HAL
open science

Rôle d'OPA1 dans le fonctionnement et l'architecture des cellules musculaires striées et dans la réponse à un stress

Fanny Caffin

To cite this version:

Fanny Caffin. Rôle d'OPA1 dans le fonctionnement et l'architecture des cellules musculaires striées et dans la réponse à un stress. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114863 . tel-00778884

HAL Id: tel-00778884

https://theses.hal.science/tel-00778884

Submitted on 21 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE :

PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

ANNÉE 2012 - 2013 SÉRIE DOCTORAT N° 1212

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 19/12/2012

par

Fanny CAFFIN

Rôle d'OPA1 dans le fonctionnement et l'architecture des cellules musculaires striées et dans la réponse à un stress

Directeur de thèse : Fréderic JOUBERT CR1 (UMR-S 769 INSERM))

Composition du jury :

Président du jury :	Bernard LACOUR	PU-PH	(UMR-1154)
Rapporteurs :	Xavier BIGARD	Professeur agrégé	(IRBA)
	Pascal REYNIER	PU-PH2	(U694 INSERM)
Examinateurs :	Anne DEVIN	CR1	(IBGC du CNRS)
	Anne LOMBES	DR2	(INSERM UMR-S1016/CNRS UMR 8104)

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »
Aristote (384 - 322 av JC)

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

REMERCIEMENTS 5

RESUME 7

ABSTRACT 9

LISTE DES ABBREVIATIONS 11

TABLE DES ILLUSTRATIONS 15

AVANT-PROPOS 17

INTRODUCTION 19

CHAPITRE I : FONCTIONS ET STRUCTURE DES MUSCLES STRIES 19
1. Introduction *19*
2. Le muscle cardiaque *19*
2.1-Description anatomique et fonctionnelle *19*
2.2-Description structurelle *21*
3. Le muscle squelettique *22*
4. Organisation et structure des cellules des muscles striés *23*
4.1-Description macroscopique *23*
4.2-Organisation interne des cellules des muscles striés *25*
4.3-Les noyaux *29*
4.4-Le réticulum sarcoplasmique *29*
4.5-Les mitochondries *30*
5. Fonction contractile des cellules des muscles striés *31*
5.1-Mécanismes de contraction *31*
5.2-Le couplage excitation-contraction *32*

CHAPITRE II : METABOLISME ENERGETIQUE DES MUSCLES STRIES 33
1. Introduction *33*
2. Propriétés métaboliques des muscles striés *33*
2.1-Les réserves énergétiques *33*
2.2-Les filières énergétiques *34*
3. -Les voies de synthèse de l'ATP *35*
3.1-La voie anaérobie *36*
3.2-La voie aérobie *38*
4. Transferts énergétiques dans les cellules musculaires striées *46*
4.1-Le système créatine kinase (CK) *47*
4.2-Les adénylates kinases (AK) *49*
4.3-Les autres systèmes et la canalisation directe entre organites *49*

CHAPITRE III : PLASTICITE MITOCHONDRIALE 51
1. Généralités sur la mitochondrie *51*

1.1-Structure *51*
1.2-Fonctions *52*
2. Biogénèse mitochondriale *54*
2.1-Introduction *54*
2.2-Voies de signalisation induisant la biogénèse mitochondriale *55*
2.3-Modulation des voies de signalisation *59*
2.4-Biogénèse mitochondriale et muscles striés *60*
3. Dynamique mitochondriale *62*
3.1-Introduction *62*
3.2-Protéines impliquées dans la fusion-fission mitochondriale *63*
3.3-Rôles de la dynamique mitochondriale *70*
3.4-Autres fonctions des protéines de la dynamique mitochondriale *70*
3.5-Impact des mutations-délétions des protéines de la dynamique mitochondriale *74*
3.6-Dynamique mitochondriale et muscles striés *75*

CHAPITRE IV : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR OPA1 77
1. Isoformes et régulation de l'expression de la protéine OPA1 ..... *77*
1.1-Structure du gène Opa1 ..... *77*
1.2-Génération et régulation des isoformes *78*
2. Fonctions de la protéine OPA1 ..... *80*
2.1-Fusion mitochondriale *80*
2.2-Organisation des crêtes mitochondriales et apoptose *81*
2.3-Maintenance et stabilité de l'ADN$_{mt}$ *82*
2.4-Métabolisme énergétique *83*
3. Dysfonction d'OPA1 et développement de pathologie *84*
4. Etudes cliniques en cours *85*

CHAPITRE V : ADAPTATION MUSCULAIRE SUITE A UN STRESS CHRONIQUE 87
1. Adaptation des muscles striés lors d'un stress physiologique *87*
1.1-Adaptation du muscle cardiaque suite à un entraînement d'endurance .. *87*
1.2-Adaptation des muscles squelettiques suite à un entraînement d'endurance *89*
1.3- Activation de la biogénèse mitochondriale *89*
2. Adaptation cardiaque lors d'un stress pathologique *92*
2.1-Métabolisme énergétique *92*
2.2-Altérations de la biogénèse mitochondriale *94*

OBJECTIFS DE L'ETUDE **97**

MATERIELS & METHODES **99**

CHAPITRE I : MODELE ANIMAL 99
1. Description du modèle *99*
1.1-Phénotype *99*
1.2-Hébergement *100*
1.3-Sacrifice *100*
2. Comportement *101*
2.1-Test de l'open field ou test de champ ouvert *101*

2.2-Test elevated plus maze (EPM) ou le labyrinthe en croix surélevée 103
2.3-Test de suspension caudale 104
2.4-Test rotarod ou test du cylindre rotatif 105

CHAPITRE II : ETUDE DES PARAMETRES ANATOMIQUES ET FONCTIONNELS 106
1. Induction d'un stress physique volontaire, forcé ou pathologique 106
1.1-Stress physiologique : Activité physique volontaire dans une roue 106
1.2-Stress physiologique : Activité physique forcée sur un tapis roulant 107
1.3-Stress pathologique : Surcharge hémodynamique 109
2. Mesure non invasive de la fonction cardiaque par échocardiographie 109
3. Mesure non invasive de la pression artérielle 111
4. Mesure non invasive des lipides et glucides sanguins 112

CHAPITRE III : ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES 113
1. Analyse de l'architecture cellulaire et du réseau mitochondrial 113
1.1-Observation qualitative de l'architecture du réseau par microscopie électronique à transmission (MET) 113
1.2-Observation quantitative du réseau par microscopie confocale 115
2. Mesure de la fonction mitochondriale in situ sur fibres perméabilisées 118
2.1-Préparation des fibres cardiaques et musculaires perméabilisées 118
2.2-Mesure de la respiration 119
2.3-Analyse des résultats 123
3. Mesure de la sensibilité du pore de transition de perméabilité (PTP) 124
3.1-Préparation des cellules et acquisition des données 124
3.2-Analyse des données 126

CHAPITRE IV : ETUDE DU METABOLISME ET DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE 127
1. Mesure de l'activité enzymatique des protéines et de leurs isoformes 127
1.1-Extraction des enzymes 127
1.2-Extraction et dosages des protéines 128
1.3-Dosage enzymatique des activités totales 128
1.4-Quantification des isoformes de la CK 131
2. Mesure du niveau d'expression protéique par western-blot (WB) 132
2.1-Préparation des échantillons 132
2.2-Migration des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 133
2.3-Electro-transfert des protéines sur membrane 134
2.4-Immunodétection des protéines d'intérêt 134
2.5-Analyse des acquisitions 136
3. Mesure du niveau d'expression en ARN_m par RT-PCR 136
3.1-Extraction, dosage et qualité des ARN totaux 136
3.2-RT-PCR quantitative 137

CHAPITRE V- : STATISTIQUES 142

RESULTATS **143**

CHAPITRE I : IMPLICATION DE LA PROTEINE OPA1 DANS L'ORGANISATION DU RESEAU MITOCHONDRIAL ET DANS LE FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE CARDIAQUE 143
1. Présentation 143
2. Résultats et discussions 144

CHAPITRE II : ROLE D'OPA1 DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET DANS LES CAPACITES D'ADAPTATION A UN ENTRAINEMENT PHYSIQUE 149
1. Présentation 149
2. Résultats et discussions 150

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES **155**

CHAPITRE I : CHOIX DU MODELE ANIMAL ET DES STRESS UTILISES 155
1. Modèle d'étude : les souris Opa1$^{+/-}$ 155
2. Choix des stress chroniques 157
2.1-Stress physiologique chronique 157
2.2-Stress pathologique chronique 157

CHAPITRE II : OPA1 ET MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES STRIEES 159

CHAPITRE III : OPA1, FONCTIONS MITOCHONDRIALES ET TRANSFERTS ENERGETIQUES 162
1. Capacités oxydatives 162
2. Métabolisme énergétique 163
2.1-Métabolisme de l'organisme 163
2.2-Métabolisme mitochondrial 164
3. Mort cellulaire et déficit d'OPA1 165
3.1-Fonctions du pore de transition de perméabilité (PTP) 165
3.2-Implication des EROS 167
3.3-Dynamique mitochondriale et apoptose 168
4. Transferts énergétiques 170

CHAPITRE IV : OPA1 ET REPONSE A UN STRESS CHRONIQUE 172
1. Adaptation lors d'un entraînement en endurance 172
1.1-OPA1 et capacité à l'entraînement 172
1.2-OPA1 et induction de la biogénèse mitochondriale 174
1.3-OPA1, performance physique et remodelage métabolique 176
2. Adaptation lors d'un stress pathologique 178
2.1-OPA1 et capacité d'adaptation 178
2.2-OPA1 et biogénèse mitochondriale 179
2.3-OPA1 et capacité d'adaptation à un stress aigu 180

BIBLIOGRAPHIE **183**

ANNEXES **215**

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont adressés à Mr Xavier BIGARD et Mr Pascal REYNIER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps de l'examiner et de la juger. Je remercie aussi les autres membres du jury : Mme Anne DEVIN, Mme Anne LOMBES et Mr Bernard LACOUR pour avoir également participé à l'évaluation de mes travaux de doctorat.

Je tiens à remercier Rodolphe FISCHMEISTER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il est appréciable que le directeur d'un si grand laboratoire mette un point d'honneur à s'intéresser à l'ensemble des membres le constituant et cela sans regard sur le poste qu'ils occupent.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Frédéric JOUBERT et Renée VENTURA-CLAPIER pour leur patience et la qualité de leur encadrement. Je leur suis reconnaissante de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Leur convivialité et leur générosité ont rendu cette formation exceptionnelle, un atout majeur pour que je puisse bénéficier d'un avenir professionnel favorable.

Bien évidement, il m'aurait été impossible de réaliser autant de travaux dans les mêmes délais, sans le soutien d'une équipe entière. Un grand merci donc, à Dominique FORTIN, qui est l'une des figures emblématiques de cette équipe n°1, la formatrice des nombreuses techniques biologiques. Elle est sur tous les fronts, impliquée dans de nombreux projets, permettant leur évolution rapide grâce à sa participation active. Mes remerciements vont également à Philippe MATEO pour son investissement dans mes travaux de thèse et sa bonne humeur communicative.

Sans oublier Anne GARNIER et Vladimir VEKSLER, que je remercie pour leur disponibilité, l'enseignement de leurs techniques spécifiques, ainsi que leur participation efficace aux nombreuses discussions qui ont jalonné l'avancement de ce projet. Merci également à Alexandre PROLA et Jérôme PIQUEREAU pour avoir chacun partagé un bout de cette aventure.

J'adresse égalment un vif remerciement à nos nombreux collaborateurs Marcel ALAVI, Marta NOVOTOVA et Denis J DAVID, pour avoir chacun pris le temps de m'initier à leur connaissance à un moment donné de mon parcours.

J'adresse à Valérie NICOLAS un grand merci, pour ses qualités humaines. Elle a été d'un soutien sans faille pendant mes longues heures nocturnes, avec pour seule compagnie le microscope et mes cellules (oui, tes chocolats et ta radio m'ont beaucoup aidée…). J'exprime également ma reconnaissance à l'ensemble des membres du personnel de la plateforme de l'animalerie pour le travail effectué, ainsi que pour leur convivialité et leur sollicitude pendant mes journées de test d'endurance (tant pour les animaux que pour le moral).

Je remercie Giada, Marianne, Maryline pour leur soutien au cours de cette thèse. Sans leur apport journalier de bonne humeur et fous rires, le bureau des étudiants du 2nd étage m'aurait paru bien plus morose.

Il m'est impossible de ne pas mentionner Patrick, Florence et Sophie, qui ont participé à faciliter grandement ma vie dans le laboratoire, mais aussi Françoise. Elle a été toujours très réactive et prête à m'aider à comprendre l'administration française, mais surtout pour m'avoir invitée à entrer un peu plus dans sa vie privée.

Je n'omettrai pas de remercier les autres doctorants Hind, Fabien, Zeineb, Pierre, Milia du 5ème étage (nul doute que la réalisation du projet de noël restera dans les annales), ainsi que les autres membres du laboratoire que je n'ai pas mentionné, mais qui ont contribué à rendre l'ambiance du laboratoire aussi agréable à vivre.

J'adresse également mes remerciements à Nathalie TAVERNIERS, pour m'avoir accordé de son précieux temps pour corriger ce mémoire.

Je dédierai un remerciement plus particulier à Claire et Matthieu R, qui avec le temps sont devenus plus que de simples collègues, mais de véritables amis. Ils sont désormais partis vivre dans des terres plus ou moins éloignées, mais leur amitié a fortement marqué les moments passés au laboratoire. Merci également à Matthieu B et Rénata pour leur amitié et leur soutien lors de nos soirées, ils ont été d'un très grand secours pendant la période de rédaction.

