- Hutter, Eveline, Kathrin Renner, Gerald Pfister, Petra Stöckl, Pidder Jansen-Dürr, et Erich Gnaiger. 2004. « Senescence-Associated Changes in Respiration and Oxidative Phosphorylation in Primary Human Fibroblasts ». *The Biochemical Journal* 380(Pt 3):919-28. doi: 10.1042/BJ20040095.
- Imlay, James A. 2003. « Pathways of Oxidative Damage ». *Annual Review of Microbiology* 57:395-418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2006a. « Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1 ». *The EMBO Journal* 25(13):2966-77. doi: 10.1038/sj.emboj.7601184.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2006b. « Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1 ». *The EMBO Journal* 25(13):2966-77. doi: 10.1038/sj.emboj.7601184.
- Ishihara, Naotada, Masatoshi Nomura, Akihiro Jofuku, Hiroki Kato, Satoshi O. Suzuki, Keiji Masuda, Hidenori Otera, Yae Nakanishi, Ikuya Nonaka, Yu-Ichi Goto, Naoko Taguchi, Hidetaka Morinaga, Maki Maeda, Ryoichi Takayanagi, Sadaki Yokota, et Katsuyoshi Mihara. 2009. « Mitochondrial Fission Factor Drp1 Is Essential for Embryonic Development and Synapse Formation in Mice ». *Nature Cell Biology* 11(8):958-66. doi: 10.1038/ncb1907.
- Jaiquel Baron, Stephany, Martin S. King, Edmund R. S. Kunji, et Tom J. J. Schirris. 2021. « Characterization of Drug-Induced Human Mitochondrial ADP/ATP Carrier Inhibition ». *Theranostics* 11(11):5077-91. doi: 10.7150/thno.54936.
- Jakobs, Stefan, Nadia Martini, Astrid C. Schauss, Alexander Egner, Benedikt Westermann, et Stefan W. Hell. 2003. « Spatial and Temporal Dynamics of Budding Yeast Mitochondria Lacking the Division Component Fis1p ». *Journal of Cell Science* 116(Pt 10):2005-14. doi: 10.1242/jcs.00423.
- Jakobs, Stefan, Astrid C. Schauss, et Stefan W. Hell. 2003. « Photoconversion of Matrix Targeted GFP Enables Analysis of Continuity and Intermixing of the Mitochondrial Lumen ». *FEBS Letters* 554(1-2):194-200. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01170-0.
- James, Dominic I., Philippe A. Parone, Yves Mattenberger, et Jean-Claude Martinou. 2003. « Hfis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(38):36373-79. doi: 10.1074/jbc.M303758200.

- Jang, Sehwan, et Sabzali Javadov. 2020. « OPA1 Regulates Respiratory Supercomplexes Assembly: The Role of Mitochondrial Swelling ». *Mitochondrion* 51:30-39. doi: 10.1016/j.mito.2019.11.006.
- Jendrach, Marina, Sören Mai, Sandra Pohl, Monika Vöth, et Jürgen Bereiter-Hahn. 2008. « Short- and Long-Term Alterations of Mitochondrial Morphology, Dynamics and MtDNA after Transient Oxidative Stress ». *Mitochondrion* 8(4):293-304. doi: 10.1016/j.mito.2008.06.001.
- Jezek, Petr, et Lydie Hlavatá. 2005. « Mitochondria in Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Cell, Tissues, and Organism ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(12):2478-2503. doi: 10.1016/j.biocel.2005.05.013.
- Ji, Wei-Ke, Rajarshi Chakrabarti, Xintao Fan, Lori Schoenfeld, Stefan Strack, et Henry N. Higgs. 2017. « Receptor-Mediated Drp1 Oligomerization on Endoplasmic Reticulum ». *The Journal of Cell Biology* 216(12):4123-39. doi: 10.1083/jcb.201610057.
- Jonckheere, An I., Jan A. M. Smeitink, et Richard J. T. Rodenburg. 2012. « Mitochondrial ATP Synthase: Architecture, Function and Pathology ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35(2):211-25. doi: 10.1007/s10545-011-9382-9.
- Kaminsky, Vitaliy O., et Boris Zhivotovsky. 2014. « Free Radicals in Cross Talk between Autophagy and Apoptosis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21(1):86-102. doi: 10.1089/ars.2013.5746.
- Kane, Mariame Selma, Jennifer Alban, Valérie Desquirit-Dumas, Naïg Gueguen, Layal Ishak, Marc Ferre, Patrizia Amati-Bonneau, Vincent Procaccio, Dominique Bonneau, Guy Lenaers, Pascal Reynier, et Arnaud Chevrollier. 2017. « Autophagy Controls the Pathogenicity of OPA1 Mutations in Dominant Optic Atrophy ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(10):2284-97. doi: 10.1111/jcmm.13149.
- Kano, Arihiro, Takuma Iwasaki, et Mitsuru Shindo. 2019. « Bongkreic Acid Facilitates Glycolysis in Cultured Cells and Induces Cell Death under Low Glucose Conditions ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 20:100683. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100683.
- Kar, Rekha, Nandita Mishra, Prajjal K. Singha, Manjeri A. Venkatachalam, et Pothana Saikumar. 2010. « Mitochondrial Remodeling Following Fission Inhibition by 15d-PGJ2 Involves Molecular Changes in Mitochondrial Fusion Protein OPA1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399(4):548-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.108.
- Karbowski, M., et R. J. Youle. 2003. « Dynamics of Mitochondrial Morphology in Healthy Cells and during Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 10(8):870-80. doi: 10.1038/sj.cdd.4401260.
- Kaser, Michael, Melanie Kambacheld, Brigitte Kisters-Woike, et Thomas Langer. 2003. « Oma1, a Novel Membrane-Bound Metallopeptidase in Mitochondria with Activities Overlapping with the m-AAA Protease ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(47):46414-23. doi: 10.1074/jbc.M305584200.
- Kashani-Poor, N., S. Kerscher, V. Zickermann, et U. Brandt. 2001. « Efficient Large Scale Purification of His-Tagged Proton Translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from the Strictly Aerobic Yeast *Yarrowia Lipolytica* ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1504(2-3):363-70. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00266-8.
- Kashani-Poor, N., K. Zwicker, S. Kerscher, et U. Brandt. 2001. « A Central Functional Role for the 49-KDa Subunit within the Catalytic Core of Mitochondrial Complex I ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(26):24082-87. doi: 10.1074/jbc.M102296200.

- Kashatus, David F., Kian-Huat Lim, Donita C. Brady, Nicole L. K. Pershing, Adrienne D. Cox, et Christopher M. Counter. 2011. « RALA and RALBP1 Regulate Mitochondrial Fission at Mitosis ». *Nature Cell Biology* 13(9):1108-15. doi: 10.1038/ncb2310.
- Keller, Natalie, Cem Paketci, Pinar Edem, Holger Thiele, Uluc Yis, Brunhilde Wirth, et Mert Karakaya. 2021. « De Novo DNM1L Variant Presenting with Severe Muscular Atrophy, Dystonia and Sensory Neuropathy ». *European Journal of Medical Genetics* 64(2):104134. doi: 10.1016/j.ejmg.2020.104134.
- Khacho, Mireille, Michelle Tarabay, David Patten, Pamela Khacho, Jason G. MacLaurin, Jennifer Guadagno, Richard Bergeron, Sean P. Cregan, Mary-ellen Harper, David S. Park, et Ruth S. Slack. 2014. « Acidosis Overrides Oxygen Deprivation to Maintain Mitochondrial Function and Cell Survival ». *Nature Communications* 5:3550. doi: 10.1038/ncomms4550.
- Koirala, Sajjan, Qian Guo, Raghav Kalia, Huyen T. Bui, Debra M. Eckert, Adam Frost, et Janet M. Shaw. 2013. « Interchangeable Adaptors Regulate Mitochondrial Dynamin Assembly for Membrane Scission ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(15):E1342-1351. doi: 10.1073/pnas.1300855110.
- Kondadi, Arun Kumar, Ruchika Anand, et Andreas S. Reichert. 2020. « Cristae Membrane Dynamics - A Paradigm Change ». *Trends in Cell Biology* 30(12):923-36. doi: 10.1016/j.tcb.2020.08.008.
- Koopman, Werner J. H., Henk-Jan Visch, Sjoerd Verkaart, Lambertus W. P. J. van den Heuvel, Jan A. M. Smeitink, et Peter H. G. M. Willems. 2005. « Mitochondrial Network Complexity and Pathological Decrease in Complex I Activity Are Tightly Correlated in Isolated Human Complex I Deficiency ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 289(4):C881-890. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2005.
- Koopman, Werner J. H., Peter H. G. M. Willems, et Jan A. M. Smeitink. 2012. « Monogenic Mitochondrial Disorders ». *The New England Journal of Medicine* 366(12):1132-41. doi: 10.1056/NEJMra1012478.
- Korobova, Farida, Timothy J. Gauvin, et Henry N. Higgs. 2014. « A Role for Myosin II in Mammalian Mitochondrial Fission ». *Current Biology: CB* 24(4):409-14. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.032.
- Korobova, Farida, Vinay Ramabhadran, et Henry N. Higgs. 2013. « An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2 ». *Science (New York, N.Y.)* 339(6118):464-67. doi: 10.1126/science.1228360.
- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev, et A. A. Starkov. 1997. « High Protonic Potential Actuates a Mechanism of Production of Reactive Oxygen Species in Mitochondria ». *FEBS Letters* 416(1):15-18. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, Hsiuchen Chen, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2004. « Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 305(5685):858-62. doi: 10.1126/science.1099793.
- Kramer, David M., Arthur G. Roberts, Florian Muller, Jonathan Cape, et Michael K. Bowman. 2004. « Q-Cycle Bypass Reactions at the Qo Site of the Cytochrome Bc1 (and Related) Complexes ». *Methods in Enzymology* 382:21-45. doi: 10.1016/S0076-6879(04)82002-0.
- Kraus, Felix, Krishnendu Roy, Thomas J. Pucadyil, et Michael T. Ryan. 2021. « Function and Regulation of the Divisome for Mitochondrial Fission ». *Nature* 590(7844):57-66. doi: 10.1038/s41586-021-03214-x.
- Kubo, Shintaroh, Toru Niina, et Shoji Takada. 2020. « Molecular Dynamics Simulation of Proton-Transfer Coupled Rotations in ATP Synthase FO Motor ». *Scientific Reports* 10(1):8225. doi: 10.1038/s41598-020-65004-1.