Et pour finir, je dédierai ces derniers remerciements aux personnes qui me sont les plus précieuses : à ma mère, pour son éternel soutien, à ma grand-mère, pour sa confiance absolue dans mes capacités, et bien sûr à mon compagnon pour son soutien quotidien (bien que je ne lui ai pas facilité la vie ces 4 derniers mois).

RESUME

L'ADOA-1 (*Autosomal dominant optic atrophy*) est une maladie neurologique pouvant être causée par la mutation de la protéine mitochondriale OPA1 (*Optic atrophy type 1*) et pouvant conduire à une cécité. Certains patients peuvent présenter un dysfonctionnement mitochondrial plus généralisé, et développer d'autres complications neuromusculaires (ADOA-1^{+}). La protéine OPA1 est une dynamine GTPasique impliquée dans la dynamique mitochondriale en modulant la fusion des membranes internes, et plus largement dans le maintien des fonctions mitochondriales. Le rôle de cette protéine a été étudié dans beaucoup de types cellulaires, mais peu d'études se sont intéressées à la cellule cardiaque qui pourtant possède de nombreuses mitochondries.

La 1ère question soulevée par cette thèse était de déterminer l'implication de la protéine OPA1 dans l'organisation du réseau mitochondrial et dans le fonctionnement de la cellule cardiaque en condition physiologique ou pathologique. Pour répondre à cela, nous avons utilisé un modèle murin hétérozygote pour *Opa1* (*Opa1*$^{+/-}$). Nous avons montré que dans le cardiomyocyte adulte, la diminution d'expression d'OPA1 induisait un déséquilibre de la balance fusion/fission, qui se traduisait par une désorganisation du réseau mitochondrial, ainsi qu'une altération de la morphologie des mitochondries. Cependant, ces modifications n'engendraient pas d'altération des capacités oxydatives des mitochondries, mais conduisaient à une perturbation des propriétés d'ouverture du PTP. En outre, la déficience en OPA1 n'influençait pas la fonction cardiaque en condition physiologique, mais était associée à son altération plus sévère en condition pathologique.

La 2nde question de cette thèse était de savoir l'implication d'OPA1 dans la réponse à un stress physiologique des cellules musculaires squelettiques, et ainsi étudier le lien éventuel entre OPA1 et la mise en place de la biogénèse mitochondriale. Nous avons donc soumis nos souris *Opa1*$^{+/-}$ à un exercice d'endurance. Nos résultats ont révélé que nos deux groupes d'animaux disposaient des mêmes capacités physiques à l'entraînement. L'adaptation des souris *Opa1*$^{+/-}$ à

l’entrainement s’effectuait par un remodelage métabolique, vraisemblablement pour contrer un défaut d’adaptation de la biogénèse mitochondriale.

En conclusion, nos résultats ont permis de mieux définir le rôle de la protéine OPA1 dans les muscles striés et son implication dans l’adaptation à un stress. Ce travail nous ouvre des perspectives sur le rôle de la dynamique mitochondriale dans l’adaptation à un stress.

ABSTRACT

ADOA-1 (Autosomal dominant optic atrophy) is a neurological disease that can be caused by mutations in mitochondrial protein OPA1 (Optic atrophy type 1) and can lead to blindness. Some patients with OPA1 mutations may have a generalized mitochondrial dysfunction, and may develop additional neuromuscular complications (ADOA-1^{+}). OPA1 protein is a GTPase dynamin involved in mitochondrial dynamics by controlling the fusion of inner membranes, and also in the maintenance of mitochondrial functions. The role of this protein has been studied in many cell types, but only few studies have been done on cardiac cell, which nevertheless has many mitochondria.

The first question raised by this thesis was to determine the involvement of OPA1 protein in mitochondrial network organization and the functioning of the cardiac cell in physiological or pathological condition. To answer this, we used a mouse model heterozygous for *Opa1* (*Opa1*$^{+/-}$). We have shown that in adult cardiomyocytes, a decrease expression of OPA1 induces an imbalance fusion/fission, which results in a disruption of mitochondrial network, as well as alteration of the morphology of mitochondria. However, these changes did not alter oxidative capacities, but leads to a disturbance of PTP opening. Additionally, OPA1 deficiency did not affect cardiac function under physiological conditions, but it is associated with a stronger impairment of cardiac function in pathological condition.

The 2nd part of this thesis was to determine the involvement of OPA1 in response to physiological stress in cells of skeletal muscle, and thus to study the possible link between OPA1 and mitochondrial biogenesis activation. For this, we submitted our *Opa1*$^{+/-}$ mice to an exercise training. Our results showed that both groups of animals were able to perform the same physical activity. The adaptation of *Opa1*$^{+/-}$ mice to training did not involve mitochondrial biogenesis and led to a specific response involving a metabolic remodelling towards higher fatty acids utilization.

In conclusion, our results allowed us a better understanding of OPA1 role in striated muscle and its involvement for adaptation to a stress. This work opens new perspectives on the role of mitochondrial dynamics in cardiac and muscle cells and during adaptation to a stress.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN_{mt}	ADN mitochondrial
ADOA	*Autosomal dominant optic atrophy*
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AIF	*Apoptosis inducing factor*
AK	Adénylate kinase
AMP	Adénosine mono-phosphate
AMPc	AMP cyclique
AMPK	kinase activé par l'AMP
AMPKK	AMPK kinase
ANF	*Atrial natriuretic factor*
ANT	Adénine nucleotide transférase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BNP	*Brain natriuretic peptide*
BSA	*Bovine serum albumine*
Ca^{2+}	Calcium
CaMK	Calcium-calmoduline kinase
CaMKK	CAMK kinase
CBP	*CREB binding protein*
CEC	Couplage excitation-contraction
CK	Créatine kinase
Cn	Calcineurine
CoA	Coenzyme A
COX	Cytochrome c oxydase

CPT	Carnitine palmitoyl transferase
Cr	Créatine
CRE	*Cyclic AMP response element*
CREB	*cAMP response element binding protein*
CS	Citrate synthase
dNTP	Déoxyribonucléotide
DO	Densité optique
DRP1	*Dynamin-related protein 1*
DTT	*Dithiothreitol*
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EROS	Espèces réactives de l'oxygène
ERR	*Estrogen related receptor*
ERRE	*ERR response element*
$FAD^+/FADH_2$	Flavine adénine dinucléotide
FAT/CD36	*Fatty acid translocase*
FIS1	*Fission protein 1*
GLUT	*Glucose transporter*
GED	GTPase effector domain
GTP	Guanosine triphosphate
HEPES	4-(2-Hydeoxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonate
HK	Hexokinase
HRP	*Horseradish peroxidase*
IC	Insuffisance cardiaque
LCAD	*Long chain acylCoA dehydrogenase*
LDH	Lactate déshydrogénase
KDa	Kilo Dalton
KO	*Knockdown*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MCAD	*Middle chain acyl-CoA dehydrogenase*
MCIP1	*Modulatory calcineurin-interacting protein*
MEF2	*Myocyte enhancer factor 2*
MES	*Morpholino-ethanesulfonate*
MET	Microscope électronique à transmission
MFN	Mitofusine

MHC	*Myosin heavy chain*
mi-CK	Créatine kinase mitochondriale.
MLC	*Myosin light chasin*
MPP	*Mitochondrial processing peptidase*
$NAD^+/NADH_2$	Nicotinamide adenine dinucléotide
NFAT	*Nuclear factor of activated T-cells*
NRF	*Nuclear respiratory factor*
OPA1	*Optic atrophy-1*
OXPHOS	Phosphorylation oxidative
PBS	*Phosphate buffer saline*
PCr	Phosphocréatine
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PGC-1	*Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1*
Pi	Phosphate inorganique
PKA	Protéine kinase A
PPAR	*Peroxisome proliferator activated receptor*
PPRE	*PPAR response element*
PTP	Pore de transition de perméabilité
RE	Reticulum endoplasmique
RS	Réticulum sarcoplasmique
RT	*Reverse transcription*
RXR	*Retinoid X receptor*
RyR	Récepteur à la ryanodine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*
SERCA	*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*
SUMO	*Small ubiquitin-like modifier*
TAC	*Transversal aortic constriction*
Taq	*Thermus aquaticus*
TFAM	Facteur de transcription mitochondrial A
TIM	Translocase de la membrane interne
Tn	Troponine

TOM	Translocase de la membrane externe
TRE	*Thyroid hormone responsive element*
UCP	*Uncoupling protein*
V_0	Vitesse basal de la respiration mitochondriale
VDAC	Voltage dependent anion channel
V_{max}	Vitesse maximale de la respiration mitochondriale

TABLE DES ILLUSTRATIONS

1. *Figure :*

FIGURE 1 : SCHEMA ANATOMIQUE DU CŒUR ET INDICATION DU SENS DE LA CIRCULATION SANGUINE. 20
FIGURE 2 : STRUCTURE DU TISSU CARDIAQUE. 21
FIGURE 3 : PLANCHE ANATOMIQUE DES MUSCLES SQUELETTIQUES DES MEMBRES INFERIEURS CHEZ LE RONGEUR. 22
FIGURE 4 : SCHEMATISATION DE LA COMPOSITION DU MUSCLE SQUELETTIQUE 24
FIGURE 5 : ANATOMIE DU RESEAU MUSCULAIRE CARDIAQUE. 24
FIGURE 6 : SCHEMATISATION DE LA STRUCTURE DES FIBRES MUSCULAIRES STRIEES OBTENUE GRACE A LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. 25
FIGURE 7 : ULTRASTRUCTURE D'UN SARCOMERE, SOUS MICROSCOPIE ELECTRONIQUE. ... 26
FIGURE 8 : SCHEMATISATION DE L'ORGANISATION D'UN SARCOMERE. 26
FIGURE 9 : VARIATIONS DE L'UTILISATION DES SUBSTRATS AU COURS DE L'EFFORT..... 34
FIGURE 10 : PROCESSUS CELLULAIRES DU METABOLISME GLUCIDIQUE. 36
FIGURE 11 : PROCESSUS CELLULAIRES ET VOIES DE REGULATION DE LA GLYCOLYSE AEROBIE. 39
FIGURE 12 : PROCESSUS CELLULAIRES DE L'OXYDATION DES ACIDES GRAS. 40
FIGURE 13 : CYCLE DE KREBS, AVEC LES DIFFERENTES REACTIONS DES ENZYMES INTERVENANT, LES METABOLITES ET INTERMEDIAIRES PRODUITS. 42
FIGURE 14 : SCHEMATISATION DE LA CHAINE RESPIRATOIRE AVEC SES DIFFERENTS COMPLEXES LA CONSTITUANT. 44
FIGURE 15 : PRESENTATION DES DIFFERENTS SYSTEMES DE TRANSFERT ENERGETIQUE . 46
FIGURE 16 : PRESENTATION DU SYSTEME DE TRANSFERT ENERGETIQUE CK–PCR ET DES MICRO-DOMAINES OU AGIT LA CK. 48
FIGURE 17 : STRUCTURE DE LA MITOCHONDRIE. 51
FIGURE 18 : ETAPES DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE. 55
FIGURE 19 : REGULATION COORDONNEE DU GENOME MITOCHONDRIAL & NUCLEAIRE. 56
FIGURE 20 : SCHEMATISATION DU ROLE DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE. 61
FIGURE 21 : MECANISMES MOLECULAIRES DE LA FISSION MITOCHONDRIALE PAR LES PROTEINES FIS1 ET DRP1..... 64
FIGURE 22 : ROLE DES MFNS DANS LA FUSION MITOCHONDRIALE.....68
FIGURE 23 : SCHEMATISATION DE LA FUSION MITOCHONDRIALE. 69
FIGURE 24 : ROLE DES MFNS DANS LES CONTACTS MITOCHONDRIE-RETICULUM ENDOPLASMIQUE. 71
FIGURE 25 : IMAGES CONFOCALES DE CARDIOMYOCYTES, DE FIBRES PROVENANT DE SOLEAIRE, ET DE FIBRES PROVENANT DE GASTROCNEMIEN SUPERFICIEL. 75
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DOMAINES ET DES SITES DE CLIVAGE PROTEOLYTIQUES DE LA PROTEINE OPA1 HUMAINE.. 78
FIGURE 27 : SCHEMATISATION DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES D'OPA1..... 80
FIGURE 28 : MECANISMES MOLECULAIRES PRO-APOPTOTIQUES D'OPA1 ET SA LOCALISATION MITOCHONDRIALE. 82
FIGURE 29 : SPECTRE DES MUTATIONS OPA1. 85
FIGURE 30 : SCHEMATISATION DES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES LORS D'UN EXERCICE D'ENDURANCE DANS LES MUSCLES SQUELETTIQUES. 90

FIGURE 31 : SCHEMATISATION DE L'ACTIVATION DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS LE CŒUR NORMAL, HYPERTROPHIE ET DEFAILLANT. 94
FIGURE 32 : TEST D'OPEN FIELD CHEZ LA SOURIS. 102
FIGURE 33 : TEST D'ELEVATED PLUS MAZE CHEZ LA SOURIS. 103
FIGURE 34 : TEST DE SUSPENSION CAUDALE CHEZ LA SOURIS.....104
FIGURE 35 : TEST DU ROTAROD CHEZ LA SOURIS. 105
FIGURE 36 : ACTIVITE PHYSIQUE VOLONTAIRE DES SOURIS DANS UNE ROUE. 106
FIGURE 37 : ACTIVITE PHYSIQUE FORCEE DES SOURIS SUR TAPIS ROULANT.....107
FIGURE 38 : ECHOGRAPHIE DOPPLER PULSEE MITRAL EN 2D DES SOURIS..... 110
FIGURE 39 : MESURE DE LA PRESSION ARTERIELLE CHEZ LES SOURIS.....111
FIGURE 40 : MESURE DES PARAMETRES INDIVIDUELS DES MITOCHONDRIES. 117
FIGURE 41 : SYSTEME DE MESURE DE RESPIRATION DES FIBRES PERMEABILISEES..... 120
FIGURE 42 : DETERMINATION DE L'ACTIVITE OXYDATIVE DES COMPLEXES DE LA CHAINE RESPIRATOIRE. 121
FIGURE 43 : ETUDE DE L'UTILISATION DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA MITOCHONDRIE. 122
FIGURE 44 : MARQUAGE D'UN CARDIOMYOCYTE DE SOURIS..... 126
FIGURE 45 : MESURE DU TAUX D'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN-BLOT..... 132
FIGURE 46 : MESURE DU TAUX D'EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE PAR RT-PCR..... 139
FIGURE 47 : SCHEMA BILAN DES OBSERVATIONS FAITES SUR LES CELLULES DU GASTROCNEMIEN SUITE A UN ENTRAINEMENT..... 152

2. ***Tableau :***

TABLEAU 1 : RELATION ENTRE LES ISOFORMES DES CHAINES LOURDES DES MYOSINES ET LA CLASSIFICATION DES FIBRES MUSCULAIRES. 27
TABLEAU 2 : CARACTERISTIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES. 28
TABLEAU 3 : PROTEINES DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE CHEZ LA LEVURE ET LES MAMMIFERES. 63
TABLEAU 4 : PROTOCOLE DES SEANCES D'INITIATION AU TAPIS DES SOURIS. 108
TABLEAU 5 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES ET CONDITIONS D'UTILISATION EN PCR. 140

AVANT-PROPOS

A une fonction musculaire lente ou rapide correspond une organisation cellulaire et des phénotypes contractiles et métaboliques particuliers, ainsi que des capacités d'adaptation à un stress spécifiques. L'adaptation musculaire nécessite une certaine plasticité mitochondriale, qui passe notamment par des mécanismes de biogénèse et de dynamique mitochondriale. Par ailleurs, le lien pouvant exister entre la morphologie et la fonction mitochondriale au sein de la cellule musculaire striée reste encore mal connu. L'objectif de ce travail a donc été d'étudier les effets d'une surcharge de travail sur le myocarde et les effets de l'entraînement sur les muscles squelettiques d'un modèle animal dont la cytoarchitecture a été désorganisée en perturbant le processus de fusion/fission mitochondrial. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la fonction mitochondriale de ces animaux, à leur métabolisme énergétique et à leur capacité à mettre en place une biogénèse mitochondriale suite à ces stress.

Depuis plusieurs années, l'une des thématiques de l'Unité 769 de l'INSERM est l'étude fonctionnelle et phénotypique des propriétés des muscles squelettique et cardiaque sous diverses conditions physiologiques ou pathologiques (exercice physique, insuffisance cardiaque, etc.). L'un des axes étudié par J. Piquereau, un étudiant qui a travaillé au laboratoire avant mon arrivée, fût la compréhension du rôle de la cytoarchitecture dans la signalisation énergétique du cœur de souris. Une partie de son étude a été menée sur la caractérisation d'un nouveau modèle murin, les souris *Opa1*$^{+/-}$. Dans le cadre de ma thèse, j'ai pour ma part étudié l'impact de la déficience en OPA1 sur la structure et l'organisation des mitochondries dans le cardiomyocyte adulte, ainsi que sur la fonction du pore de transition de perméabilité, car des liens entre dynamique mitochondriale et apoptose avaient été décrits. Dans un second temps, j'ai utilisé ce même modèle animal pour mettre en évidence l'importance d'OPA1 dans les capacités d'adaptation des cellules musculaires à un entraînement physique, et donc étudier les liens entre dynamique et biogénèse mitochondriale.

Lorsque ce projet de thèse a commencé en 2009, une recherche Medline révélait que seule une dizaine d'articles avaient traité de la question du lien entre

OPA1 et cœur, ou entre OPA1 et cellule musculaire squelettique. Depuis, ce nombre a augmenté de manière exponentielle, suggérant un intérêt grandissant pour cette problématique.

Ce mémoire est composé de 5 parties dont une ***Introduction***, divisée en 5 chapitres. Dans les deux premiers chapitres de l'introduction, nous décrivons les propriétés des muscles striés, à savoir leur fonction, leur structure et leur métabolisme énergétique. Etant donné l'importance de la mitochondrie en général et plus particulièrement dans notre problématique, nous avons particulièrement développé dans un troisième chapitre, la question de la plasticité mitochondriale. Nous présentons ensuite, dans un quatrième chapitre, la protéine au cœur de notre recherche, la protéine OPA1, et les conséquences de sa déficience chez les patients. Dans un dernier chapitre, nous abordons enfin les conséquences des adaptations phénotypiques musculaires induites par un stress.

Les questions soulevées par ce projet de thèse sont par la suite présentées dans une seconde partie intitulée ***Objectifs de l'étude***. Puis, une troisième partie intitulée ***Matériels & Méthodes*** explicite les différentes méthodes et moyens employés pour étudier le rôle de la dynamique mitochondriale et d'OPA1 dans la cellule cardiaque et musculaire. La quatrième partie de ce mémoire est constituée des ***Résultats***. Elle permet la présentation des publications qui sont l'aboutissement des deux études principales menées sur notre modèle *Opa1*$^{+/-}$. Dans la dernière et cinquième partie, l'ensemble des résultats obtenus au cours des deux études est confronté aux données de la littérature dans le cadre d'une ***Discussion générale***, ce qui permet d'ouvrir des perspectives possibles de prolongation de ce travail. Enfin suit la bibliographie utilisée pour rédiger ce mémoire, ainsi qu'en annexe, une étude menée en collaboration au sein du laboratoire.

Introduction

INTRODUCTION

Chapitre I : FONCTIONS ET STRUCTURE DES MUSCLES STRIES

1. *Introduction*

Les muscles striés constituent l'un des tissus les plus importants de l'organisme. A eux seuls, ils représentent environ 40 % du poids du corps chez l'homme et 32 % chez la femme. Contrairement aux tissus conjonctif et épithélial, le tissu musculaire forme, avec le tissu nerveux, un des seuls tissus excitables. Les muscles ont pour fonction d'assurer la motricité des parties du corps de manière volontaire, sous contrôle du système nerveux central (muscles squelettiques). Ils permettent également de transporter des substances à l'intérieur du corps de manière involontaire, sous contrôle du système nerveux autonome (muscles lisses), ou bien lors de stimulations hormonales (muscles cardiaques).

Dans ce premier chapitre, nous décrivons les principales différences structurales et fonctionnelles qui existent entre deux types de muscles striés, les muscles squelettiques et le muscle cardiaque. Nous insistons plus particulièrement sur leur organisation architecturale et leur fonction.

2. *Le muscle cardiaque*

2.1-Description anatomique et fonctionnelle

Le cœur (du latin *cordis)* est un organe indispensable pour le fonctionnement du corps, qui, par sa contraction rythmique, assure la progression du sang à l'intérieur des vaisseaux. Bien que la masse du cœur n'excède pas 0,4 % de la masse corporelle, il représente près de 11 % de la consommation totale en oxygène au repos (Ventura-Clapier & Veksler, 2006).

Le cœur est constitué de deux parties accolées totalement distinctes l'une de l'autre : une partie droite dite veineuse (capacitive), et une partie gauche dite artérielle (résistive). Les deux moitiés du cœur sont séparées par une paroi musculaire épaisse (septum atrio-ventriculaire), et chacune est sous-divisée en deux

types de cavités cardiaques : supérieures (oreillettes droite et gauche) et inférieures (ventricules gauche et droit). Des valves entre les oreillettes et les ventricules assurent le passage unidirectionnel coordonné du sang depuis les oreillettes vers les ventricules.

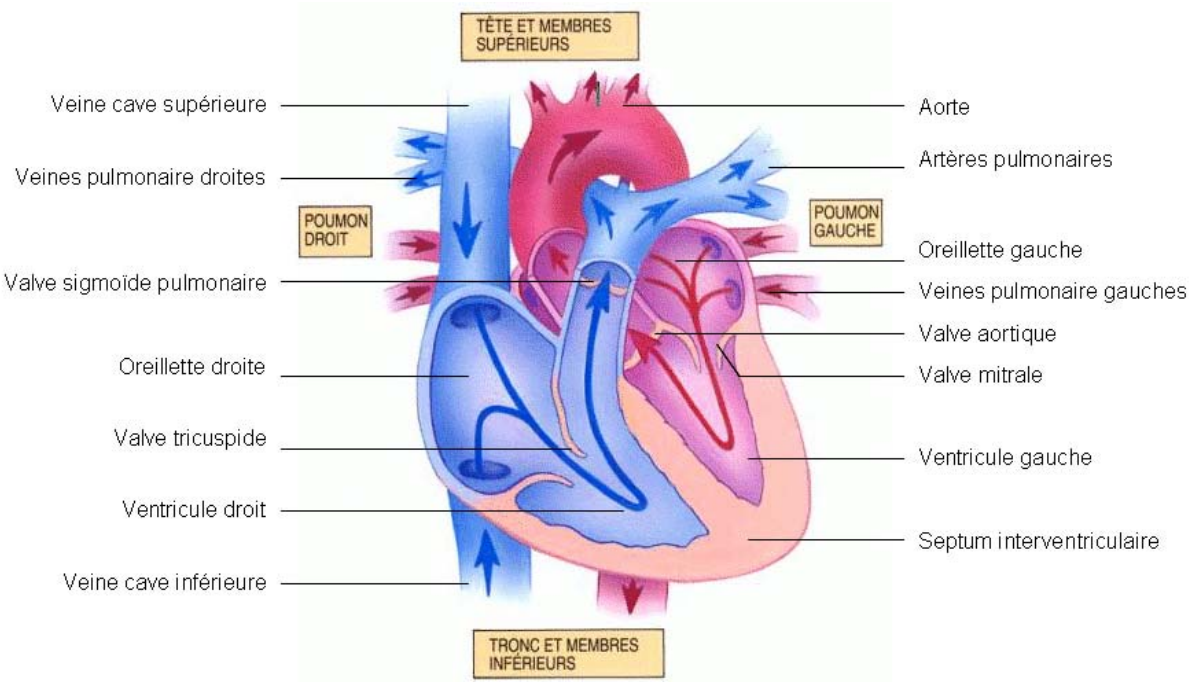


Figure 1 : Schéma anatomique du cœur et indication du sens de la circulation sanguine. *(Source : Scientiaconnaissance)*

Les deux moitiés de cœur se contractent de manière synchrone et créent ainsi deux circulations sanguines parallèles qui remplissent des fonctions différentes (**Figure 1**). Le ventricule droit dessert la circulation sanguine par les poumons (circulation pulmonaire) dans le but d'oxygéner le sang, tandis que le ventricule gauche force le sang à traverser tout le corps contre la pression corporelle (circulation systémique), pour permettre d'approvisionner en oxygène et en nutriments les différents organes de l'organisme. Ce dernier exerce une plus grande force de travail, ce qui se ressent au niveau de sa structure, plus épaisse que celle de la moitié droite.

Chaque pompe fonctionne suivant un rythme à deux temps : une phase active de contraction musculaire (systole) des oreillettes, puis des ventricules, qui permet l'éjection du sang dans les artères, et une phase passive de relâchement des fibres musculaires (diastole) durant laquelle les différentes cavités se remplissent. La succession de phénomènes de relâchement et de contraction du myocarde constitue

le processus de « révolution cardiaque ». La régulation des battements cardiaques et du rythme se fait d'une manière intrinsèque, sous le contrôle du tissu nodal. Le nœud sino-auriculaire, situé dans la paroi supérieure de l'oreillette droite, permet de commander, conduire et coordonner les contractions cardiaques. Ces cellules sont spontanément excitables, leur dépolarisation et leur repolarisation rythmiques sont involontaires et indépendantes du système nerveux. Toutefois, le système nerveux végétatif peut influencer le rythme des contractions. La contraction cardiaque ne se produit pas tant que l'influx électrique n'a pas atteint les membranes des cardiomyocytes.

2.2-Description structurelle

L'ensemble du cœur est irrigué par des vaisseaux coronaires entourés de tissus adipeux, situés à sa surface. Il est structuré en trois épaisseurs (**Figure 2**) : le péricarde, une enveloppe séreuse externe, constituée de plusieurs feuillets dont le péricarde fibreux pourvu de différents ligaments pour permettre la fixation du cœur aux autres organes. Ce feuillet extérieur est rattaché directement au péricarde pariétal, qui est séparé du péricarde viscéral par un espace péricardique. Cette zone de glissements facilite les mouvements du cœur et contient une faible quantité de liquide (50-75ml).