- Kühlbrandt, Werner. 2019. « Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases ». *Annual Review of Biochemistry* 88:515-49. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.
- Kussmaul, Lothar, et Judy Hirst. 2006. « The Mechanism of Superoxide Production by NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Bovine Heart Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(20):7607-12. doi: 10.1073/pnas.0510977103.
- Labrousse, A. M., M. D. Zappaterra, D. A. Rube, et A. M. van der Bliek. 1999. « C. Elegans Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane ». *Molecular Cell* 4(5):815-26. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80391-3.
- Lackner, Laura L., Jennifer S. Horner, et Jodi Nunnari. 2009. « Mechanistic Analysis of a Dynamin Effector ». *Science (New York, N.Y.)* 325(5942):874-77. doi: 10.1126/science.1176921.
- Lambert, Adrian J., et Martin D. Brand. 2004a. « Inhibitors of the Quinone-Binding Site Allow Rapid Superoxide Production from Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(38):39414-20. doi: 10.1074/jbc.M406576200.
- Lambert, Adrian J., et Martin D. Brand. 2004b. « Superoxide Production by NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Depends on the PH Gradient across the Mitochondrial Inner Membrane ». *The Biochemical Journal* 382(Pt 2):511-17. doi: 10.1042/BJ20040485.
- Landes, Thomas, Laurent J. Emorine, Delphine Courilleau, Manuel Rojo, Pascale Belenguer, et Laetitia Arnauné-Pelloquin. 2010. « The BH3-Only Bnip3 Binds to the Dynamin Opa1 to Promote Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis by Distinct Mechanisms ». *EMBO Reports* 11(6):459-65. doi: 10.1038/embor.2010.50.
- Larrea, Delfina, Marta Pera, Adriano Gonnelli, Rubén Quintana-Cabrera, H. Orhan Akman, Cristina Guardia-Laguarta, Kevin R. Velasco, Estela Area-Gomez, Federica Dal Bello, Diego De Stefani, Rita Horvath, Michael E. Shy, Eric A. Schon, et Marta Giacomello. 2019. « MFN2 Mutations in Charcot-Marie-Tooth Disease Alter Mitochondria-Associated ER Membrane Function but Do Not Impair Bioenergetics ». *Human Molecular Genetics* 28(11):1782-1800. doi: 10.1093/hmg/ddz008.
- Larsson, Nils-Göran. 2010. « Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging ». *Annual Review of Biochemistry* 79:683-706. doi: 10.1146/annurev-biochem-060408-093701.
- Lazarou, Michael, Danielle A. Sliter, Lesley A. Kane, Shireen A. Sarraf, Chunxin Wang, Jonathon L. Burman, Dionisia P. Sideris, Adam I. Fogel, et Richard J. Youle. 2015. « The Ubiquitin Kinase PINK1 Recruits Autophagy Receptors to Induce Mitophagy ». *Nature* 524(7565):309-14. doi: 10.1038/nature14893.
- Leboucher, Guillaume P., Yien Che Tsai, Mei Yang, Kristin C. Shaw, Ming Zhou, Timothy D. Veenstra, Michael H. Glickman, et Allan M. Weissman. 2012. « Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis ». *Molecular Cell* 47(4):547-57. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.041.
- Lee, Wen-Chin, Lung-Chih Li, Jin-Bor Chen, et Hsueh-Wei Chang. 2015. « Indoxyl Sulfate-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Impaired Biogenesis Are Partly Protected by Vitamin C and N-Acetylcysteine ». *TheScientificWorldJournal* 2015:620826. doi: 10.1155/2015/620826.
- Lee, Yang-ja, Seon-Yong Jeong, Mariusz Karbowski, Carolyn L. Smith, et Richard J. Youle. 2004. « Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis ». *Molecular Biology of the Cell* 15(11):5001-11. doi: 10.1091/mbc.e04-04-0294.

- Lefebvre-Legendre, Linnka, Bénédicte Salin, Jacques Schaëffer, Daniel Brèthes, Alain Dautant, Sharon H. Ackerman, et Jean-Paul di Rago. 2005. « Failure to Assemble the Alpha 3 Beta 3 Subcomplex of the ATP Synthase Leads to Accumulation of the Alpha and Beta Subunits within Inclusion Bodies and the Loss of Mitochondrial Cristae in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(18):18386-92. doi: 10.1074/jbc.M410789200.
- Legros, Frédéric, Anne Lombès, Paule Frachon, et Manuel Rojo. 2002. « Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins ». *Molecular Biology of the Cell* 13(12):4343-54. doi: 10.1091/mbc.e02-06-0330.
- Legros, Frédéric, Florence Malka, Paule Frachon, Anne Lombès, et Manuel Rojo. 2004. « Organization and Dynamics of Human Mitochondrial DNA ». *Journal of Cell Science* 117(Pt 13):2653-62. doi: 10.1242/jcs.01134.
- Leman, Géraldine, Naïg Gueguen, Valérie Desquirit-Dumas, Mariame Selma Kane, Céline Wettervald, Stéphanie Chupin, Arnaud Chevrollier, Anne-Sophie Lebre, Jean-Paul Bonnefont, Magalie Barth, Patrizia Amati-Bonneau, Christophe Verny, Daniel Henrion, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, et Vincent Procaccio. 2015. « Assembly Defects Induce Oxidative Stress in Inherited Mitochondrial Complex I Deficiency ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 65:91-103. doi: 10.1016/j.biocel.2015.05.017.
- Lenzen, Sigurd. 2014. « A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(18):12189-94. doi: 10.1074/jbc.R114.557314.
- Ley-Ngardigal, Seyta, et Giulia Bertolin. 2021. « Approaches to Monitor ATP Levels in Living Cells: Where Do We Stand? » *The FEBS Journal*. doi: 10.1111/febs.16169.
- Li, Yu-Jie, Yu-Lu Cao, Jian-Xiong Feng, Yuanbo Qi, Shuxia Meng, Jie-Feng Yang, Ya-Ting Zhong, Sisi Kang, Xiaoxue Chen, Lan Lan, Li Luo, Bing Yu, Shoudeng Chen, David C. Chan, Junjie Hu, et Song Gao. 2019. « Structural Insights of Human Mitofusin-2 into Mitochondrial Fusion and CMT2A Onset ». *Nature Communications* 10(1):4914. doi: 10.1038/s41467-019-12912-0.
- Li, Zheng, Ken-Ichi Okamoto, Yasunori Hayashi, et Morgan Sheng. 2004. « The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses ». *Cell* 119(6):873-87. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.003.
- Liochev, S. I., et I. Fridovich. 1999. « Superoxide and Iron: Partners in Crime ». *IUBMB Life* 48(2):157-61. doi: 10.1080/713803492.
- Liot, G., B. Bossy, S. Lubitz, Y. Kushnareva, N. Sejbuk, et E. Bossy-Wetzel. 2009. « Complex II Inhibition by 3-NP Causes Mitochondrial Fragmentation and Neuronal Cell Death via an NMDA- and ROS-Dependent Pathway ». *Cell Death and Differentiation* 16(6):899-909. doi: 10.1038/cdd.2009.22.
- Loiseau, Dominique, Arnaud Chevrollier, Christophe Verny, Virginie Guillet, Naïg Gueguen, Marie-Anne Pou de Crescenzo, Marc Ferré, Marie-Claire Malinge, Agnès Guichet, Guillaume Nicolas, Patrizia Amati-Bonneau, Yves Malthiery, Dominique Bonneau, et Pascal Reynier. 2007. « Mitochondrial Coupling Defect in Charcot-Marie-Tooth Type 2A Disease ». *Annals of Neurology* 61(4):315-23. doi: 10.1002/ana.21086.
- Long, Qinqiang, Kevin Yang, et Qinglin Yang. 2015. « Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology ». *American Journal of Cardiovascular Disease* 5(1):19-32.
- Luciaková, K., et S. Kuzela. 1984. « Increased Content of Natural ATPase Inhibitor in Tumor Mitochondria ». *FEBS Letters* 177(1):85-88. doi: 10.1016/0014-5793(84)80986-2.

- MacDonald, M. J. 1982. « Evidence for the Malate Aspartate Shuttle in Pancreatic Islets ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 213(2):643-49. doi: 10.1016/0003-9861(82)90594-x.
- Macdonald, Patrick J., Christopher A. Francy, Natalia Stepanyants, Lance Lehman, Anthony Baglio, Jason A. Mears, Xin Qi, et Rajesh Ramachandran. 2016. « Distinct Splice Variants of Dynamin-Related Protein 1 Differentially Utilize Mitochondrial Fission Factor as an Effector of Cooperative GTPase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 291(1):493-507. doi: 10.1074/jbc.M115.680181.
- Macdonald, Patrick J., Natalia Stepanyants, Niharika Mehrotra, Jason A. Mears, Xin Qi, Hiromi Sesaki, et Rajesh Ramachandran. 2014. « A Dimeric Equilibrium Intermediate Nucleates Drp1 Reassembly on Mitochondrial Membranes for Fission ». *Molecular Biology of the Cell* 25(12):1905-15. doi: 10.1091/mbc.E14-02-0728.
- MacVicar, Thomas, et Thomas Langer. 2016. « OPA1 Processing in Cell Death and Disease – the Long and Short of It ». *J Cell Sci* 129(12):2297-2306. doi: 10.1242/jcs.159186.
- Maes, M. E., J. A. Grosser, R. L. Fehrman, C. L. Schlamp, et R. W. Nickells. 2019. « Completion of BAX Recruitment Correlates with Mitochondrial Fission during Apoptosis ». *Scientific Reports* 9(1):16565. doi: 10.1038/s41598-019-53049-w.
- Mahajan, Mukesh, Nikhil Bharambe, Yutong Shang, Bin Lu, Abhishek Mandal, Pooja Madan Mohan, Rihua Wang, Jennifer C. Boatz, Juan Manuel Martinez Galvez, Anna V. Shnyrova, Xin Qi, Matthias Buck, Patrick C. A. van der Wel, et Rajesh Ramachandran. 2021. « NMR Identification of a Conserved Drp1 Cardiolipin-Binding Motif Essential for Stress-Induced Mitochondrial Fission ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(29):e2023079118. doi: 10.1073/pnas.2023079118.
- Makino, Ayako, Jorge Suarez, Thomas Gawlowski, Wenlong Han, Hong Wang, Brian T. Scott, et Wolfgang H. Dillmann. 2011. « Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes ». *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300(6):R1296-1302. doi: 10.1152/ajpregu.00437.2010.
- Maldonado, Eduardo N., et John J. Lemasters. 2012. « Warburg Revisited: Regulation of Mitochondrial Metabolism by Voltage-Dependent Anion Channels in Cancer Cells ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342(3):637-41. doi: 10.1124/jpet.112.192153.
- Malka, Florence, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, et Manuel Rojo. 2005. « Separate Fusion of Outer and Inner Mitochondrial Membranes ». *EMBO Reports* 6(9):853-59. doi: 10.1038/sj.embor.7400488.
- Mannella, C. A., D. R. Pfeiffer, P. C. Bradshaw, I. I. Moraru, B. Slepchenko, L. M. Loew, C. E. Hsieh, K. Buttle, et M. Marko. 2001. « Topology of the Mitochondrial Inner Membrane: Dynamics and Bioenergetic Implications ». *IUBMB Life* 52(3-5):93-100. doi: 10.1080/15216540152845885.
- Manor, Uri, Sadie Bartholomew, Gonen Golani, Eric Christenson, Michael Kozlov, Henry Higgs, James Spudich, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2015. « A Mitochondria-Anchored Isoform of the Actin-Nucleating Spire Protein Regulates Mitochondrial Division ». *eLife* 4. doi: 10.7554/eLife.08828.
- Marroquin, Lisa D., James Hynes, James A. Dykens, Joseph D. Jamieson, et Yvonne Will. 2007. « Circumventing the Crabtree Effect: Replacing Media Glucose with Galactose Increases Susceptibility of HepG2 Cells to Mitochondrial Toxicants ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 97(2):539-47. doi: 10.1093/toxsci/kfm052.
- Martin, James L., Robert Ishmukhametov, David Spetzler, Tassilo Hornung, et Wayne D. Frasch. 2018. « Elastic Coupling Power Stroke Mechanism of the F1-ATPase Molecular Motor ». *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 115(22):5750-55. doi: 10.1073/pnas.1803147115.

- Martínez-Reyes, Inmaculada, et Navdeep S. Chandel. 2020. « Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease ». *Nature Communications* 11(1):102. doi: 10.1038/s41467-019-13668-3.
- Matic, Ivana, Stefania Cocco, Caterina Ferraina, Rebeca Martin-Jimenez, Fulvio Florenzano, James Crosby, Ramona Lupi, Giusy Amadoro, Claire Russell, Giuseppe Pignataro, Lucio Annunziato, Andrey Y. Abramov, et Michelangelo Campanella. 2016. « Neuroprotective Coordination of Cell Mitophagy by the ATPase Inhibitory Factor 1 ». *Pharmacological Research* 103:56-68. doi: 10.1016/j.phrs.2015.10.010.
- Mazat, Jean-Pierre, Anne Devin, et Stéphane Ransac. 2020. « Modelling Mitochondrial ROS Production by the Respiratory Chain ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 77(3):455-65. doi: 10.1007/s00018-019-03381-1.
- McCommis, Kyle S., et Brian N. Finck. 2015. « Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions ». *The Biochemical journal* 466(3):443-54. doi: 10.1042/BJ20141171.
- McKenna, Mary C., Helle S. Waagepetersen, Arne Schousboe, et Ursula Sonnewald. 2006. « Neuronal and Astrocytic Shuttle Mechanisms for Cytosolic-Mitochondrial Transfer of Reducing Equivalents: Current Evidence and Pharmacological Tools ». *Biochemical Pharmacology* 71(4):399-407. doi: 10.1016/j.bcp.2005.10.011.
- Mears, Jason A., Laura L. Lackner, Shunming Fang, Elena Ingerman, Jodi Nunnari, et Jenny E. Hinshaw. 2011. « Conformational Changes in Dnm1 Support a Contractile Mechanism for Mitochondrial Fission ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18(1):20-26. doi: 10.1038/nsmb.1949.
- Meeusen, Shelly, J. Michael McCaffery, et Jodi Nunnari. 2004. « Mitochondrial Fusion Intermediates Revealed in Vitro ». *Science (New York, N.Y.)* 305(5691):1747-52. doi: 10.1126/science.1100612.
- Minamikawa, T., D. A. Williams, D. N. Bowser, et P. Nagley. 1999. « Mitochondrial Permeability Transition and Swelling Can Occur Reversibly without Inducing Cell Death in Intact Human Cells ». *Experimental Cell Research* 246(1):26-37. doi: 10.1006/excr.1998.4290.
- Minauro-Sanmiguel, Fernando, Stephan Wilkens, et José J. García. 2005. « Structure of Dimeric Mitochondrial ATP Synthase: Novel F₀ Bridging Features and the Structural Basis of Mitochondrial Cristae Biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(35):12356-58. doi: 10.1073/pnas.0503893102.
- Mishra, Prashant, Valerio Carelli, Giovanni Manfredi, et David C. Chan. 2014. « Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation ». *Cell Metabolism* 19(4):630-41. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.011.
- Mishra, Prashant, et David C. Chan. 2016. « Metabolic Regulation of Mitochondrial Dynamics ». *The Journal of Cell Biology* 212(4):379-87. doi: 10.1083/jcb.201511036.
- Mitra, Kasturi, Christian Wunder, Badrinath Roysam, Gang Lin, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2009. « A Hyperfused Mitochondrial State Achieved at G1-S Regulates Cyclin E Buildup and Entry into S Phase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(29):11960-65. doi: 10.1073/pnas.0904875106.
- Moloney, Jennifer N., et Thomas G. Cotter. 2018. « ROS Signalling in the Biology of Cancer ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80:50-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.

- Morán, M., H. Rivera, M. Sánchez-Aragó, A. Blázquez, B. Merinero, C. Ugalde, J. Arenas, J. M. Cuezva, et M. A. Martín. 2010. « Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics Interplay in Complex I-Deficient Fibroblasts ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1802(5):443-53. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.02.001.
- Mourier, Arnaud, Elisa Motori, Tobias Brandt, Marie Lagouge, Ilian Atanassov, Anne Galinier, Gunter Rappl, Susanne Brodesser, Kjell Hultenby, Christoph Dieterich, et Nils-Göran Larsson. 2015. « Mitofusin 2 Is Required to Maintain Mitochondrial Coenzyme Q Levels ». *The Journal of Cell Biology* 208(4):429-42. doi: 10.1083/jcb.201411100.
- Mühleip, Alexander, Rasmus Kock Flygaard, Jana Ovciarikova, Alice Lacombe, Paula Fernandes, Lilach Sheiner, et Alexey Amunts. 2021. « ATP Synthase Hexamer Assemblies Shape Cristae of Toxoplasma Mitochondria ». *Nature Communications* 12(1):120. doi: 10.1038/s41467-020-20381-z.
- Mukherjee, Rukmini, et Oishee Chakrabarti. 2016. « Regulation of Mitofusin1 by Mahogunin Ring Finger-1 and the Proteasome Modulates Mitochondrial Fusion ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863(12):3065-83. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.022.
- Muller, Florian, Antony R. Crofts, et David M. Kramer. 2002. « Multiple Q-Cycle Bypass Reactions at the Qo Site of the Cytochrome Bc1 Complex ». *Biochemistry* 41(25):7866-74. doi: 10.1021/bi025581e.
- Murata, Daisuke, Tatsuya Yamada, Takeshi Tokuyama, Kenta Arai, Pedro M. Quirós, Carlos López-Otín, Miho Iijima, et Hiromi Sesaki. 2020. « Mitochondrial Safeguard: A Stress Response That Offsets Extreme Fusion and Protects Respiratory Function via Flickering-Induced Oma1 Activation ». *The EMBO Journal* 39(24):e105074. doi: 10.15252/embj.2020105074.
- Nakamura, Nobuhiro, Yasuo Kimura, Masaki Tokuda, Shinji Honda, et Shigehisa Hirose. 2006. « MARCH-V Is a Novel Mitofusin 2- and Drp1-Binding Protein Able to Change Mitochondrial Morphology ». *EMBO Reports* 7(10):1019-22. doi: 10.1038/sj.embor.7400790.
- Nakashima, Izumi, Masashi Kato, Anwarul A. Akhand, Haruhiko Suzuki, Kozue Takeda, Kahled Hossain, et Yoshiyuki Kawamoto. 2002. « Redox-Linked Signal Transduction Pathways for Protein Tyrosine Kinase Activation ». *Antioxidants & Redox Signaling* 4(3):517-31. doi: 10.1089/15230860260196326.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, et Richard J. Youle. 2008. « Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 183(5):795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125.
- Nasrallah, Carole M., et Tamas L. Horvath. 2014. « Mitochondrial Dynamics in the Central Regulation of Metabolism ». *Nature Reviews. Endocrinology* 10(11):650-58. doi: 10.1038/nrendo.2014.160.
- Nesci, Salvatore, Fabiana Trombetti, Alessandra Pagliarani, Vittoria Ventrella, Cristina Algeri, Gaia Tioli, et Giorgio Lenaz. 2021. « Molecular and Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System: Implications for Pathology ». *Life (Basel, Switzerland)* 11(3):242. doi: 10.3390/life11030242.
- Ni, Hong-Min, Jessica A. Williams, et Wen-Xing Ding. 2015. « Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Quality Control ». *Redox Biology* 4:6-13. doi: 10.1016/j.redox.2014.11.006.
- Niemann, Axel, Marcel Ruegg, Veronica La Padula, Angelo Schenone, et Ueli Suter. 2005. « Ganglioside-Induced Differentiation Associated Protein 1 Is a Regulator of the Mitochondrial Network: New Implications for Charcot-Marie-Tooth Disease ». *The Journal of Cell Biology* 170(7):1067-78. doi: 10.1083/jcb.200507087.