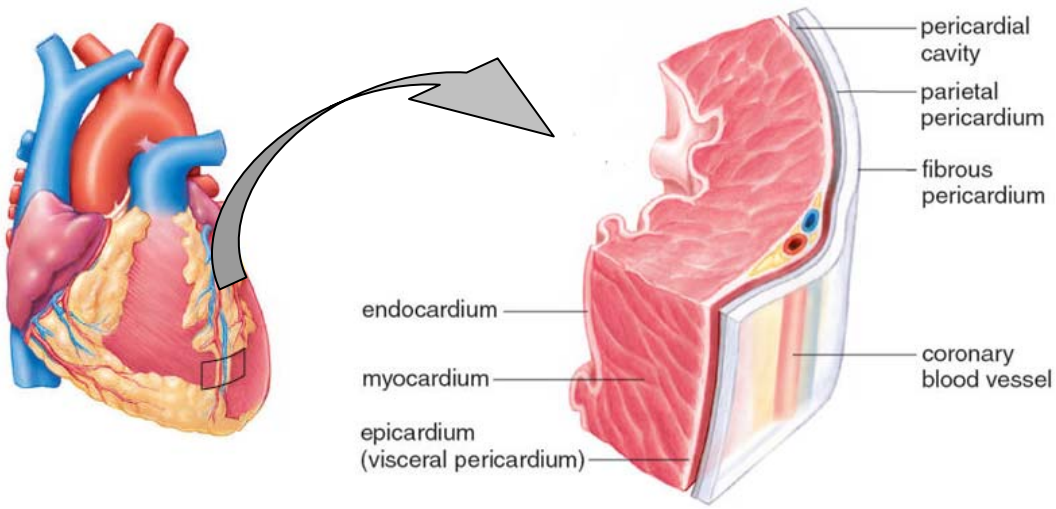


Figure 2 : Structure du tissu cardiaque. *(Source: Mc-Graw Hills Companies)*

Le péricarde enveloppe le tissu musculaire (le myocarde), qui est constitué de fibres striées dont les cellules sont attachées les unes aux autres. Son épaisseur

dépend de la fonction des cavités, il est plus épais au niveau ventriculaire qu'au niveau des oreillettes. Ce muscle est recouvert par l'endocarde, qui est formé d'un tissu épithélial pavimenteux. Cette membrane interne tapisse la face interne des cavités cardiaques et se prolonge par l'intima des artères et des veines.

3. ***Le muscle squelettique***

Les fonctions principales des muscles squelettiques consistent à produire une force et du mouvement en se contractant, et à participer à la régulation de la glycémie, ainsi que de la température corporelle. Les muscles jouent également un rôle important dans le maintien de la posture et la stabilisation des articulations, de par leur propriété de tonicité. La contraction musculaire est rendue possible par la contraction coordonnée de l'ensemble des cellules du muscle et par l'inactivité du muscle antagoniste. Pour leur permettre de se contracter suite à une stimulation du système nerveux central, ils doivent être également doués d'excitabilité, mais aussi d'élasticité afin de reprendre leur forme initiale au repos.

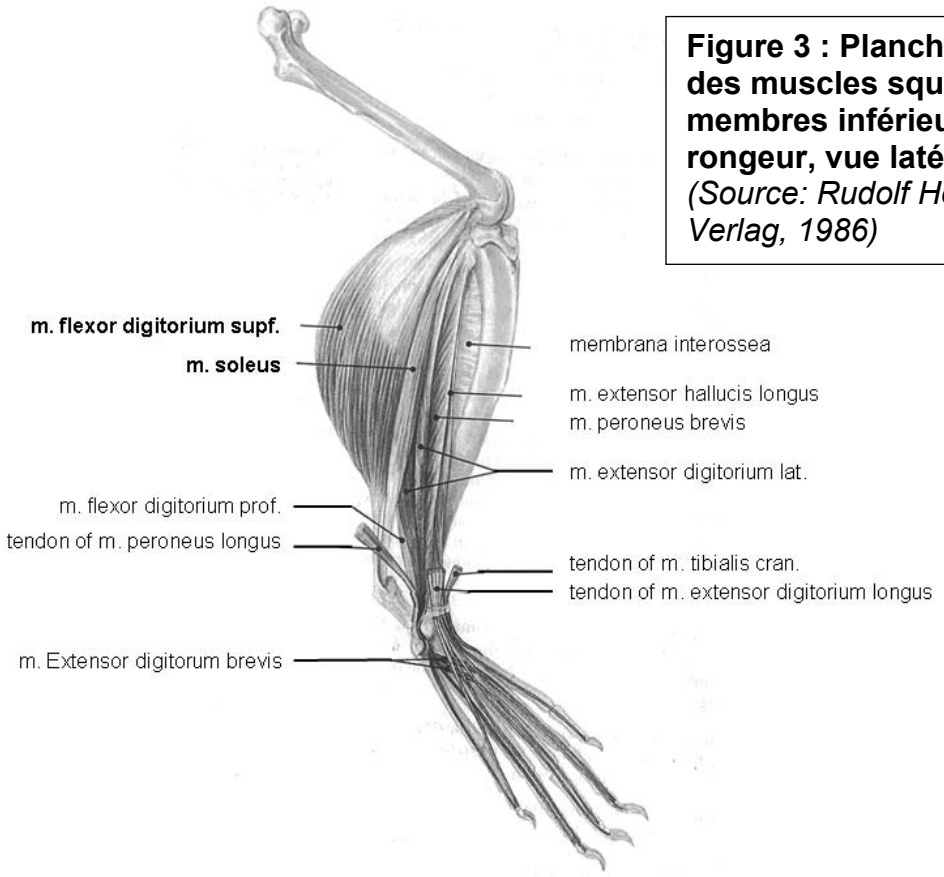


Figure 3 : Planche anatomique des muscles squelettiques des membres inférieurs chez le rongeur, vue latérale.
(Source: Rudolf Hebel, BioMed Verlag, 1986)

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à trois muscles parmi l'ensemble des muscles constituant les membres inférieurs, le muscle gastrocnémien, le plantaire et le soléaire (**Figure 3**).

Le muscle gastrocnémien (du latin *musculus gastrocnemius)*, est formé de 2 lobes. Il est responsable de la force propulsive pour la locomotion des rongeurs.

Le muscle tibial postérieur ou muscle plantaire (du latin *musculus Tibialis Posterior)*, est un muscle qui s'étend de la partie postéro-supérieure de la patte à la plante du pied. Lors d'une dissection, il est reconnaissable par sa localisation (situé entre le muscle gastrocnémien et soléaire) et par sa structure en lame tendineuse. Il permet essentiellement l'extension de la cheville.

Le muscle soléaire (du latin *musculus soleus)*, est un muscle situé le long du tibia permettant l'extension de la cheville. Ce muscle a pour caractéristique principale d'intervenir dans le maintien de la posture (exemple chez le rongeur).

Ces trois muscles remplissent des fonctions bien distinctes et leur développement est fonction de leur stimulation. Ils présentent tous trois un certain nombre de caractéristiques fondamentales, tant biochimiques que structurales, qui leur confèrent une plasticité spécifique.

4. Organisation et structure des cellules des muscles striés

4.1-Description macroscopique

Le muscle squelettique est constitué de milliers de fibres musculaires, dont chacune est une cellule unique (**Figure 4**). Le muscle squelettique est entièrement enveloppé d'une couche épaisse de tissu conjonctif fibreux (épimysium). Cette gaine protectrice se referme aux extrémités et s'unit aux autres enveloppes du tissu intramusculaire pour former les tendons. Les fibres musculaires squelettiques (jusqu'à 150) sont organisées en longs faisceaux épais parallèles, qui sont séparés par une cloison de tissu conjonctif (périmysium). Enfin, chaque fibre est indépendante l'une de l'autre, et est délimitée par une fine enveloppe de collagène I (endomysium), riche en capillaires. Les myocytes sont de larges cylindres d'un diamètre de 10-100µm et d'une longueur pouvant atteindre 30cm.

Le tissu cardiaque est quant à lui composé de fibres musculaires ramifiées, qui possèdent de courts embranchements leur permettant de s'anastomoser en

réseau (**Figure 5)**. Les espaces de ce réseau, ou espaces de Henlé, contiennent du tissu conjonctif lâche, très vascularisé. La continuité mécanique des fibres musculaires cardiaques est obtenue par leur attachement par l'intermédiaire de disques intercalaires riches en desmosomes et en jonctions communicantes (Forbes & Sperelakis, 1985). Ces dernières permettent le transfert du potentiel d'action via la communication directe des cytoplasmes (Gros & Jongsma, 1996). Les cardiomyocytes sont courts avec un diamètre de 15-20µm et une longueur de 60µm.

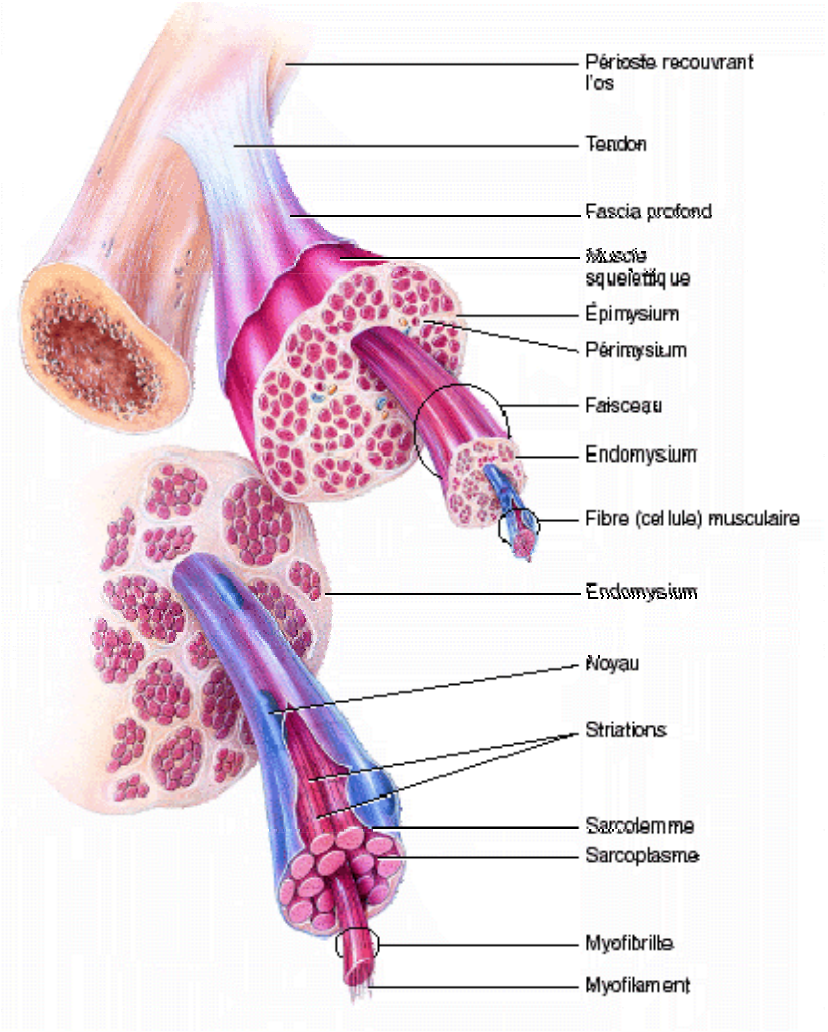


Figure 4 : Schématisation de la composition du muscle squelettique. *(Source : Tortora GJ & Grabowski, SR, Principes d'anatomie et de physiologie, 2001)*

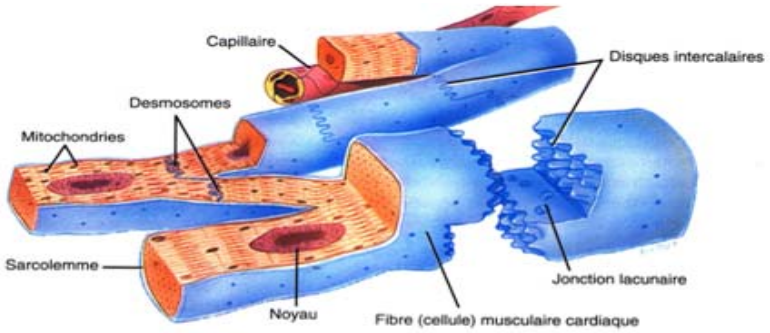


Figure 5 : Anatomie du réseau musculaire cardiaque. *(Source : Tortora et al ; 1994)*

4.2-Organisation interne des cellules des muscles striés

Les cellules cardiaques et musculaires possèdent le même type d'organisation pour assurer leur fonction de contraction (**Figure 6**), à savoir la présence de protéines contractiles, de citernes de calcium et de systèmes de production d'énergie comme les mitochondries. Quelques différences apparaissent néanmoins au niveau de la composition et du type de fibres, ainsi que dans l'organisation, la proportion et la répartition des différents compartiments cellulaires.

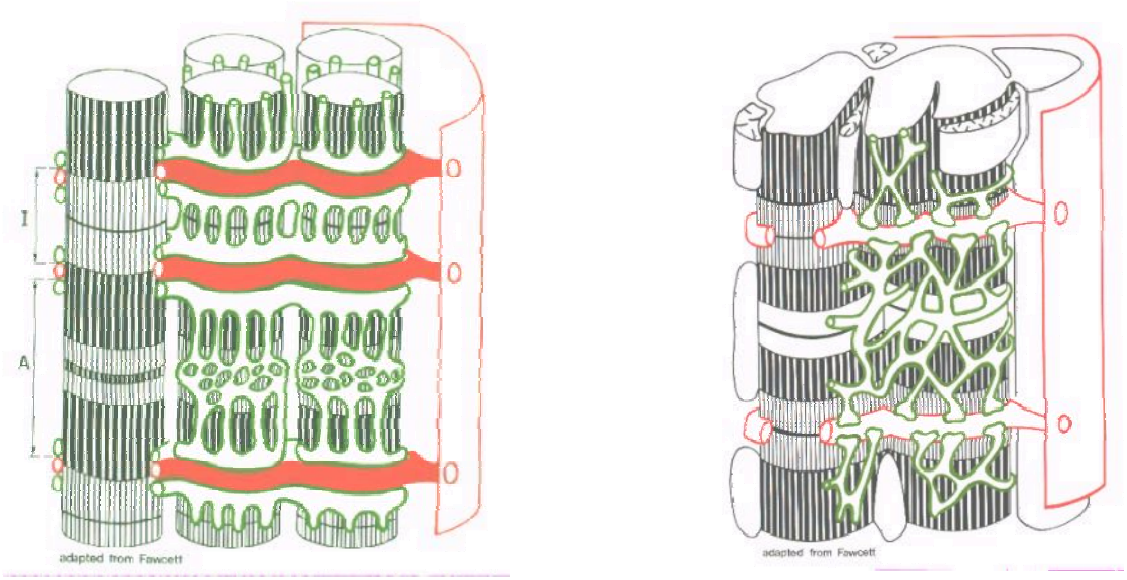


Figure 6 : Schématisation de la structure des fibres musculaires squelettiques (gauche) et cardiaques (droite) obtenue grâce à la microscopie électronique. *(Source : d'après Fawcett, 1969)*

4.2.a-Unités contractiles

Les cellules musculaires sont occupées par une masse importante de protéines myofibrillaires dont la fonction principale est d'assurer la contraction musculaire. L'appareil contractile est constitué de filaments ou myofibrilles dont l'unité morphologique et fonctionnelle est le sarcomère. Les sarcomères sont situés au même niveau selon l'axe longitudinal dans la cellule musculaire, ce qui leur donne un aspect régulièrement zébré transversalement sur toute la longueur visible par microscopie photonique (d'où leur nom de « muscle strié ») (**Figure 7**). Les bandes A et I ont ainsi été nommées à cause de leurs propriétés sous microscope polarisant (A : *Anisotropique ; I Isotropique*). Les lignes Z, M et zone H ont été nommées pour leurs propriétés sous microscope électronique (Z : *de l'allemand Zwischen, signifiant*

« entre » ; M : *de l'allemand Mittel, « centre », et* H : *de l'allemand Heller, « plus pâle »*).

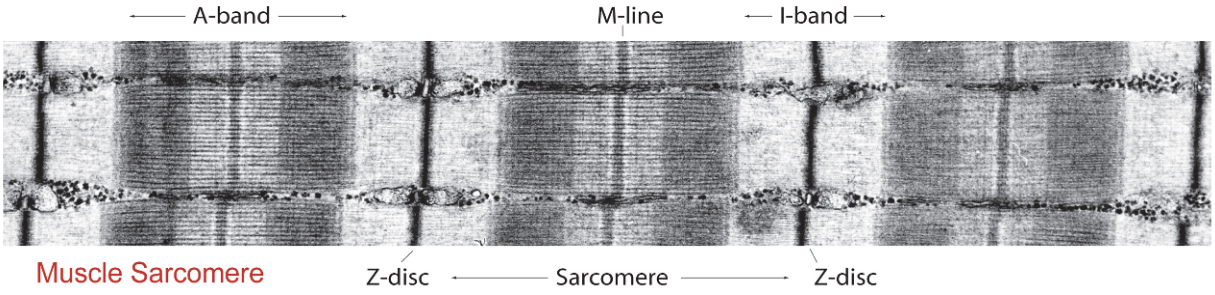


Figure 7 : Ultrastructure d'un sarcomère, sous microscopie électronique.
(Source : Lee E.H., Beckman Institute, University of ilinois, 2007)

Le sarcomère est constitué d'un assemblage de filaments fins (constitués d'actine, tropomyosine et troponine) et de filaments épais (constitués de myosine et de titine) (**Figure 8**) associés à d'autres protéines de structure et de régulation.

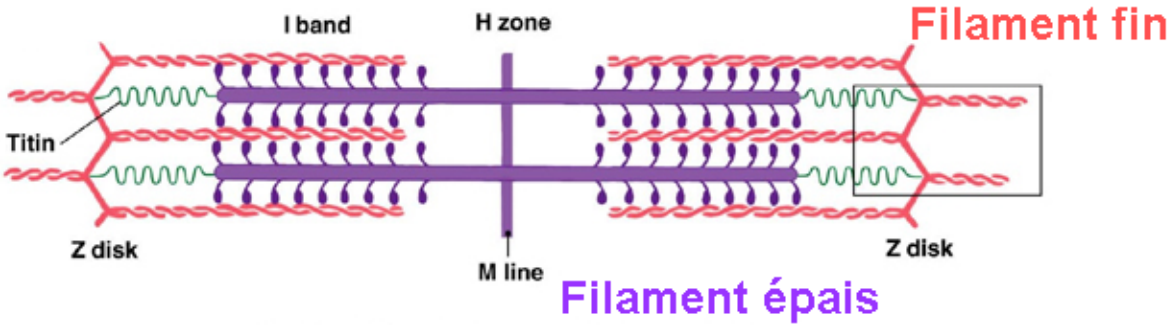


Figure 8 : Schématisation de l'organisation d'un sarcomère.
(Source: Cummings B, Pearson Education Inc., 2007)

Les filaments fins sont les composants principaux des bandes I et s'étendent jusqu'aux bandes A. Ils sont reliés à la titine dans la ligne Z via une protéine d'ancrage (α-actinine). Ils sont tous alignés parallèlement et font face à d'autres filaments fins rattachés à un autre disque Z. Les filaments épais se retrouvent à travers la bande A et se superposent dans la bande M. Dans la bande M, la cohésion des myosines est assurée par l'association avec la titine, la myomésine et les protéines C, H et M. Plusieurs protéines importantes pour l'assemblage et la stabilité de la structure du sarcomère se retrouvent dans la ligne Z et la bande M, telles que la titine (responsable de l'élasticité), qui va de la ligne Z à la bande M, la nébuline

(qui maintient la structure hélicoïdale) et la desmine (qui lie les myofibrilles à la membrane plasmique).

4.2.b-Les filaments épais

Les filaments épais ont un diamètre de 15 nm et sont constitués de 300-400 molécules de myosine native. La myosine est une molécule (200kDa) composée de deux chaînes lourdes (MHC) s'enroulant l'une autour de l'autre et de quatre chaînes légères (MLC). Les parties caudales sont rassemblées en parallèle et les têtes globulaires dépassent en périphérie et possèdent une activité ATPasique (actine dépendante) et un site de liaison à l'actine.

Il existe au moins quatre isoformes différentes de la chaîne lourde de la myosine dans les muscles des rats (MHC-1, MHC-2A, MHC-2X et MHC-2B), contre seulement trois isoformes chez l'homme (MHC-1, MHC-2A et MHC-2X) (Pette & Staron, 1990; Schiaffino & Reggiani, 1996). L'expression de ces isoformes donne lieu à l'apparition de différents types de fibres musculaires (1, 2A, 2X et 2B), dont on peut retrouver une des formes de classification dans le **tableau 1** (Bruton, 2002). Deux grandes classes d'isoformes de MHCs caractérisent les propriétés cinétiques de contraction des cellules musculaires différenciées : les isoformes de type lent (MHC-β pour le myocarde identique à MHC-1 du muscle squelettique) et les isoformes de type rapide (MHC-α pour le myocarde et MHCIIA, IIB, IIX pour le muscle squelettique).

MHC isoform	*Histochemical staining*	*Enzyme activity*	*Contractile speed*	*Morphology*
MHC-1	Type I	Slow twitch oxidative	Slow	Red
MHC-2A	Type 2A	**Fast twitch mixed**	Fast	White
MHC-2X	Type 2X (B)	Fast twitch glycolytic	Fast	White

Tableau 1 : Relation entre les isoformes des chaînes lourdes des myosines et la classification des fibres musculaires chez l'homme.
(Modifiée d'après, Source : Bruton, 2002)

Les muscles striés se composent d'un mélange des trois types de fibres musculaires, disposant chacune de caractéristiques spécifiques (**Tableau 2**). La proportion varie d'un individu à un autre, permettant à certains d'être plus avantagés génétiquement pour les activités nécessitant force et vitesse. De plus, les fibres musculaires peuvent changer non seulement en taille, mais aussi dans leur type, et en réponse à des facteurs environnementaux (Pette & Staron, 1997).

Characteristic	*Type 1 fibre*	*Type 2A fibre*	*Type 2X fibre*
Diameter	Small	Intermediate	Large
Motor neurone size	Small	Large	Large
Nerve conduction	Slow	Fast	Fast
Contractile speed	Slow	Fast	Fast
Fatigue resistance	High	Moderately high	Low
Motor unit strength	Low	High	High
Oxidative capacity	High	Moderately high	Low
Glycolytic capacity	Low	High	High
Capillarity	Dense	Dense	Sparse
Myoglobin content	High	Intermediate	Low

Tableau 2 : Caractéristiques des fibres musculaires. *(Source : Bruton, 2002)*

La composition en MHCs est un bon indicateur du profil contractile d'un muscle et en particulier de la vitesse de contraction musculaire. Chez le rongeur, il existe des muscles de type lent tels que le soléaire et le cœur, rapide comme le gastrocnémien superficiel et mixte/rapide tel que le plantaire (Talmadge, 2000). Toutefois la vitesse de contraction des fibres musculaires n'est pas expliquée uniquement par la présence des isoformes des MHCs, mais aussi en partie par les MLCs (Bottinelli & Reggiani, 2000).

En conclusion, c'est la myosine qui détermine la nature de l'action mécanique effectuée par le muscle en termes de vitesse et d'efficacité mécanique, car elle détermine la vitesse de raccourcissement par le muscle.

4.2.c-Les filaments fins

L'actine et la tropomyosine (α et β) sont les principaux constituants des filaments fins avec le complexe des troponines (Tn I, C et T). Le complexe des troponines est constitué de trois protéines : la TnT liant la tropomyosine au complexe des troponines, la TnC qui contient le site de fixation du calcium et contrôle la contraction musculaire, et la TnI qui inhibe les interactions actine-myosine. Les différentes isoformes des troponines jouent un rôle dans la régulation de la contraction musculaire (Gomes *et al.*, 2002).

D'autres protéines associées aux filaments fins sont impliquées dans le maintien et la stabilisation de leur longueur : la tropomoduline associée à la tropomyosine et à l'actine et dont il existe des isoformes spécifiques des muscles squelettiques de type lent et rapide (Gregorio *et al.*, 1995), et la nébuline, une protéine de 800kDa, et son homologue cardiaque, la nébulette de 100kDa, qui interagissent avec la tropomoduline et l'actine (McElhinny *et al.*, 2001; Moncman & Wang, 1995). Elles représentent différentes isoformes contribuant à la diversité des disques Z. La myopalladine, une protéine sarcomérique (145kDa) est impliquée dans la structure de la ligne Z via l'α-actinine du cytosquelette et la nébuline ou la nébulette (Bang *et al.*, 2001).

4.3-Les noyaux

De par l'origine développementale différente des muscles cardiaque et squelettiques, la répartition des noyaux s'en trouve changée. Dans la fibre musculaire squelettique, les noyaux sont nombreux (~ 100) et situés en périphérie de la cellule. Les cardiomyocytes n'étant pas issus de la fusion de plusieurs cellules souches musculaires, le noyau ovale est unique et en position centrale. Cependant chez les rongeurs, il est fréquent de rencontrer des cardiomyocytes binuclés (Leu *et al.*, 2001).

4.4-Le réticulum sarcoplasmique

Au niveau de la cellule musculaire striée, le réticulum sarcoplasmique (RS) représente l'un des systèmes membranaires qui divise l'intérieur de la cellule en compartiments. D'un point de vue structural et fonctionnel, le RS peut être divisé en

deux régions : les citernes subsarcolemmales et le réseau sarcotubulaire. Les citernes subsarcolemmales (RS terminal) viennent au contact du sarcolemme et du système T. Les citernes forment avec les régions adjacentes du système T les triades. Elles contiennent les récepteurs à la ryanodine *(*RyR), qui sont des canaux responsables de la sortie de calcium qui initie la contraction. Le réseau sarcotubulaire (RS longitudinal) entoure l'appareil contractile. Il assure la fonction de recaptage du calcium autour des myofilaments via ses pompes Ca^{2+}-ATPase (SERCA, *Sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*) et joue ainsi un rôle déterminant dans le phénomène de relaxation.

En conclusion, le RS remplit à la fois le rôle de stockage et de source de calcium. Il constitue le système membranaire le plus important dans le processus de contraction-relaxation (voir plus loin) au niveau des muscles squelettiques et du myocarde.

Comparativement au muscle cardiaque, le muscle squelettique possède un RS très développé qui présente des différences dans la recapture du calcium entre les fibres lentes et rapides, liées à la présence d'autres isoformes de SERCA et à leur contenu par unité de surface (Protasi, 2002).

4.5-Les mitochondries

Les mitochondries présentent une tissu-spécificité au niveau de leur morphologie, de l'organisation structurale de leur réseau et de leur proportion par rapport au volume cellulaire total (Bereiter-Hahn, 1990). La structure et l'activité enzymatique mitochondriales des muscles striés sont spécifiques de chaque espèce (Ogata & Yamasaki, 1985). Le volume occupé par les mitochondries au niveau des cellules myocardiques est corrélé à l'utilisation d'énergie. Chez la souris, le volume des mitochondries représente près de 40% du volume des cellules cardiaque, contre 2 à 15% du volume cellulaire des muscles locomoteurs.

Dans les muscles striés, les mitochondries sont généralement localisées au sein de deux espaces cellulaires mettant ainsi en évidence deux populations différentes de mitochondries : une fraction juxtaposée au sarcolemme alors qu'une autre fraction se trouve entre les myofilaments (Ogata & Yamasaki, 1985; Palmer *et al.*, 1977). Ces deux fractions, subsarcolemmale et inter-myofibrillaire, ont été caractérisées dans le cœur pour le contenu en lipides, la respiration mitochondriale

et les activités enzymatiques. Chez le rongeur, il a également été décrit l'existence d'une fraction mitochondriale périnucléaire entre les deux noyaux. De même, des différences qualitatives et quantitatives au niveau des capacités oxydatives ont été relevées dans différents types de muscles squelettiques entre les deux populations mitochondriales (Philippi & Sillau, 1994).