- Nůsková, Hana, Tomáš Mráček, Tereza Mikulová, Marek Vrbacký, Nikola Kovářová, Jana Kovalčíková, Petr Pecina, et Josef Houštěk. 2015. « Mitochondrial ATP Synthasome: Expression and Structural Interaction of Its Components ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464(3):787-93. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.034.
- Oanh, Nguyen Thi Kim, Yong-Yea Park, et Hyeseong Cho. 2017. « Mitochondria Elongation Is Mediated through SIRT1-Mediated MFN1 Stabilization ». *Cellular Signalling* 38:67-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.06.019.
- Ogata, T., et F. Murata. 1969. « Cytological Features of Three Fiber Types in Human Striated Muscle ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 99(3):225-45. doi: 10.1620/tjem.99.225.
- Ohba, Yohsuke, Thomas MacVicar, et Thomas Langer. 2020. « Regulation of Mitochondrial Plasticity by the I-AAA Protease YME1L ». *Biological Chemistry* 401(6-7):877-90. doi: 10.1515/hsz-2020-0120.
- Olichon, A., G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, et G. Lenaers. 2007. « OPA1 Alternate Splicing Uncouples an Evolutionary Conserved Function in Mitochondrial Fusion from a Vertebrate Restricted Function in Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 14(4):682-92. doi: 10.1038/sj.cdd.4402048.
- Olichon, Aurélien, Laurent Baricault, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Annie Valette, Pascale Belenguer, et Guy Lenaers. 2003. « Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):7743-46. doi: 10.1074/jbc.C200677200.
- Olichon, Aurélien, Thomas Landes, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J. Emorine, Valérie Mils, Agnès Guichet, Cécile Delettre, Christian Hamel, Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Bonneau, Pascal Reynier, Guy Lenaers, et Pascale Belenguer. 2007. « Effects of OPA1 Mutations on Mitochondrial Morphology and Apoptosis: Relevance to ADOA Pathogenesis ». *Journal of Cellular Physiology* 211(2):423-30. doi: 10.1002/jcp.20950.
- Onishi, Mashun, Koji Yamano, Miyuki Sato, Noriyuki Matsuda, et Koji Okamoto. 2021. « Molecular Mechanisms and Physiological Functions of Mitophagy ». *The EMBO Journal* 40(3):e104705. doi: 10.15252/embj.2020104705.
- Osellame, Laura D., Abeer P. Singh, David A. Stroud, Catherine S. Palmer, Diana Stojanovski, Rajesh Ramachandran, et Michael T. Ryan. 2016. « Cooperative and Independent Roles of the Drp1 Adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in Mitochondrial Fission ». *Journal of Cell Science* 129(11):2170-81. doi: 10.1242/jcs.185165.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M. Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J. Youle, et Katsuyoshi Mihara. 2010. « Mff Is an Essential Factor for Mitochondrial Recruitment of Drp1 during Mitochondrial Fission in Mammalian Cells ». *The Journal of Cell Biology* 191(6):1141-58. doi: 10.1083/jcb.201007152.
- van den Ouweland, J. M., P. Maechler, C. B. Wollheim, G. Attardi, et J. A. Maassen. 1999. « Functional and Morphological Abnormalities of Mitochondria Harboring the TRNA(Leu)(UUR) Mutation in Mitochondrial DNA Derived from Patients with Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) and Progressive Kidney Disease ». *Diabetologia* 42(4):485-92. doi: 10.1007/s001250051183.
- Pagliuso, Alessandro, To Nam Tham, Julia K. Stevens, Thibault Lagache, Roger Persson, Audrey Salles, Jean-Christophe Olivo-Marin, Stéphane Oddos, Anne Spang, Pascale Cossart, et Fabrizia Stavru. 2016. « A Role for Septin 2 in Drp1-Mediated Mitochondrial Fission ». *EMBO Reports* 17(6):858-73. doi: 10.15252/embr.201541612.

- Palmer, Catherine S., Laura D. Osellame, David Laine, Olga S. Koutsopoulos, Ann E. Frazier, et Michael T. Ryan. 2011. « MiD49 and MiD51, New Components of the Mitochondrial Fission Machinery ». *EMBO Reports* 12(6):565-73. doi: 10.1038/embor.2011.54.
- Panieri, E., et M. M. Santoro. 2016. « ROS Homeostasis and Metabolism: A Dangerous Liason in Cancer Cells ». *Cell Death & Disease* 7(6):e2253. doi: 10.1038/cddis.2016.105.
- Papa, Sergio, Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaballo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, et Vittoria Petruzzella. 2012. « The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 942:3-37. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1_1.
- Park, Yong-Yea, Seungmin Lee, Mariusz Karbowski, Albert Neutzner, Richard J. Youle, et Hyeseong Cho. 2010. « Loss of MARCH5 Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase Induces Cellular Senescence through Dynamin-Related Protein 1 and Mitofusin 1 ». *Journal of Cell Science* 123(Pt 4):619-26. doi: 10.1242/jcs.061481.
- Parone, Philippe A., Sandrine Da Cruz, Daniel Tondera, Yves Mattenberger, Dominic I. James, Pierre Maechler, François Barja, et Jean-Claude Martinou. 2008. « Preventing Mitochondrial Fission Impairs Mitochondrial Function and Leads to Loss of Mitochondrial DNA ». *PloS One* 3(9):e3257. doi: 10.1371/journal.pone.0003257.
- Paumard, Patrick, Jacques Vaillier, Bénédicte Couлары, Jacques Schaeffer, Vincent Soubannier, David M. Mueller, Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago, et Jean Velours. 2002. « The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology ». *The EMBO Journal* 21(3):221-30. doi: 10.1093/emboj/21.3.221.
- Pedrola, Laia, Antonio Espert, Xingyao Wu, Reyes Claramunt, Michael E. Shy, et Francesc Palau. 2005. « GDAP1, the Protein Causing Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4A, Is Expressed in Neurons and Is Associated with Mitochondria ». *Human Molecular Genetics* 14(8):1087-94. doi: 10.1093/hmg/ddi121.
- Pfaff, E., et M. Klingenberg. 1968. « Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. 1. Specificity and Control ». *European Journal of Biochemistry* 6(1):66-79. doi: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb00420.x.
- Pfaff, E., M. Klingenberg, et H. W. Heldt. 1965. « Unspecific Permeation and Specific Exchange of Adenine Nucleotides in Liver Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 104(1):312-15. doi: 10.1016/0304-4165(65)90258-8.
- Pham, Nhu-An, Tim Richardson, Jessie Cameron, Bruno Chue, et Brian H. Robinson. 2004. « Altered Mitochondrial Structure and Motion Dynamics in Living Cells with Energy Metabolism Defects Revealed by Real Time Microscope Imaging ». *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 10(2):247-60. doi: 10.1017/S143192760404005X.
- Pich, Sara, Daniel Bach, Paz Briones, Marc Liesa, Marta Camps, Xavier Testar, Manuel Palacín, et Antonio Zorzano. 2005. « The Charcot-Marie-Tooth Type 2A Gene Product, Mfn2, up-Regulates Fuel Oxidation through Expression of OXPHOS System ». *Human Molecular Genetics* 14(11):1405-15. doi: 10.1093/hmg/ddi149.
- Plečić-Hlavatá, Lydie, et Petr Ježek. 2016. « Integration of Superoxide Formation and Cristae Morphology for Mitochondrial Redox Signaling ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 80:31-50. doi: 10.1016/j.biocel.2016.09.010.

- Pletjushkina, O. Yu, K. G. Lyamzaev, E. N. Popova, O. K. Nepryakhina, O. Yu Ivanova, L. V. Domnina, B. V. Chernyak, et V. P. Skulachev. 2006. « Effect of Oxidative Stress on Dynamics of Mitochondrial Reticulum ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757(5-6):518-24. doi: 10.1016/j.bbabo.2006.03.018.
- Prieto, Javier, Marian León, Xavier Ponsoda, Ramón Sendra, Roque Bort, Raquel Ferrer-Lorente, Angel Raya, Carlos López-García, et Josema Torres. 2016. « Early ERK1/2 Activation Promotes DRP1-Dependent Mitochondrial Fission Necessary for Cell Reprogramming ». *Nature Communications* 7:11124. doi: 10.1038/ncomms11124.
- Pullman, M. E., et G. C. Monroy. 1963. « A NATURALLY OCCURRING INHIBITOR OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ». *The Journal of Biological Chemistry* 238:3762-69.
- Pyakurel, Aswin, Claudia Savoia, Daniel Hess, et Luca Scorrano. 2015. « Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis ». *Molecular Cell* 58(2):244-54. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.021.
- Qi, Xin, Marie-Helene Disatnik, Ning Shen, Raymond A. Sobel, et Daria Mochly-Rosen. 2011. « Aberrant Mitochondrial Fission in Neurons Induced by Protein Kinase C{delta} under Oxidative Stress Conditions in Vivo ». *Molecular Biology of the Cell* 22(2):256-65. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0551.
- Quinlan, Casey L., Akos A. Gerencser, Jason R. Treberg, et Martin D. Brand. 2011. « The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-Inhibited Mitochondrial Q-Cycle ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(36):31361-72. doi: 10.1074/jbc.M111.267898.
- Quinlan, Casey L., Adam L. Orr, Irina V. Pervoshchikova, Jason R. Treberg, Brian A. Ackrell, et Martin D. Brand. 2012. « Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(32):27255-64. doi: 10.1074/jbc.M112.374629.
- Quintana-Cabrera, R., A. Mehrotra, G. Rigoni, et M. E. Soriano. 2018. « Who and How in the Regulation of Mitochondrial Cristae Shape and Function ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500(1):94-101. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.088.
- Quintana-Cabrera, Rubén, Charlotte Quirin, Christina Glytsou, Mauro Corrado, Andrea Urbani, Anna Pellattiero, Enrique Calvo, Jesús Vázquez, José Antonio Enríquez, Christoph Gerle, María Eugenia Soriano, Paolo Bernardi, et Luca Scorrano. 2018. « The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function ». *Nature Communications* 9. doi: 10.1038/s41467-018-05655-x.
- Rainbolt, T. Kelly, Jaclyn M. Saunders, et R. Luke Wiseman. 2015. « YME1L Degradation Reduces Mitochondrial Proteolytic Capacity during Oxidative Stress ». *EMBO Reports* 16(1):97-106. doi: 10.15252/embr.201438976.
- Rak, Malgorzata, Emmanuel Tetaud, François Godard, Isabelle Sagot, Bénédicte Salin, Stéphane Duvezin-Caubet, Piotr P. Slonimski, Joanna Rytka, et Jean-Paul di Rago. 2007. « Yeast Cells Lacking the Mitochondrial Gene Encoding the ATP Synthase Subunit 6 Exhibit a Selective Loss of Complex IV and Unusual Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(15):10853-64. doi: 10.1074/jbc.M608692200.
- Rambold, Angelika S., Brenda Kostecky, Natalie Elia, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2011. « Tubular Network Formation Protects Mitochondria from Autophagosomal Degradation during Nutrient Starvation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(25):10190-95. doi: 10.1073/pnas.1107402108.