Finalement, plusieurs protéines du cytosquelette (actine, desmine, vimentine, tubuline, etc.) sont connues pour être impliquées dans le maintien de la disposition spatiale des mitochondries (Leterrier *et al.*, 1994; Rappaport *et al.*, 1998) ainsi que dans le contrôle de la morphologie et les mouvements mitochondriaux durant le cycle de contraction-relaxation.

En conclusion, l'architecture cellulaire des muscles squelettiques et du muscle cardiaque est optimisée pour assurer leur fonction contractile. Les structures intracellulaires y sont hautement organisées, et la densité très forte de ces cellules limite les déplacements et la diffusion de certains signaux. Ces cellules très différenciées, contrairement à d'autres types cellulaires, ont donc du mettre en place des mécanismes spécifiques pour permettre d'assurer leurs fonctions cellulaires comme la contraction ou les transferts énergétiques.

5. Fonction contractile des cellules des muscles striés

5.1-Mécanismes de contraction

Les phénomènes de contraction cellulaire résultent du glissement des filaments d'actine par rapport à ceux des myosines, au niveau de la bande A. L'énergie nécessaire à la force mécanique est fournie par l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) et est régulée par le calcium. Le mécanisme moléculaire de la contraction commence par la dépolarisation de la membrane plasmique et se poursuit avec la fixation du calcium sur la Troponine C, entraînant le glissement des têtes de filaments de myosine par rapport à ceux d'actine et le raccourcissement musculaire. C'est l'activité ATPasique des têtes de myosine qui permet l'hydrolyse de l'ATP, et donc la libération de l'énergie chimique nécessaire aux changements physico-chimiques des filaments entrainant le développement de la tension et le raccourcissement du muscle strié.

5.2-Le couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction (couplage E-C) regroupe les mécanismes permettant une forte augmentation de la concentration calcique intracellulaire lors d'une stimulation. Suite à une dépolarisation des membranes plasmiques, le potentiel d'action se propage le long des invaginations des tubules transverses (tubules T) et stimule les canaux sensibles à la dihydropyridine (DHPR ; *Dihydropyridine receptor)*, qui par leurs interactions fonctionnelles avec les RyR du RS, permettent une libération massive et rapide du calcium des réserves internes du RS terminal au niveau des myofilaments (Dulhunty *et al.*, 2002).

Des différences de couplage E-C entre les muscles cardiaques et squelettiques s'expliquent entre autres par la diversité des isoformes des différents constituants impliqués, la régulation de l'activité de ces constituants et leur organisation spatiale respective. Cette variété d'isoformes module les paramètres électrophysiologiques des canaux DHPR voltage-dépendant et la capacité d'interaction avec les canaux RyR.

De plus, le mécanisme moléculaire du couplage E-C est fondamentalement différent entre les muscles squelettiques et cardiaques. Pour le myocarde, l'augmentation du calcium intracellulaire résulte de l'entrée du calcium à travers les DHPR qui activent les RyR, provoquant leur ouverture et la libération du calcium à partir des citernes subsarcolemmales, un phénomène appelé CICR (*Calcium-induced calcium-release*) (Bers, 2002; Fabiato, 1983). Dans le muscle squelettique, ce sont les mouvements de charges intra-membranaires, lors de la dépolarisation, qui induisent des changements de conformations des DHPRs directement transmis aux RyR pour déclencher la libération du calcium par le RS, un mécanisme appelé DICR (*Depolarisation-induced calcium-release*) (Fleischer & Inui, 1989; Nakai *et al.*, 1998).

La fonction mécanique des cellules musculaires via le processus d'excitation-contraction consomme beaucoup d'énergie, que ce soit au niveau de l'ATPase des myosines (responsable de 60-70% des dépenses énergétiques) ou de la pompe SERCA dans le RS. Il existe plusieurs voies de production d'ATP préférentiellement utilisées selon la spécialisation du muscle que nous présentons dans le chapitre suivant.

Chapitre II : METABOLISME ENERGETIQUE DES MUSCLES STRIES

1. *Introduction*

Dans la cellule musculaire striée, 90 % de la dépense énergétique est utilisée par la contraction musculaire et par les processus de coordination et de coopération des différents composants associés. La production d'énergie est possible grâce à des voies métaboliques spécifiques et à l'existence d'organites hautement spécialisés, les mitochondries. Les voies métaboliques utilisées pour sa synthèse varient selon les besoins physiologiques de chaque type musculaire. Cette spécialisation énergétique est liée aux besoins fonctionnels propres à chaque type musculaire.

Dans ce second chapitre, les principales voies métaboliques et de synthèse de l'ATP dans les cellules des muscles striés sont décrites.

2. *Propriétés métaboliques des muscles striés*

Comme cela a été présenté brièvement dans le chapitre précédent, un muscle rapide est stimulé lors de contractions intenses et brèves et est fatigable, tandis qu'un muscle lent est caractérisé par une activité contractile soutenue ou cyclique et par une résistance à la fatigue. Ces propriétés contractiles sont liées à une utilisation spécifique de différents substrats énergétiques.

2.1-Les réserves énergétiques

Au niveau des muscles, les réserves en hydrates de carbone sont sous forme de glycogène (chez l'homme, 9-16 g glycogène/ kg de muscle frais). La répartition du glycogène est homogène au niveau d'un même type de fibres. Elle est plus importante dans les fibres rapides glycolytiques, et plus basse au niveau des fibres lentes oxydatives. Par conséquent, la concentration de glycogène est plus importante dans les muscles à contraction rapide et à métabolisme glycolytique que dans les muscles lents oxydatifs. Le glycogène musculaire joue un rôle important dans la réponse rapide à la stimulation.

De même, dans les muscles, les lipides sont stockés sous forme de triglycérides. En théorie, les réserves lipidiques adipocytaires sont inépuisables (l'homme pourrait courir 120h avec les seules réserves de graisses).

2.2-Les filières énergétiques

Selon leurs besoins énergétiques, les muscles striés font appel à trois filières répondant chacune à une intensité et une durée d'effort spécifique (**Figure 9**).

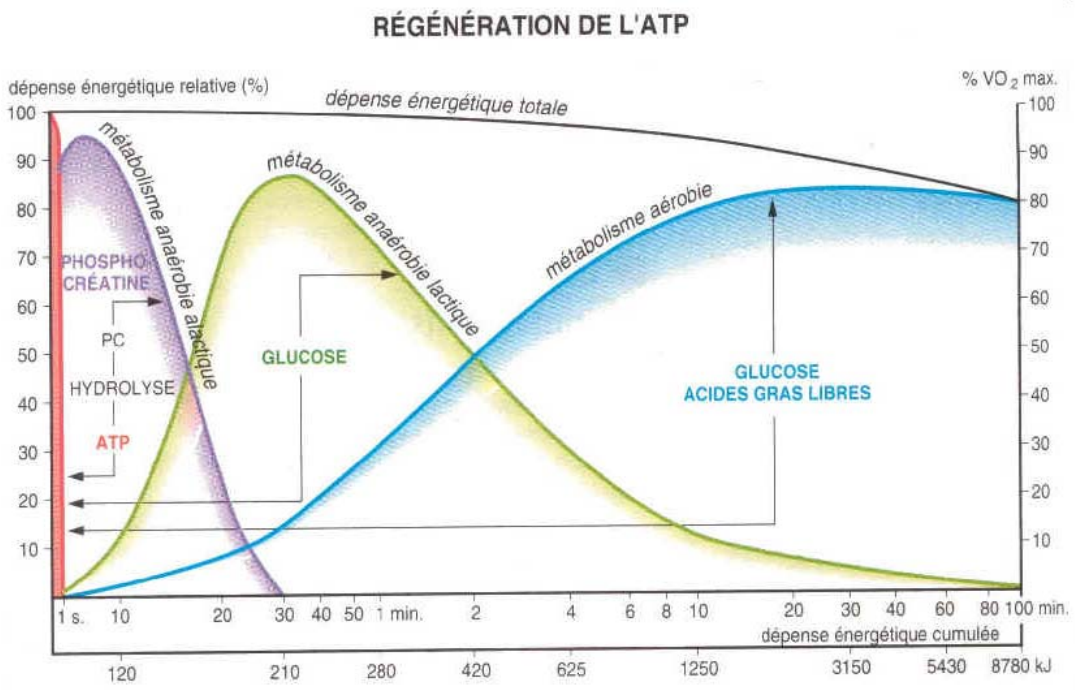


Figure 9 : Variations de l'utilisation des substrats au cours de l'effort.
(Source : Marcdarchez.wordpress)

2.2.a-La filière anaérobie alactique

Il s'agit d'une filière énergétique qui produit de l'énergie en absence d'oxygène et sans production de lactate. Elle permet de répondre à des efforts courts et intenses (ex : sprint 100m, haltérophilie) en utilisant les réserves disponibles de phosphocréatine (PCr) et d'ATP. N'ayant pas besoin d'oxygène, elle se met en place instantanément lors du début de l'effort, cependant, les réserves étant très limitées, elle ne permet pas de maintenir un effort intense (1-5 sec). Si l'effort se prolonge, alors la filière anaérobie lactique devient prioritaire.

Lors des cinq premières secondes d'un sprint, 90 % des réserves en PCr et 20% de celles en ATP sont utilisées. Mais elles sont reconstituées à 80 % en 1 min de récupération, si l'approvisionnement en oxygène est suffisant.

2.2.b-La filière anaérobie lactique

Elle s'initialise dès la mise en action du corps, mais ne devient prioritaire qu'au bout de cinq secondes. Elle produit de l'énergie et resynthétise l'ATP en absence d'oxygène, mais avec production de lactate, ce qui va nuire à la performance sur le long terme (augmentation du pH musculaire). Elle permet d'approvisionner le corps pour des efforts de 1-3 min d'intensité élevée (ex : sprint 400 m) en utilisant le glycogène et le glucose comme substrat.

2.2.c-La filière aérobie

Elle est la filière majoritaire, utilisée au quotidien pour vivre. Elle prend le relais des deux autres filières au bout d'une minute. Elle produit de l'énergie et resynthétise les réserves d'ATP en utilisant l'oxygène, tant que les substrats sont disponibles (glucose,AG, pyruvate …). Elle permet donc d'approvisionner le corps sur des efforts de puissance relativement faible mais avec une capacité très élevée et constante.

Les muscles rapides présentent des réserves énergétiques importantes, contrairement aux muscles lents qui dépendent principalement de la production mitochondriale d'ATP.

3. -Les voies de synthèse de l'ATP

Les mitochondries sont des organites spécialisés, entre autres, dans la fonction de centrale énergétique cellulaire. Elles auraient pour ancêtre des bactéries, devenues l'hôte symbiotique d'organismes primitifs anaérobies. Les cellules eucaryotes actuelles sont donc les descendantes de ces organismes primitifs, qui ont réussi à s'adapter à un environnement s'enrichissant en oxygène, par l'intégration de bactéries aérobies. De par leurs multitudes de fonctions cellulaires, les mitochondries sont essentielles aux cellules eucaryotes. Elles présentent des différences significatives entre le muscle cardiaque et les muscles squelettiques, tant par leurs capacités oxydatives (Ogata & Yamasaki, 1985; Ventura-Clapier *et al.*, 1998) que par

la régulation de leur fonction (Kuznetsov *et al.*, 1996; Saks *et al.*, 1996; Veksler *et al.*, 1995; Wallimann *et al.*, 1992) ou la nature de leur substrat préférentiel (Bahi *et al.*, 2004).

En cas d'oxygénation insuffisante, la cellule utilise la fermentation dans le cytoplasme pour produire l'énergie nécessaire à son fonctionnement Mais ce système est beaucoup moins efficace, et les substrats ne sont dégradés que partiellement, comparé au catabolisme oxydatif. En présence d'oxygène, les mitochondries oxydent les substrats organiques en produisant de l'énergie directement utilisable par les cellules et en libérant du CO_2.

3.1-La voie anaérobie

Dans des conditions de capacités oxydatives réduites (quantité insuffisante de mitochondries pour le muscle blanc ou manque d'oxygène pour le muscle rouge), le pyruvate est transformé par la glycolyse anaérobie, une autre voie métabolique possible du catabolisme du glucose ou du glycogène (**Figure 10**).