- Rampelt, Heike, et Martin van der Laan. 2017. « The Yin & Yang of Mitochondrial Architecture - Interplay of MICOS and F1Fo-ATP Synthase in Cristae Formation ». *Microbial Cell (Graz, Austria)* 4(8):236-39. doi: 10.15698/mic2017.08.583.
- Rampelt, Heike, Ralf M. Zerbes, Martin van der Laan, et Nikolaus Pfanner. 2017. « Role of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System in Membrane Architecture and Dynamics ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864(4):737-46. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.020.
- Rehklau, Katharina, Lena Hoffmann, Christine B. Gurniak, Martin Ott, Walter Witke, Luca Scorrano, Carsten Culmsee, et Marco B. Rust. 2017. « Cofilin1-Dependent Actin Dynamics Control DRP1-Mediated Mitochondrial Fission ». *Cell Death & Disease* 8(10):e3063. doi: 10.1038/cddis.2017.448.
- Reubold, Thomas F., Katja Faelber, Nuria Plattner, York Posor, Katharina Ketel, Ute Curth, Jeanette Schlegel, Roopsee Anand, Dietmar J. Manstein, Frank Noé, Volker Haucke, Oliver Daumke, et Susanne Eschenburg. 2015. « Crystal Structure of the Dynamin Tetramer ». *Nature* 525(7569):404-8. doi: 10.1038/nature14880.
- Rizwan, Huma, Sweta Pal, Silpa Sabnam, et Arttrana Pal. 2020. « High Glucose Augments ROS Generation Regulates Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis via Stress Signalling Cascades in Keratinocytes ». *Life Sciences* 241:117148. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117148.
- Rojo, Manuel, Frédéric Legros, Danielle Chateau, et Anne Lombès. 2002. « Membrane Topology and Mitochondrial Targeting of Mitofusins, Ubiquitous Mammalian Homologs of the Transmembrane GTPase Fzo ». *Journal of Cell Science* 115(Pt 8):1663-74.
- Rosdah, Ayesah A., William J. Smiles, Jonathan S. Oakhill, John W. Scott, Christopher G. Langendorf, Lea M. D. Delbridge, Jessica K. Holien, et Shiang Y. Lim. 2020. « New Perspectives on the Role of Drp1 Isoforms in Regulating Mitochondrial Pathophysiology ». *Pharmacology & Therapeutics* 213:107594. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107594.
- Rosignol, Rodrigue, Robert Gilkerson, Robert Aggeler, Kunihiro Yamagata, S. James Remington, et Roderick A. Capaldi. 2004. « Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells ». *Cancer Research* 64(3):985-93. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-1101.
- Rottenberg, Hagai, Raul Covian, et Bernard L. Trumpower. 2009. « Membrane Potential Greatly Enhances Superoxide Generation by the Cytochrome Bc1 Complex Reconstituted into Phospholipid Vesicles ». *The Journal of Biological Chemistry* 284(29):19203-10. doi: 10.1074/jbc.M109.017376.
- Roy, Krishnendu, et Thomas J. Pucadyil. 2022. « Is Drp1 Sufficient to Catalyze Membrane Fission? ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(27):e2201709119. doi: 10.1073/pnas.2201709119.
- Ruprecht, Jonathan J., Martin S. King, Thomas Zögg, Antoniya A. Aleksandrova, Els Pardon, Paul G. Crichton, Jan Steyaert, et Edmund R. S. Kunji. 2019. « The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier ». *Cell* 176(3):435-447.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.025.
- S, Li, Xu S, Roelofs Ba, Boyman L, Lederer Wj, Sesaki H, et Karbowski M. 2015. « Transient Assembly of F-Actin on the Outer Mitochondrial Membrane Contributes to Mitochondrial Fission ». *The Journal of Cell Biology* 208(1). doi: 10.1083/jcb.201404050.
- Salewskij, Kirill, Bettina Rieger, Frances Hager, Tasnim Arroum, Patrick Duwe, Jimmy Villalta, Sara Colgiati, Christian P. Richter, Olympia E. Psathaki, José A. Enriquez, Timo Dellmann, et Karin B. Busch. 2020. « The Spatio-Temporal Organization of Mitochondrial F1FO ATP Synthase in Cristae Depends on Its Activity Mode ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1861(1):148091. doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148091.

- Samant, Sadhana A., Hannah J. Zhang, Zhigang Hong, Vinodkumar B. Pillai, Nagalingam R. Sundaresan, Donald Wolfgeher, Stephen L. Archer, David C. Chan, et Mahesh P. Gupta. 2014. « SIRT3 Deacetylates and Activates OPA1 to Regulate Mitochondrial Dynamics during Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 34(5):807-19. doi: 10.1128/MCB.01483-13.
- Sarzi, Emmanuelle, Claire Angebault, Marie Seveno, Naïg Gueguen, Benjamin Chaix, Guy Bielicki, Nathalie Boddaert, Anne-Laure Mausset-Bonnefont, Chantal Cazevielle, Valérie Rigau, Jean-Pierre Renou, Jing Wang, Cécile Delettre, Philippe Brabet, Jean-Luc Puel, Christian P. Hamel, Pascal Reynier, et Guy Lenaers. 2012. « The Human OPA1delTTAG Mutation Induces Premature Age-Related Systemic Neurodegeneration in Mouse ». *Brain: A Journal of Neurology* 135(Pt 12):3599-3613. doi: 10.1093/brain/aws303.
- Sauvanet, Cécile, Stéphane Duvezin-Caubet, Jean-Paul di Rago, et Manuel Rojo. 2010. « Energetic Requirements and Bioenergetic Modulation of Mitochondrial Morphology and Dynamics ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21(6):558-65. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.12.006.
- Schatz, G. 1995. « Mitochondria: Beyond Oxidative Phosphorylation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1271(1):123-26. doi: 10.1016/0925-4439(95)00018-y.
- Schieber, Michael, et Navdeep S. Chandel. 2014. « TOR Signaling Couples Oxygen Sensing to Lifespan in *C. Elegans* ». *Cell Reports* 9(1):9-15. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.075.
- Schnell, Danny J., et Daniel N. Hebert. 2003. « Protein Translocons: Multifunctional Mediators of Protein Translocation across Membranes ». *Cell* 112(4):491-505. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00110-7.
- Schwartz, W. 1973. « Lynn Margulis, Origin of Eukaryotic Cells. Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. XXII u. 349 S., 89 Abb., 49 Tab. New Haven-London 1970: Yale University Press \$ 15.00 ». *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie* 13(2):186-186. doi: 10.1002/jobm.19730130220.
- Sesaki, H., et R. E. Jensen. 1999. « Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape ». *The Journal of Cell Biology* 147(4):699-706. doi: 10.1083/jcb.147.4.699.
- Shadel, Gerald S., et Tamas L. Horvath. 2015. « Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis ». *Cell* 163(3):560-69. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.001.
- Sheffer, Ruth, Liza Douiev, Simon Edvardson, Avraham Shaag, Khaled Tamimi, Devorah Soiferman, Vardiella Meiner, et Ann Saada. 2016. « Postnatal Microcephaly and Pain Insensitivity Due to a de Novo Heterozygous DNMI1L Mutation Causing Impaired Mitochondrial Fission and Function ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 170(6):1603-7. doi: 10.1002/ajmg.a.37624.
- Shimabukuro, Katsuya, Ryohei Yasuda, Eiro Muneyuki, Kiyotaka Y. Hara, Kazuhiko Kinoshita, et Masasuke Yoshida. 2003. « Catalysis and Rotation of F1 Motor: Cleavage of ATP at the Catalytic Site Occurs in 1 Ms before 40 Degree Substep Rotation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):14731-36. doi: 10.1073/pnas.2434983100.
- Shutt, Timothy, Michèle Geoffrion, Ross Milne, et Heidi M. McBride. 2012. « The Intracellular Redox State Is a Core Determinant of Mitochondrial Fusion ». *EMBO Reports* 13(10):909-15. doi: 10.1038/embor.2012.128.
- Signes, Alba, et Erika Fernandez-Vizarra. 2018. « Assembly of Mammalian Oxidative Phosphorylation Complexes I-V and Supercomplexes ». *Essays in Biochemistry* 62(3):255-70. doi: 10.1042/EBC20170098.

- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, et A. M. van der Bliek. 2001a. « Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 12(8):2245-56.
- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, et A. M. van der Bliek. 2001b. « Dynamin-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 12(8):2245-56. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245.
- Smirnova, E., D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, B. Pishvae, et A. M. van der Bliek. 1999. « A Model for Dynamin Self-Assembly Based on Binding between Three Different Protein Domains ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(21):14942-47. doi: 10.1074/jbc.274.21.14942.
- Solaini, Giancarlo, Gianluca Sgarbi, et Alessandra Baracca. 2021. « The F1Fo-ATPase Inhibitor, IF1, Is a Critical Regulator of Energy Metabolism in Cancer Cells ». *Biochemical Society Transactions* 49(2):815-27. doi: 10.1042/BST20200742.
- Song, Zhiyin, Hsiuchen Chen, Maja Fiket, Christiane Alexander, et David C. Chan. 2007. « OPA1 Processing Controls Mitochondrial Fusion and Is Regulated by MRNA Splicing, Membrane Potential, and Yme1L ». *The Journal of Cell Biology* 178(5):749-55. doi: 10.1083/jcb.200704110.
- Sooyeon, Lee, Kristina L. Go, et Jae-Sung Kim. 2016. « Deacetylation of Mitofusin-2 by Sirtuin-1: A Critical Event in Cell Survival after Ischemia ». *Molecular & Cellular Oncology* 3(2):e1087452. doi: 10.1080/23723556.2015.1087452.
- van der Stel, Wanda, Huan Yang, Sylvia E. le Dévédec, Bob van de Water, Joost B. Beltman, et Erik H. J. Danen. 2022. « High-Content High-Throughput Imaging Reveals Distinct Connections between Mitochondrial Morphology and Functionality for OXPHOS Complex I, III, and V Inhibitors ». *Cell Biology and Toxicology*. doi: 10.1007/s10565-022-09712-6.
- St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, et Martin D. Brand. 2002. « Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(47):44784-90. doi: 10.1074/jbc.M207217200.
- Strauss, Mike, Götz Hofhaus, Rasmus R. Schröder, et Werner Kühlbrandt. 2008. « Dimer Ribbons of ATP Synthase Shape the Inner Mitochondrial Membrane ». *The EMBO Journal* 27(7):1154-60. doi: 10.1038/emboj.2008.35.
- Sugiura, Ayumu, Ryo Yonashiro, Toshifumi Fukuda, Nobuko Matsushita, Shun Nagashima, Ryoko Inatome, et Shigeru Yanagi. 2011. « A Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL Controls Cell Toxicity of Polyglutamine-Expanded Protein ». *Mitochondrion* 11(1):139-46. doi: 10.1016/j.mito.2010.09.001.
- Suzuki, Motoshi, Seon Yong Jeong, Mariusz Karbowski, Richard J. Youle, et Nico Tjandra. 2003. « The Solution Structure of Human Mitochondria Fission Protein Fis1 Reveals a Novel TPR-like Helix Bundle ». *Journal of Molecular Biology* 334(3):445-58. doi: 10.1016/j.jmb.2003.09.064.
- Swierczek, Monika, Ewelina Cieluch, Marcin Sarewicz, Arkadiusz Borek, Christopher C. Moser, P. Leslie Dutton, et Artur Osyczka. 2010. « An Electronic Bus Bar Lies in the Core of Cytochrome Bc1 ». *Science (New York, N.Y.)* 329(5990):451-54. doi: 10.1126/science.1190899.
- Symersky, Jindrich, Daniel Osowski, D. Eric Walters, et David M. Mueller. 2012. « Oligomycin Frames a Common Drug-Binding Site in the ATP Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(35):13961-65. doi: 10.1073/pnas.1207912109.