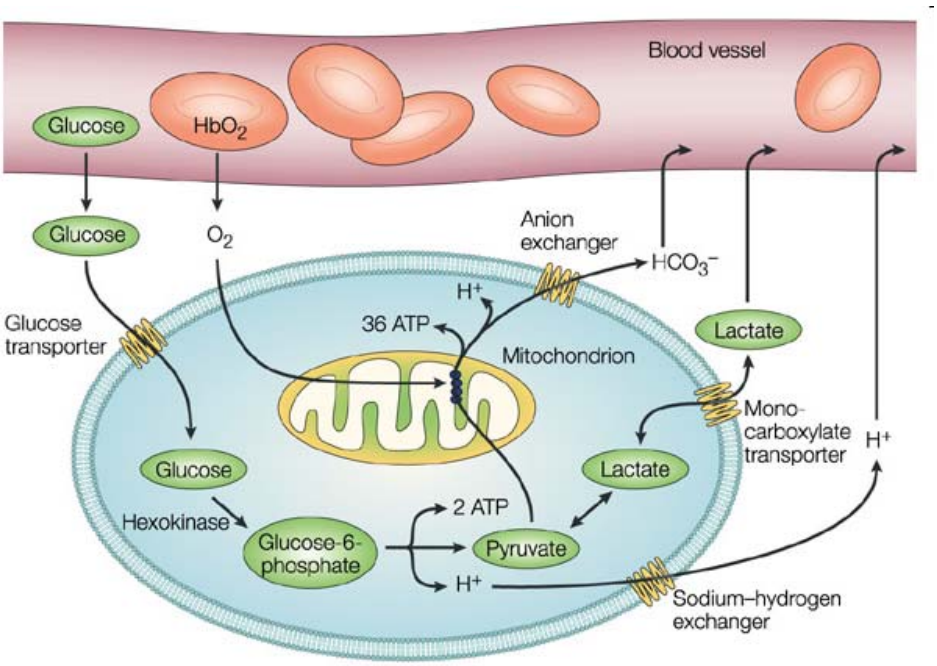


Figure 10 : Processus cellulaires du métabolisme glucidique.
(Source : Gatenby & Gillies, 2004)

Le glucose pénètre dans la cellule eucaryote via deux types de transporteurs membranaires : le *Sodium-coupled Glucose Transporter* (SGLT) ou le *Glucose Transporteur facilitator* (GLUT). Le transporteur actif du glucose SGLT comprend trois isoformes et les GLUTs comportent quatorze membres dans leur famille. Les GLUTs ont des affinités variables pour le glucose, et sont regroupés en trois classes (Wood & Trayhurn, 2003): la classe I (GLUT 1-4) avec GLUT 1 et 3 qui sont exprimés ubiquitairement et GLUT 4 qui est le principal transporteur exprimé dans les cellules musculaire striées et qui nécessite la présence d'insuline pour sa translocation à la membrane. Sa translocation membranaire peut être également induite par l'AMPK lors de la contraction musculaire. Les deux autres classes sont la classe II, avec GLUT 5, 7, 9, et 11 qui sont dédiés au transport de fructose (Wood & Trayhurn, 2003), et la classe III (GLUT 6, 8, 10, 12, HMIT).

Dans le cadre de la glycolyse anaérobie, le pyruvate est directement transformé en lactate dans le cytosol par la lactate déshydrogénase (LDH), puis le lactate peut emprunter des transporteurs cellulaires et mitochondriaux pour traverser les membranes dans un sens ou dans un autre (Halestrap & Price, 1999). Ce processus aboutit également à la réoxydation des coenzymes $NADH,H^+$ en NAD^+.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NADH,H^+ \leftrightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + NAD^+$$

Le bilan énergétique de la glycolyse anaérobie est relativement pauvre, car elle aboutit à la production de seulement deux molécules d'ATP par molécule de glucose dégradée.

Dans les muscles striés, la LDH reflète le métabolisme énergétique de par la prédominance tissulaire de certaines de ses sous-unités. Cette enzyme tétramérique est constituée de deux types de sous unités, H et M, induisant l'existence de cinq isoformes H4, H3M1, H2M2, H1M3 et M4. Ces sous-unités se distinguent par leur comportement vis à vis du pyruvate : la forme H est plus sensible à l'inhibition par le pyruvate et favorise donc son oxydation, contrairement à la M qui favorise sa transformation en lactate. Ainsi, l'isoforme H4 prédominante dans le cœur assure un métabolisme de type oxydatif (lactate→pyruvate), alors que M4 essentiellement exprimée dans le muscle squelettique est associée à un métabolisme plutôt glycolytique (pyruvate→lactate) de par leur localisation.

Historiquement, le muscle squelettique était considéré comme le principal lieu de production de lactate durant la contraction, et cette production était associée à une oxygénation insuffisante du muscle et à l'apparition de la fatigue musculaire. Dans ces conditions, le lactate apparait comme un déchet métabolique. Cependant, les travaux de Cori (1931) ont permis de contredire cette notion de déchet attribué au lactate et ont révélé qu'il représentait un carrefour au sein des voies métaboliques. En effet de études récentes (Brooks, 2002; Van Hall, 2000) ont montré que le muscle squelettique ne joue pas seulement un rôle important dans la production, mais également dans la clairance du lactate, par son échange entre les lieux de production et d'utilisation (muscle/sang, fibres rapides/fibres lentes d'un même muscle, cytosol/mitochondrie, muscle/cœur).

3.2-La voie aérobie

Le cœur peut utiliser préférentiellement comme substrat le glucose, les AG ou le lactate suivant leur disponibilité respective. Leur oxydation dépend également de l'apport continu en oxygène. Les réactions liées à ces voies débutent au niveau du cytoplasme et se terminent dans les mitochondries où l'étape ultime est la réduction de l'oxygène et la production d'ATP. La voie aérobie inclut deux types de catabolisme : la glycolyse aérobie qui correspond à l'utilisation des hydrates de carbone et la β-oxydation à celle des AG.

3.2.a-La glycolyse aérobie

Suite à son importation dans la cellule, le glucose cytosolique est transformé en pyruvate (**Figure 11**) et participe à la production d'ATP (1). Puis dans le cas d'une glycolyse aérobie, le pyruvate est importé dans la matrice mitochondriale pour produire de l'acétyl-CoA et du $NADH,H^+$ (2) par la pyruvate déshydrogénase (PDH) à l'aide d'une étape de carboxylation oxydative. Pour finir (3), l'acétyl-CoA ainsi formé est pris en charge par le cycle de Krebs.

(1) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + 4H$

(2) $CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + H\text{-}CoA + NAD^+ \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CoA + NADH,H^+ + CO_2$

(3) $CH_3\text{-}CO\text{-}CoA + 3H_2O \rightarrow HcoA + 2\ CO_2 + 8H$

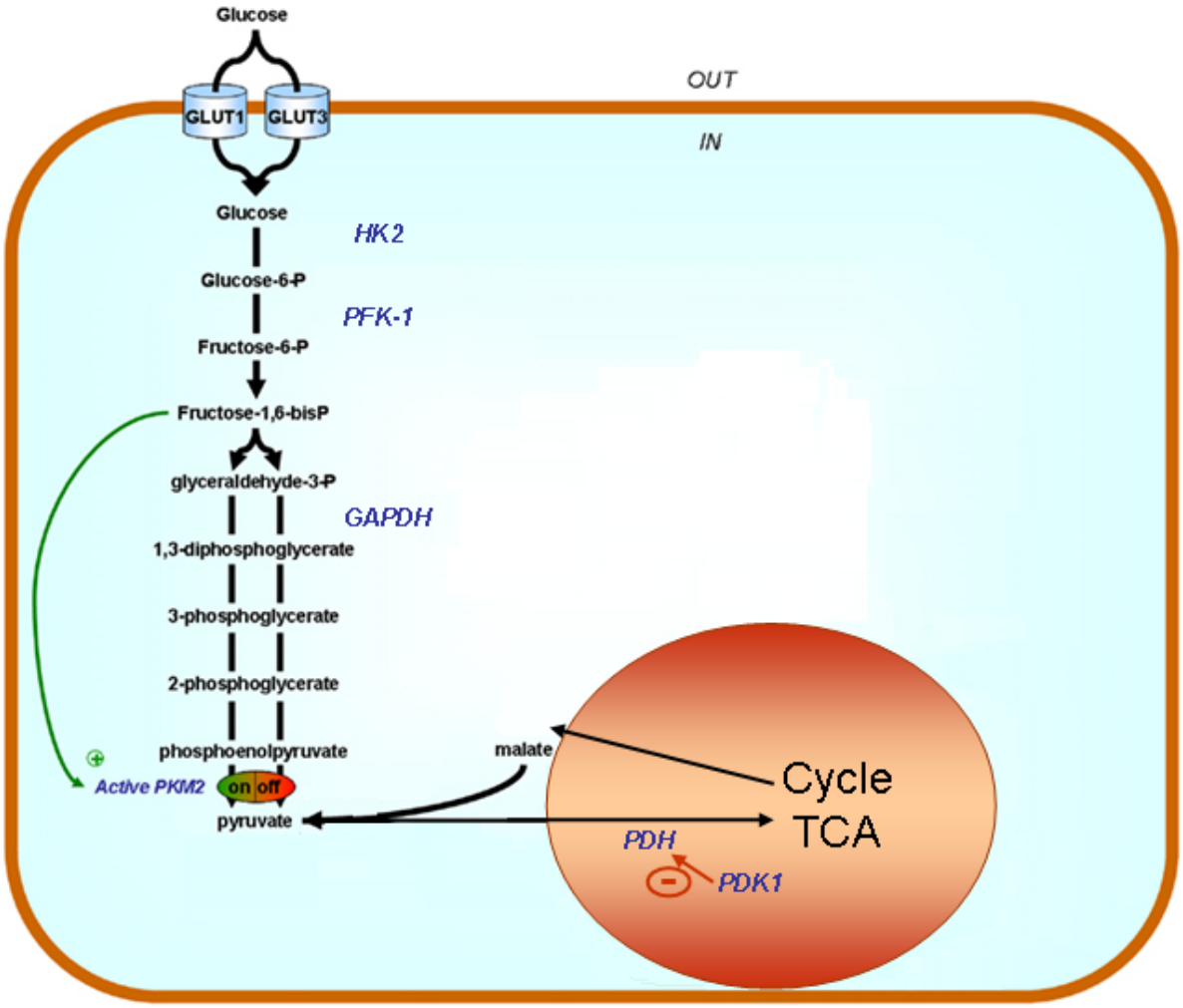


Figure 11 : Processus cellulaires et voies de régulation de la glycolyse aérobie. *(Modifiée d'après, Source : Porporato, 2011)*

Le bilan énergétique de la glycolyse suivie de la phosphorylation oxydative est de 36 ou 38 molécules d'ATP produites (en fonction de la navette de transport du NAD^+) pour l'oxydation complète d'une molécule de glucose.

Des modulations possibles de l'efficacité de cette filière métabolique dans les cellules musculaires se trouvent entre autres au niveau de l'importation du glucose. Le transport par diffusion facilitée se trouve être une étape limitante du métabolisme. Il est également possible de moduler la production d'acetyl-CoA au niveau d'enzymes clefs de la glycolyse aérobie dont : l'hexokinase (HK2), la phosphofructokinase (PFK-1) et la glyceraldehyde 3 – phosphate déshydrogénase (GAPDH). En effet, la PFK est activée par l'accumulation du taux d'ADP et d'AMP provenant de l'augmentation des désordres énergétiques. A contrario, elle est inhibée par les AG, le lactate et l'ATP, ce qui par voie de conséquence aboutit à

l'inhibition de la HK. Il est également possible de réguler la glycolyse aérobie par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui est capable d'inhiber l'activité de la PDH.

3.2.b-La β-oxydation

Le catabolisme des lipides (**Figure 12**) passe dans un premier temps par une première étape d'hydrolyse enzymatique (par des lipases) qui aboutit à la production de glycérol et d'AG. S'ensuivent des étapes de phosphorylation-oxydation du glycérol qui lui permet de rejoindre le métabolisme glucidique à partir du pyruvate via la production de G3P (Glycéraldéhyde-3-phosphate).

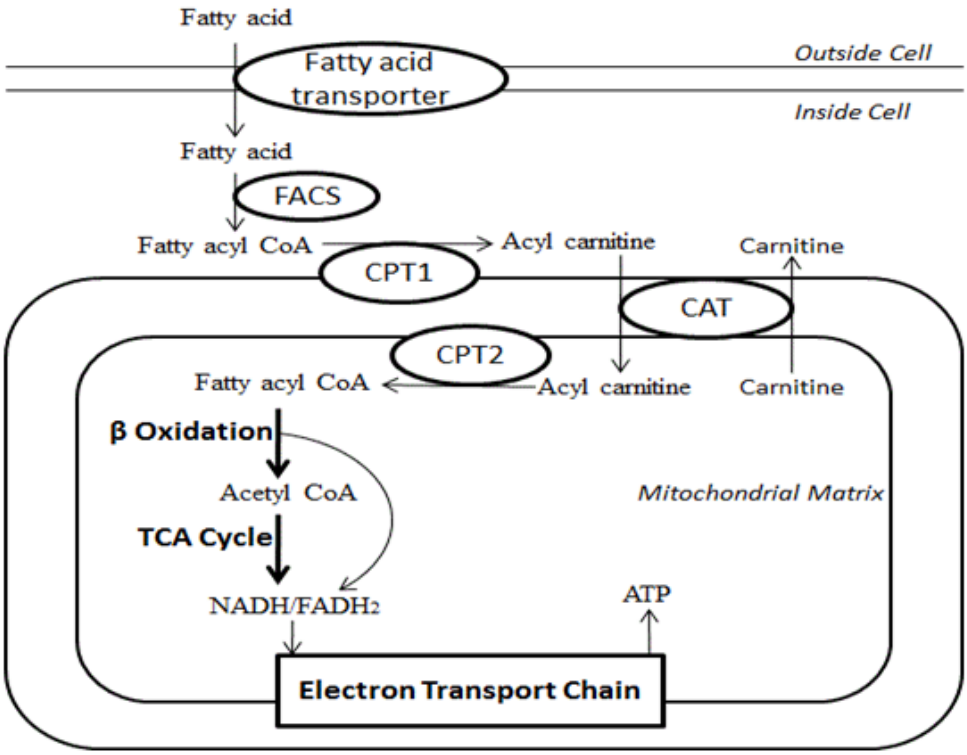


Figure 12 : Processus cellulaires de l'oxydation des acides gras.
(Source : lipidlibrary.aocs)

Le taux d'entrée des AG dans la cellule est dépendant de la concentration plasmatique d'AG libres ou non estérifiés. Les AG à chaîne courte (C2-C10) traversent la membrane interne des mitochondries par diffusion passive (par flip-flop) sous forme libre, tandis que les AG à longue chaîne (>C10) pénètrent dans la cellule à l'aide de divers transporteurs protéiques dont la FAT (*Fatty acid translocase*). FAT/CD36 est fortement exprimé dans les muscles striés et apparait être l'isoforme

prédominante dans le cœur. Une fois dans le cytosol, tous les AG sont préalablement activés par association à l'acyl-CoA avant leur oxydation :

$$R\text{-}CH_2\text{-}COOH + ATP + HS\text{-}CoA \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + AMP + PPi$$

Les acyl-CoA produits à courte et moyenne chaîne pénètrent dans la mitochondrie par diffusion simple, pendant que les acyl-CoA à longue chaîne utilisent un système de transport leur permettant de passer les différentes membranes mitochondriales. Le système carnitine-acyltransferases est composé de carnitine palmitoyl transférases I et II (CPTI et CPT-II). Les acyl-CoA se lient de manière transitoire à la L-carnitine (CPT I) pour passer la membrane externe, puis traversent la membrane interne via la navette acyl-carnitine (CPT II).