- Szczepanowska, Joanna, Krzysztof Zabłocki, et Jerzy Duszyński. 2004. « Influence of a Mitochondrial Genetic Defect on Capacitative Calcium Entry and Mitochondrial Organization in the Osteosarcoma Cells ». *FEBS Letters* 578(3):316-22. doi: 10.1016/j.febslet.2004.11.022.
- T, Ogata, et Yamasaki Y. 1985. « Scanning Electron-Microscopic Studies on the Three-Dimensional Structure of Mitochondria in the Mammalian Red, White and Intermediate Muscle Fibers ». *Cell and Tissue Research* 241(2). doi: 10.1007/BF00217168.
- Taguchi, Naoko, Naotada Ishihara, Akihiro Jofuku, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2007. « Mitotic Phosphorylation of Dynamin-Related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(15):11521-29. doi: 10.1074/jbc.M607279200.
- Tanaka, Atsushi, Megan M. Cleland, Shan Xu, Derek P. Narendra, Der-Fen Suen, Mariusz Karbowski, et Richard J. Youle. 2010. « Proteasome and P97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin ». *The Journal of Cell Biology* 191(7):1367-80. doi: 10.1083/jcb.201007013.
- Tilokani, Lisa, Shun Nagashima, Vincent Paupe, et Julien Prudent. 2018. « Mitochondrial Dynamics: Overview of Molecular Mechanisms ». *Essays in Biochemistry* 62(3):341-60. doi: 10.1042/EBC20170104.
- Tondera, Daniel, Stéphanie Grandemange, Alexis Jourdain, Mariusz Karbowski, Yves Mattenberger, Sébastien Herzig, Sandrine Da Cruz, Pascaline Clerc, Ines Raschke, Carsten Merkwirth, Sarah Ehses, Frank Krause, David C. Chan, Christiane Alexander, Christoph Bauer, Richard Youle, Thomas Langer, et Jean-Claude Martinou. 2009. « SLP-2 Is Required for Stress-Induced Mitochondrial Hyperfusion ». *The EMBO Journal* 28(11):1589-1600. doi: 10.1038/emboj.2009.89.
- Toyama, Erin Quan, Sébastien Herzig, Julien Curchet, Tommy L. Lewis, Oliver C. Losón, Kristina Hellberg, Nathan P. Young, Hsiuchen Chen, Franck Polleux, David C. Chan, et Reuben J. Shaw. 2016. « Metabolism. AMP-Activated Protein Kinase Mediates Mitochondrial Fission in Response to Energy Stress ». *Science (New York, N.Y.)* 351(6270):275-81. doi: 10.1126/science.aab4138.
- Trifunovic, Aleksandra, Anna Hansson, Anna Wredenberg, Anja T. Rovio, Eric Dufour, Ivan Khvorostov, Johannes N. Spelbrink, Rolf Wibom, Howard T. Jacobs, et Nils-Göran Larsson. 2005. « Somatic MtDNA Mutations Cause Aging Phenotypes without Affecting Reactive Oxygen Species Production ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(50):17993-98. doi: 10.1073/pnas.0508886102.
- Tuena Gómez-Puyou, M. T., O. B. Martins, et A. Gómez-Puyou. 1988. « Synthesis and Hydrolysis of ATP by the Mitochondrial ATP Synthase ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 66(7):677-82. doi: 10.1139/o88-077.
- Turrens, J. F., A. Alexandre, et A. L. Lehninger. 1985. « Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 237(2):408-14. doi: 10.1016/0003-9861(85)90293-0.
- Twig, Gilad, Brigham Hyde, et Orian S. Shirihai. 2008. « Mitochondrial Fusion, Fission and Autophagy as a Quality Control Axis: The Bioenergetic View ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1777(9):1092-97. doi: 10.1016/j.bbabo.2008.05.001.
- Ueno, H., H. Miyoshi, K. Ebisui, et H. Iwamura. 1994. « Comparison of the Inhibitory Action of Natural Rotenone and Its Stereoisomers with Various NADH-Ubiquinone Reductases ». *European Journal of Biochemistry* 225(1):411-17. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00411.x.
- Van Heeke, G., L. Deforce, R. A. Schnizer, R. Shaw, J. M. Couton, G. Shaw, P. S. Song, et S. M. Schuster. 1993. « Recombinant Bovine Heart Mitochondrial F1-ATPase Inhibitor Protein: Overproduction in

- Escherichia Coli, Purification, and Structural Studies ». *Biochemistry* 32(38):10140-49. doi: 10.1021/bi00089a033.
- Van Remmen, Holly, Yuji Ikeno, Michelle Hamilton, Mohammad Pahlavani, Norman Wolf, Suzanne R. Thorpe, Nathan L. Alderson, John W. Baynes, Charles J. Epstein, Ting-Ting Huang, James Nelson, Randy Strong, et Arlan Richardson. 2003. « Life-Long Reduction in MnSOD Activity Results in Increased DNA Damage and Higher Incidence of Cancer but Does Not Accelerate Aging ». *Physiological Genomics* 16(1):29-37. doi: 10.1152/physiolgenomics.00122.2003.
- Velours, Jean, Alain Dautant, Bénédicte Salin, Isabelle Sagot, et Daniel Brèthes. 2009. « Mitochondrial F1F0-ATP Synthase and Organellar Internal Architecture ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(10):1783-89. doi: 10.1016/j.biocel.2009.01.011.
- Vielhaber, Stefan, Grazyna Debska-Vielhaber, Viktoriya Peeva, Susanne Schoeler, Alexei P. Kudin, Irina Minin, Stefanie Schreiber, Reinhard Dengler, Katja Kollewe, Werner Zuschratter, Cornelia Kornblum, Gábor Zsurka, et Wolfram S. Kunz. 2013. « Mitofusin 2 Mutations Affect Mitochondrial Function by Mitochondrial DNA Depletion ». *Acta Neuropathologica* 125(2):245-56. doi: 10.1007/s00401-012-1036-y.
- Wagner, Konstanze M., Marcel Rüegg, Axel Niemann, et Ueli Suter. 2009. « Targeting and Function of the Mitochondrial Fission Factor GDAP1 Are Dependent on Its Tail-Anchor ». *PloS One* 4(4):e5160. doi: 10.1371/journal.pone.0005160.
- Wai, Timothy, Jaime García-Prieto, Michael J. Baker, Carsten Merkwirth, Paule Benit, Pierre Rustin, Francisco Javier Rupérez, Coral Barbas, Borja Ibañez, et Thomas Langer. 2015. « Imbalanced OPA1 Processing and Mitochondrial Fragmentation Cause Heart Failure in Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 350(6265):aad0116. doi: 10.1126/science.aad0116.
- Wai, Timothy, et Thomas Langer. 2016. « Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 27(2):105-17. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001.
- Wakabayashi, Junko, Zhongyan Zhang, Nobunao Wakabayashi, Yasushi Tamura, Masahiro Fukaya, Thomas W. Kensler, Miho Iijima, et Hiromi Sesaki. 2009. « The Dynamin-Related GTPase Drp1 Is Required for Embryonic and Brain Development in Mice ». *The Journal of Cell Biology* 186(6):805-16. doi: 10.1083/jcb.200903065.
- Walker, John E. 2013. « The ATP Synthase: The Understood, the Uncertain and the Unknown ». *Biochemical Society Transactions* 41(1):1-16. doi: 10.1042/BST20110773.
- Walther, Dirk M., Drazen Papic, Martine P. Bos, Jan Tommassen, et Doron Rapaport. 2009. « Signals in Bacterial Beta-Barrel Proteins Are Functional in Eukaryotic Cells for Targeting to and Assembly in Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(8):2531-36. doi: 10.1073/pnas.0807830106.
- Wan, Yu-Ying, Jian-Feng Zhang, Zhang-Jian Yang, Li-Ping Jiang, Yong-Fang Wei, Qi-Nan Lai, Jian-Bin Wang, Hong-Bo Xin, et Xiao-Jian Han. 2014. « Involvement of Drp1 in Hypoxia-Induced Migration of Human Glioblastoma U251 Cells ». *Oncology Reports* 32(2):619-26. doi: 10.3892/or.2014.3235.
- Wang, Z. G., et S. H. Ackerman. 2000. « The Assembly Factor Atp11p Binds to the Beta-Subunit of the Mitochondrial F(1)-ATPase ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(8):5767-72. doi: 10.1074/jbc.275.8.5767.
- Wang, Z. G., D. Sheluho, D. L. Gatti, et S. H. Ackerman. 2000. « The Alpha-Subunit of the Mitochondrial F(1) ATPase Interacts Directly with the Assembly Factor Atp12p ». *The EMBO Journal* 19(7):1486-93. doi: 10.1093/emboj/19.7.1486.

- Wang, Z. G., P. S. White, et S. H. Ackerman. 2001. « Atp11p and Atp12p Are Assembly Factors for the F(1)-ATPase in Human Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(33):30773-78. doi: 10.1074/jbc.M104133200.
- Wang, Zhigao, Hui Jiang, She Chen, Fenghe Du, et Xiaodong Wang. 2012. « The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Functions at the Convergence Point of Multiple Necrotic Death Pathways ». *Cell* 148(1-2):228-43. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.030.
- Wasiak, Sylwia, Rodolfo Zunino, et Heidi M. McBride. 2007. « Bax/Bak Promote Sumoylation of DRP1 and Its Stable Association with Mitochondria during Apoptotic Cell Death ». *The Journal of Cell Biology* 177(3):439-50. doi: 10.1083/jcb.200610042.
- Waterham, Hans R., Janet Koster, Carlo W. T. van Roermund, Petra A. W. Mooyer, Ronald J. A. Wanders, et James V. Leonard. 2007. « A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission ». *The New England Journal of Medicine* 356(17):1736-41. doi: 10.1056/NEJMoa064436.
- Watt, Ian N., Martin G. Montgomery, Michael J. Runswick, Andrew G. W. Leslie, et John E. Walker. 2010. « Bioenergetic Cost of Making an Adenosine Triphosphate Molecule in Animal Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39):16823-27. doi: 10.1073/pnas.1011099107.
- Weissert, Verena, Bettina Rieger, Silke Morris, Tasnim Arroum, Olympia Ekaterini Psathaki, Thomas Zobel, Guy Perkins, et Karin B. Busch. 2021. « Inhibition of the Mitochondrial ATPase Function by IF1 Changes the Spatiotemporal Organization of ATP Synthase ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1862(1):148322. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148322.
- Westermann, Benedikt. 2012. « Bioenergetic Role of Mitochondrial Fusion and Fission ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1817(10):1833-38. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.033.
- Wikstrom, Jakob D., Kiana Mahdaviani, Marc Liesa, Samuel B. Sereda, Yaguang Si, Guy Las, Gilad Twig, Natasa Petrovic, Cristina Zingaretti, Adam Graham, Saverio Cinti, Barbara E. Corkey, Barbara Cannon, Jan Nedergaard, et Orian S. Shirihai. 2014. « Hormone-Induced Mitochondrial Fission Is Utilized by Brown Adipocytes as an Amplification Pathway for Energy Expenditure ». *The EMBO Journal* 33(5):418-36. doi: 10.1002/embj.201385014.
- Willers, Imke M., et José M. Cuezva. 2011. « Post-Transcriptional Regulation of the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase: A Key Regulator of the Metabolic Phenotype in Cancer ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807(6):543-51. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.016.
- Wolf, Dane M., Mayuko Segawa, Arun Kumar Kondadi, Ruchika Anand, Sean T. Bailey, Andreas S. Reichert, Alexander M. van der Blik, David B. Shackelford, Marc Liesa, et Orian S. Shirihai. 2019. « Individual Cristae within the Same Mitochondrion Display Different Membrane Potentials and Are Functionally Independent ». *The EMBO Journal* 38(22):e101056. doi: 10.15252/embj.2018101056.
- Wyant, Gregory A., Wenyu Yu, Ilias P. Doulamis, Rio S. Nomoto, Mossab Y. Saeed, Thomas Duignan, James D. McCully, et William G. Kaelin. 2022. « Mitochondrial Remodeling and Ischemic Protection by G Protein-Coupled Receptor 35 Agonists ». *Science (New York, N.Y.)* 377(6606):621-29. doi: 10.1126/science.abm1638.
- Xian, Hongxu, et Yih-Cherng Liou. 2021. « Functions of Outer Mitochondrial Membrane Proteins: Mediating the Crosstalk between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy ». *Cell Death and Differentiation* 28(3):827-42. doi: 10.1038/s41418-020-00657-z.
- Xie, Dong, Yun-Long Li, Gui-Fen Wang, Jian Jiang, et Li-Rong Sun. 2021. « Ultraviolet Light-Emitting Diode Irradiation Induces Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Membrane Potential

Reduction in HL-60 Cells ». *The Journal of International Medical Research* 49(5):3000605211016623. doi: 10.1177/03000605211016623.

Xu, Na, Mary K. Thorsness, et Peter E. Thorsness. 2005. « Mitochondrial DNA Impacts the Morphology of Mitochondrial Compartments ». *Gene* 354:37-42. doi: 10.1016/j.gene.2005.03.018.

Yang, Dongli, Susan G. Elner, Zong-Mei Bian, Gerd O. Till, Howard R. Petty, et Victor M. Elner. 2007. « Pro-Inflammatory Cytokines Increase Reactive Oxygen Species through Mitochondria and NADPH Oxidase in Cultured RPE Cells ». *Experimental Eye Research* 85(4):462-72. doi: 10.1016/j.exer.2007.06.013.

Yankovskaya, Victoria, Rob Horsefield, Susanna Törnroth, César Luna-Chavez, Hideto Miyoshi, Christophe Léger, Bernadette Byrne, Gary Cecchini, et So Iwata. 2003. « Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation ». *Science (New York, N.Y.)* 299(5607):700-704. doi: 10.1126/science.1079605.

Yasuda, R., H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita, et H. Itoh. 2001. « Resolution of Distinct Rotational Substeps by Submillisecond Kinetic Analysis of F1-ATPase ». *Nature* 410(6831):898-904. doi: 10.1038/35073513.

Yonashiro, Ryo, Satoshi Ishido, Shinkou Kyo, Toshifumi Fukuda, Eiji Goto, Yohei Matsuki, Mari Ohmura-Hoshino, Kiyonao Sada, Hak Hotta, Hirohei Yamamura, Ryoko Inatome, et Shigeru Yanagi. 2006. « A Novel Mitochondrial Ubiquitin Ligase Plays a Critical Role in Mitochondrial Dynamics ». *The EMBO Journal* 25(15):3618-26. doi: 10.1038/sj.emboj.7601249.

Yonashiro, Ryo, Yuya Kimijima, Takuya Shimura, Kohei Kawaguchi, Toshifumi Fukuda, Ryoko Inatome, et Shigeru Yanagi. 2012. « Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL Blocks S-Nitrosylated MAP1B-Light Chain 1-Mediated Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Cell Death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(7):2382-87. doi: 10.1073/pnas.1114985109.

Yonashiro, Ryo, Ayumu Sugiura, Misako Miyachi, Toshifumi Fukuda, Nobuko Matsushita, Ryoko Inatome, Yoshinobu Ogata, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, et Shigeru Yanagi. 2009. « Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL Ubiquitinates Mutant SOD1 and Attenuates Mutant SOD1-Induced Reactive Oxygen Species Generation ». *Molecular Biology of the Cell* 20(21):4524-30. doi: 10.1091/mbc.e09-02-0112.

Yoo, Seung-Min, et Yong-Keun Jung. 2018. « A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics ». *Molecules and Cells* 41(1):18-26. doi: 10.14348/molcells.2018.2277.

Yotsuyanagi, Y. 1962. « Études sur le chondriome de la levure: I. Variation de l'ultrastructure du chondriome au cours du cycle de la croissance aérobie ». *Journal of Ultrastructure Research* 7(1):121-40. doi: 10.1016/S0022-5320(62)80031-8.

Youle, Richard J., et Alexander M. van der Bliek. 2012. « Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress ». *Science (New York, N.Y.)* 337(6098):1062-65. doi: 10.1126/science.1219855.

Yun, Jina, Rajat Puri, Huan Yang, Michael A. Lizzio, Chunlai Wu, Zu-Hang Sheng, et Ming Guo. 2014. « MUL1 Acts in Parallel to the PINK1/Parkin Pathway in Regulating Mitofusin and Compensates for Loss of PINK1/Parkin ». *ELife* 3:e01958. doi: 10.7554/eLife.01958.

Zegallai, Hana M., et Grant M. Hatch. 2021. « Barth Syndrome: Cardiolipin, Cellular Pathophysiology, Management, and Novel Therapeutic Targets ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 476(3):1605-29. doi: 10.1007/s11010-020-04021-0.

- Zhang, Kuan, Huihui Li, et Zhiyin Song. 2014. « Membrane Depolarization Activates the Mitochondrial Protease OMA1 by Stimulating Self-Cleavage ». *EMBO Reports* 15(5):576-85. doi: 10.1002/embr.201338240.
- Zhang, Mei, Eugenia Mileykovskaya, et William Dowhan. 2002. « Gluing the Respiratory Chain Together. Cardiolipin Is Required for Supercomplex Formation in the Inner Mitochondrial Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 277(46):43553-56. doi: 10.1074/jbc.C200551200.
- Zhao, J., J. Zhang, M. Yu, Y. Xie, Y. Huang, D. W. Wolff, P. W. Abel, et Y. Tu. 2013. « Mitochondrial Dynamics Regulates Migration and Invasion of Breast Cancer Cells ». *Oncogene* 32(40):4814-24. doi: 10.1038/onc.2012.494.
- Zhao, Jian, Tong Liu, Shaobo Jin, Xinming Wang, Mingqi Qu, Per Uhlén, Nikolay Tomilin, Oleg Shupliakov, Urban Lendahl, et Monica Nistér. 2011. « Human MIEF1 Recruits Drp1 to Mitochondrial Outer Membranes and Promotes Mitochondrial Fusion Rather than Fission ». *The EMBO Journal* 30(14):2762-78. doi: 10.1038/emboj.2011.198.
- Zhou, Wei, Kuang-Hueih Chen, Wenjing Cao, Jingwei Zeng, Hua Liao, Li Zhao, et Xiaomei Guo. 2010. « Mutation of the Protein Kinase A Phosphorylation Site Influences the Anti-Proliferative Activity of Mitofusin 2 ». *Atherosclerosis* 211(1):216-23. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.012.
- Ziviani, Elena, Ran N. Tao, et Alexander J. Whitworth. 2010. « Drosophila Parkin Requires PINK1 for Mitochondrial Translocation and Ubiquitinates Mitofusin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(11):5018-23. doi: 10.1073/pnas.0913485107.
- Zorova, Ljubava D., Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, Savva D. Zorov, Anastasia V. Balakireva, Magdalena Juhaszova, Steven J. Sollott, et Dmitry B. Zorov. 2018. « Mitochondrial Membrane Potential ». *Analytical Biochemistry* 552:50-59. doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.
- Züchner, Stephan, Irina V. Mersyanova, Maria Muglia, Nisrine Bissar-Tadmouri, Julie Rochelle, Elena L. Dadali, Mario Zappia, Eva Nelis, Alessandra Patitucci, Jan Senderek, Yesim Parman, Oleg Evgrafov, Peter De Jonghe, Yuji Takahashi, Shoji Tsuji, Margaret A. Pericak-Vance, Aldo Quattrone, Esra Battaloglu, Alexander V. Polyakov, Vincent Timmerman, J. Michael Schröder, Jeffery M. Vance, et Esra Battaloglu. 2004. « Mutations in the Mitochondrial GTPase Mitofusin 2 Cause Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A ». *Nature Genetics* 36(5):449-51. doi: 10.1038/ng1341.
- Zunino, Rodolfo, Emélie Braschi, Liqun Xu, et Heidi M. McBride. 2009. « Translocation of SenP5 from the Nucleoli to the Mitochondria Modulates DRP1-Dependent Fission during Mitosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 284(26):17783-95. doi: 10.1074/jbc.M901902200.
- Zunino, Rodolfo, Astrid Schauss, Peter Rippstein, Miguel Andrade-Navarro, et Heidi M. McBride. 2007. « The SUMO Protease SENP5 Is Required to Maintain Mitochondrial Morphology and Function ». *Journal of Cell Science* 120(Pt 7):1178-88. doi: 10.1242/jcs.03418.

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la structure des mitochondries ..Erreur ! Signet non défini.	
Figure 2 : Les différentes réactions enzymatiques de la glycolyse et la lactate déshydrogénase (inspiré de (Judge et Dodd 2020)).	4
Figure 3 : La navette Malate/aspartate (McKenna et al. 2006)	6
Figure 4 : La navette Glycérol 3-Phosphate (McKenna et al. 2006)	8
Figure 5 : Régulation de la pyruvate déshydrogénase (Stanley et al. 1997)	8
Figure 6 : Les différentes réactions du cycle de Krebs (Martínez-Reyes et Chandel 2020).	10
Figure 7 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative.	12
Figure 8 : Organisation des sous unités de la F1F0-ATP synthase mitochondriale (Devenish, Prescott, et Rodgers 2008)	14
Figure 9 : Représentation schématique de l'assemblage de l'ATP synthase mitochondriale (Rühle et Leister 2015)	14
Figure 10 : Représentation schématique des activité catalytiques de l'ATP synthase (Y. Q. Gao, Yang, et Karplus 2005).	18
Figure 11 : Rotation de l'ATP synthase d'après (H. Guo et Rubinstein 2022, 22).	18
Figure 12 : Interaction de IF1 avec la F1Fo-ATPsynthase (Danilo Faccenda et Campanella 2012).	20
Figure 13 : L'ATP synthase et les transporteurs ADP/ATP et de phosphate mitochondriaux (Kunji et al. 2016).	22
Figure 14 : Cycle Q dans le complexe III (Mazat, Devin, et Ransac 2020).	28
Figure 15 : Organisation structurale des complexes de la chaîne de transport des électrons (ETC) (Javadov et al. 2021)	30
Figure 16 : Site de formation des espèces réactives de l'oxygène de la chaîne respiratoire mitochondriale (Mazat, Devin, et Ransac 2020).	31
Figure 17 : Détoxification des ROS dans des cellules de mammifères.	36
Figure 18 : Morphologie du réseau mitochondrial.	40
Figure 19 : Acteurs de la fission mitochondriale (inspiré de (Giacomello et al. 2020)).	40
Figure 20 : Structure et organisation de DRP1 (Kraus et al. 2021).	42
Figure 21 : Représentation schématique des éléments structurels des protéines de fission et de leurs modifications post-traductionnelles associées (modifié d'après (Tilokani 2018)).	44
Figure 22 : Représentation schématique des processus de la fission mitochondriale (Tilokani 2018).	46
Figure 23 : Structure et région codante des isoformes humaine de DRP1 (Modifié d'après (Rosdah et al. 2020)).	50
Figure 24 : L'activité de DRP1 est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles (Otéra 2020).	54
Figure 25 : Représentation schématique des éléments structurels des protéines de fusion et de leurs modifications post-traductionnelles associées (Tilokani 2018).	56

Figure 26 : Représentation schématique de la fusion des membranes mitochondriales externes (inspiré de (Tilokani et al. 2018; Giacomello et al. 2020; Gao et Hu 2021)).	58
Figure 27 : Structure de la protéine OPA1, localisation des sites protéolytiques et structure des isoformes obtenues (Del Dotto et al. 2018)	62
Figure 28 : Représentation schématique du remodelage des crêtes par OPA1 et MICOS lors du relargage du cytochrome c (cyt c) suite à l'induction apoptotique (inspiré de (Glytsou et al. 2016; van der Laan, Horvath, et Pfanner 2016)).	64
Figure 29 : Représentation schématique de la fusion des membranes mitochondriales internes (inspiré de (Tilokani et al. 2018; Giacomello et al. 2020; Gao et Hu 2021)).	64
Figure 30 : Régulation protéolytique de OPA1.	68
Figure 31 : La mitophagie (inspiré de (Onishi et al. 2021)).	72
Figure 32 : Variants identifiés sur chaque domaine de DRP1 (Keller et al. 2021).	76
Figure 33 : Production de ROS suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase.	176
Figure 34 : Assemblage des Supercomplexes suite à l'inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase	178
Figure 35 : La phosphorylation de DRP1 n'a pas lieu lors d'une inhibition de la chaîne respiratoire et/ou de l'ATP synthase.	180
Figure 36 : Structure du réseau mitochondrial après 4H d'inhibition de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase (O/A)	182

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Auto-assemblage et activité GTPase des différentes isoformes humaines de DRP1.	50
<u>Tableau 2</u> : Modifications post-traductionnelles clés des protéines de la fission mitochondriale	52
<u>Tableau 3</u> : Modifications post-traductionnelles des protéines de la fusion des membranes mitochondriales externes	60
<u>Tableau 4</u> : Composition du complexe MICOS chez l'Homme (Kozjak-Pavlovic 2017).....	66
<u>Tableau 5</u> : Modifications post-traductionnelles des protéines de la fusion des membranes mitochondriales internes	68
<u>Tableau 6</u> : Relation entre défaut de protéines de fusion/fission, morphologie du réseau mitochondrial et métabolisme.	74
<u>Tableau 7</u> : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec du déoxyglucose (Sauvanet et al. 2010).	Erreur ! Signet non défini.
<u>Tableau 8</u> : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec divers inhibiteurs (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)).	86
<u>Tableau 9</u> : Morphologie des mitochondries dans les lignées cellulaires traitées avec divers inhibiteurs (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)).	88
<u>Tableau 10</u> : Morphologie du réseau mitochondrial dans des cellules présentant des défauts génétiques associés à des déficits mitochondriaux (Inspiré de (Sauvanet et al. 2010)).	90
<u>Tableau 11</u> : Anticorps primaires nécessaires aux Western-Blot et BN-PAGE.....	217
<u>Tableau 12</u> : Anticorps secondaires nécessaires aux Western-Blot et BN-PAGE.....	218

Autres activités

Publications

Lhuissier, C.; Wagner, B. E.; Vincent, A.; Garraux, G.; Hougrand, O.; Van Coster, R.; Benoit, V.; Karadurmus, D.; Lenaers, G.; Gueguen, N.; Chevrollier, A.; Maystadt, I. Case Report: Thirty-Year Progression of an EMPF1 Encephalopathy Due to Defective Mitochondrial and Peroxisomal Fission Caused by a Novel de Novo Heterozygous DNM1L Variant. *Front. Neurol.* 2022, 13.

Communication

Titre	Désignation et lieu du congrès	Type de communication	Date
OPA1 contrôle la quantité de ROS mitochondriale et la fission des mitochondries	Journée SFR ICAT Angers - Visioconférence	Flash communication	06.2021
Biochemical study of mitochondrial dynamics through the characterization of mitochondrial fission induction pathways.	Journée des doctorants - Brest	Communication affichée	12.2021
Une phase d'adaptation métabolique ATP synthase dépendant prévient de la fission mitochondriale	Colloque Meetochondrie - Lège-Cap-Ferret	Communication affichée	05.2022
An ATP synthase-dependent metabolic adaptation phase prevents mitochondrial fission	Congrès MitoNICE - Nice	Communication affichée	07.2022
Images de science : la dynamique des mitochondries éclairée par la microscopie à fluorescence	https://theconversation.com/images-de-science-la-dynamique-des-mitochondries-eclairée-par-la-microscopie-a-fluorescence-166361	Article	02.2022

Enseignement

2020-2021 Monitorat : 32h : Vieille technologique LPBAE (IUT)

Vulgarisation scientifique

2018-2019 Participation à la fête de la science au théâtre à Angers
2019-2020 Participation à la fête de la science à Belle-Beille à Angers
2020-2021 Participation à la fête de la science à Belle-Beille à Angers
 Participation à la nuit des chercheurs au Campus Saint-Serge à Angers
2021-2022 Participation à la fête de la science à l'ESEO à Angers

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **LHUISSIER Charlène**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **18 / 10 / 2022**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Pathologies de la dynamique mitochondriale : étude de la relation structure-fonction au cours de la fission mitochondriale.

Mots clés : Structure-fonction, dynamique mitochondrial, phosphorylation oxydative, ATP synthase, potentiel de membrane mitochondrial, radicaux libres

Résumé : Les mitochondries jouent un rôle fondamental dans la production d'énergie cellulaire, l'ATP, via la phosphorylation oxydative. Leur structuration tubulaire, leur connectivité et leur propriété dynamique incluant le remodelage des membranes internes sont indispensables au fonctionnement mitochondrial. Les événements de fusion, de fission nécessitent une régulation sous le contrôle de dynamine-GTPases : DRP1, MFN1/2 et OPA1. La bioénergétique et la dynamique mitochondriale sont fortement dépendantes, mais leurs relations restent à mieux comprendre. La fission des mitochondries est également une étape indispensable à l'élimination des mitochondries défectueuses par la mitophagie, cependant malgré des déficits énergétiques importants, il n'est pas retrouvé de fragmentation mitochondriale dans les cellules de patients atteints. L'objectif est de mieux comprendre les

seuils bioénergétiques responsables de l'induction de la fission mitochondriale. Pour cela, à partir de cellules fibroblastiques contrôles et cellules de patients atteints de déficits mitochondriaux, nous avons étudié la réponse aux inhibitions de synthèse d'ATP en suivant le potentiel de membrane mitochondrial, la production de radicaux libres et la dynamique mitochondriale. Nos résultats mettent en évidence le rôle majeur du complexe enzymatique F₀F₁-ATP synthase dans la résistance à la fission, de par l'adaptabilité de son fonctionnement et de sa structuration en dimères. Le dépassement de cette étape favoriserait l'induction de la mitophagie. Ce travail contribue à mieux comprendre la relation entre la structure et la fonction des mitochondries et permet de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques aux pathologies mitochondriales héréditaires ou communes.

Title: Mitochondrial Dynamics Diseases: study of the structure-function relationship during mitochondrial fission

Keywords: Structure-function, mitochondrial dynamics, oxidative phosphorylation, ATP synthase, mitochondrial membrane potential, free radicals

Abstract: Mitochondria play a fundamental role in the production of cellular energy, ATP, via oxidative phosphorylation. Their tubular structure, connectivity and dynamic properties including remodeling of the inner membranes are essential for mitochondrial function. Fusion and fission events require regulation under the control of dynamin-GTPases: DRP1, MFN1/2 and OPA1. Mitochondrial bioenergetics and dynamics are strongly dependent, but their relationships remain to be better understood. Mitochondrial fission is also an essential step in the elimination of defective mitochondria by mitophagy, but despite significant energy deficits, mitochondrial fragmentation has not been found in cells of affected patients. The objective is to better understand the bioenergetic thresholds responsible for the

induction of mitochondrial fission. To this end, using control fibroblast cells and cells from patients with mitochondrial deficiencies, we studied the response to inhibitions of ATP synthesis by monitoring mitochondrial membrane potential, free radical production, and mitochondrial dynamics. Our results highlight the major role of the F₀F₁-ATP synthase enzyme complex in fission resistance, due to the adaptability of its function and its structuring into dimers. The overcoming of this step would favor the induction of mitophagy. This work contributes to a better understanding of the relationship between the structure and function of mitochondria and allows us to propose new therapeutic avenues for hereditary or common mitochondrial pathologies.