Dans la matrice mitochondriale, la ß-oxydation des AG se déroule par cycles répétés de quatre étapes enzymatiques, jusqu'à la réduction intégrale de la chaîne carbonée en molécules d'acétyl-CoA, qui seront par la suite entièrement oxydés en molécules de CO_2 et d'H_2O par le cycle de Krebs.

Le bilan énergétique de la ß-oxydation est de 95 molécules d'ATP produites pour l'oxydation complète d'une molécule d'AG de 12 carbones. Pour cette raison, le métabolisme des AG est considéré comme étant la voie la plus énergétique. Néanmoins, cette réaction est plus lente que celle de la glycolyse aérobie.

L'une des modulations possibles de l'utilisation de cette filière métabolique se trouve à l'étape de transport mitochondrial des AG. CPT-I peut être inhibé allostériquement par le malonyl-CoA, qui est issu de la dégradation de l'acétyl-CoA par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC).

Une autre modulation possible du flux des AG est l'AMP kinase (AMPK). Cette kinase est activée par l'augmentation du rapport AMP/ATP. Elle inhibe l'ACC permettant la levée de l'inhibition du malonyl-CoA sur CPT-I et d'activer à nouveau la dégradation des AG. Il se pourrait également que l'AMPK active la MCD (malonyl-CoA décarboxyalse) qui a une action inverse à celle de l'ACC.

3.2.c-Le cycle de Krebs

L'ensemble des catabolismes glucidique, lipidique et des acides aminés convergent au niveau du cycle de Krebs par leur production d'acétyl-CoA.

Découvert en 1937 par Hans Adolf Krebs, appelé également cycle des acides tricarboxyliques (TCA), le cycle de Krebs se déroule en aérobie dans la matrice

mitochondriale. Il est constitué de dix étapes enzymatiques à base de condensation, déshydrogénation, hydratation, décarboxylation oxydative, phosphorylation, catalysées par huit enzymes différentes (**Figure 13**). La finalité de ces réactions est l'oxydation totale de l'acétyl-CoA en CO_2 et H_2O, ainsi que la production de coenzymes NADH,H+ et $FADH_2$, qui seront réoxydés dans un second temps par la chaîne respiratoire et participeront ainsi à la production d'ATP. L'ensemble des réactions de ce cycle peuvent se résumer par cette équation:

Acétyl-CoA + $3NAD^+$ + $2H_2O$ + FAD +GDP + Pi ➔ $3NADH,H^+$ + $FADH_2$ +GTP + CoA + $2CO_2$

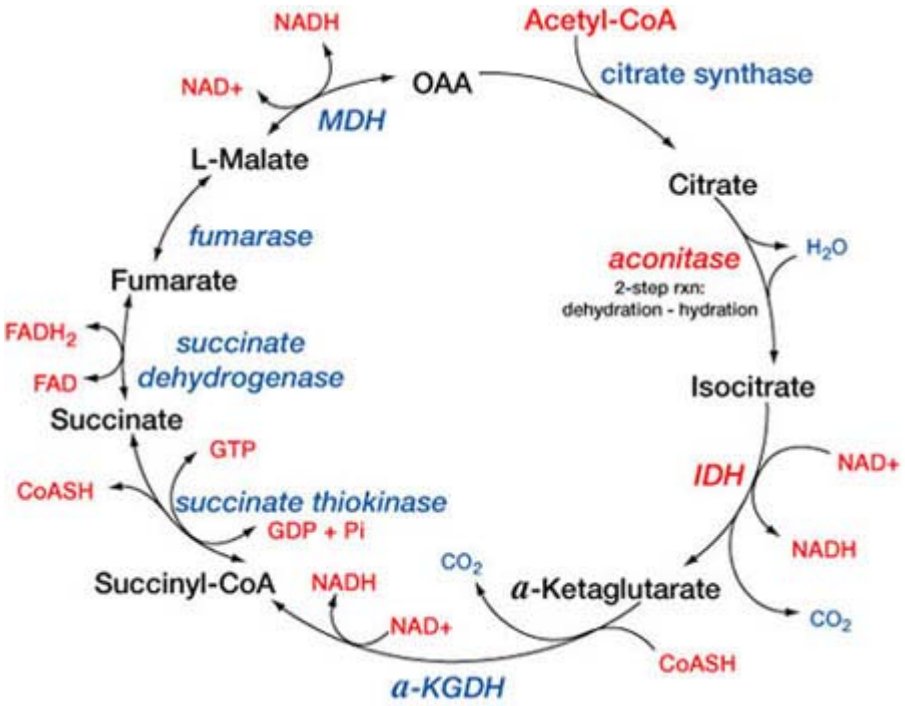


Figure 13 : Cycle de Krebs, avec les différentes réactions des enzymes intervenant, les métabolites et intermédiaires produits.
(Source : thealchemistkitten.wordpress)

Les étapes irréversibles de ce cycle se situent au niveau de la citrate synthase (CS), de l'isocitrate déshydrogénase et de α-cétoglutarate déshydrogénase. L'activité de la CS est activée par l'ADP et inhibée par le NADH, H^+, l'ATP et le citrate. Les deux autres enzymes sont activées par le calcium et inhibées par le NADH, H^+ et l'ATP.

Les modulations possibles de l'efficacité de ce cycle sont multiples. Etant un processus aérobie, ce cycle s'arrête par manque de coenzymes oxydés lors d'un manque d'oxygène. De plus, certains intermédiaires peuvent être utilisés par d'autres fonctions cellulaires, ce qui provoque un échappement au cycle. Il peut y avoir aussi

une régulation selon la disponibilité des substrats, le pouvoir réducteur, la concentration en produits et la charge énergétique.

3.2.d-Les navettes mitochondriales

A l'issue de l'activité de la glycolyse et du cycle de Krebs, les différents coenzymes $NADH,H^+$ et $FADH_2$ sont réduits. Pour permettre la poursuite du bon déroulement de ces différentes réactions, il est donc nécessaire que les coenzymes soient de nouveau oxydées. Leur régénération est réalisée par la chaîne respiratoire, qui est localisée au niveau des crêtes de la membrane interne mitochondriale. Cette régénération s'accompagne de la production d'H_2O, d'ATP et de CO_2. Pour cela, il faut avant tout que le $NADH,H^+$ cytoplasmique soit importé dans la mitochondrie. Or, la membrane externe mitochondriale est perméable à la plupart des molécules (<10kDa) grâce à la présence de la porine, mais ce n'est pas le cas de la membrane interne qui se trouve être imperméable. Pour se faire, le $NADH,H^+$, franchit cette dernière membrane à l'aide de deux navettes. Dans le myocarde et les muscles squelettiques à profil métabolique aérobie, on retrouve l'utilisation massive du système malate/aspartate pour le transfert du $NADH,H^+$. Par contre, dans les muscles à profil métabolique anaérobie, c'est le système glycérol-3-phosphate (G3P) qui domine.

La réduction en molécule d'ATP diffère selon ces deux navettes. La navette malate/aspartate permet le transfert d'une molécule de $NADH,H^+$ cytosolique pour une molécule $NADH,H^+$ mitochondriale, et la navette G3P permet le transfert d'une molécule $NADH,H^+$ cytosolique pour une molécule $FADH_2$. Donc, pour un même substrat, le bilan énergétique sera différent selon le muscle étudié.

3.2.e-La chaîne respiratoire mitochondriale

Le transport des équivalents réducteurs (H^+ et e^-) des coenzymes réduits vers l'oxygène s'effectue par une cascade de réactions d'oxydoréduction à travers quatre complexes protéiques membranaires (I, II, III et IV). Ce transfert électronique induit également la création d'un gradient transmembranaire de charges et de pH, par l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (**Figure 14**). Ce gradient électrochimique de protons fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'activité du cinquième complexe (V) de la chaîne respiratoire, selon la théorie de Peter Mitchell (ce qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1978). Ce mécanisme de

phosphorylations oxydatives (ou OXPHOS) est donc basé sur le couplage entre l'oxydation des équivalents réduits par la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ADP via ce gradient de protons. L'ensemble de ces complexes diffuse indépendamment au sein de la membrane interne, et est connecté par un transporteur liposoluble mobile le coenzyme Q10 (CoQ10) et le cytochrome C fixé à la membrane. Le transfert de protons et d'électrons est progressif et fragmenté à travers dix couples rédox, qui interviennent dans un ordre déterminé par leur potentiel standard d'oxydo-réduction. Le flux d'électrons passe du couple le plus réducteur vers le plus oxydant, du potentiel redox le plus négatif vers le plus positif.

Le transfert de la paire d'électron du NADH,H^+ commence au niveau du complexe I (NADH déshydrogénase), puis chemine via le CoQ10, le complexe III (Coenzyme Q déshydrogénase), le cytochrome c et pour finir via le complexe IV (cytochrome c oxydase) jusqu'à l'oxygène qui sera accepteur final d'électrons en étant réduit en H_2O. Le transfert d'électrons du $FADH_2$ est de plus faible énergie et s'initialise au niveau du complexe II (succinate déshydrogénase). Le cheminement des électrons est ensuite identique à celui suivi par ceux du NADH. L'oxydation du NADH,H^+ génère trois molécules d'ATP contre deux pour le $FADH_2$.

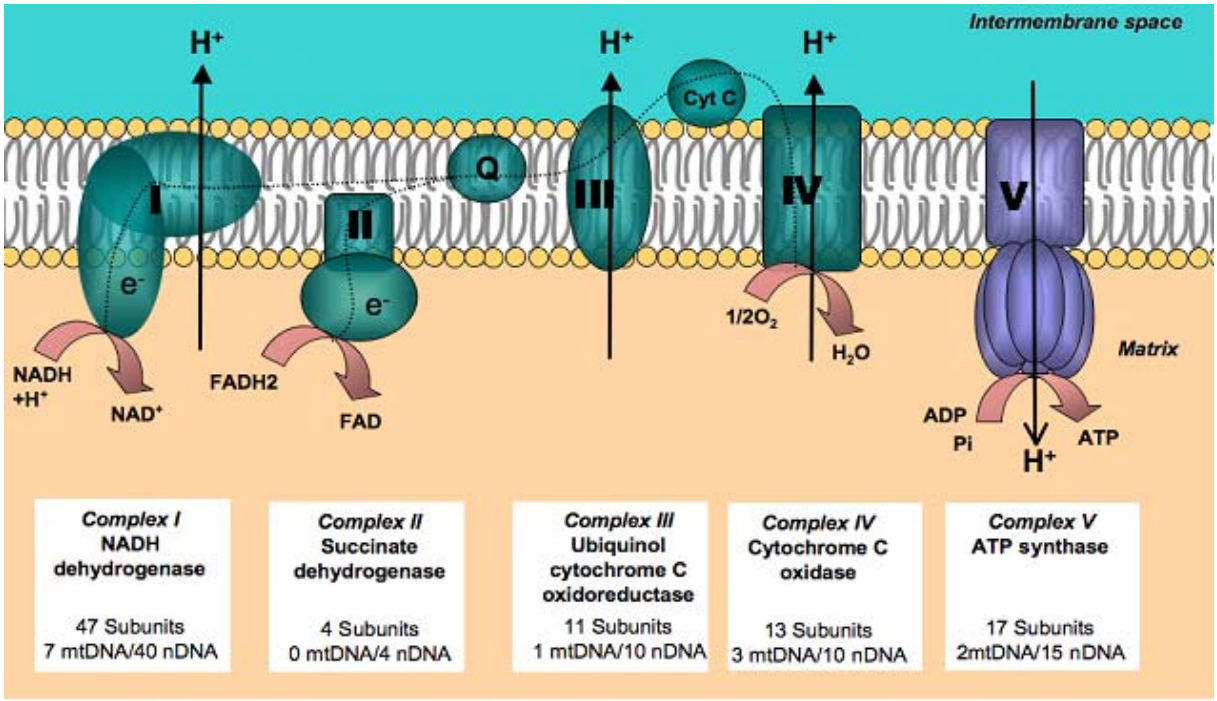


Figure 14 : Schématisation de la chaîne respiratoire avec ses différents complexes la constituant. *(Source : Bellance, 2009)*

L'énergie des transferts permet aux complexes I, III et IV de fonctionner comme des pompes à protons, créant un gradient électrochimique de protons. Les protons éjectés cherchent à retourner dans la matrice, mais étant donné l'imperméabilité de la membrane interne, ils sont obligés de passer par le complexe V (ATP-synthase), qui convertit cette entrée en énergie chimique par la phosphorylation de l'ADP. L'ATP ainsi formé se retrouve dans la matrice mitochondriale. Pour qu'il soit disponible dans le cytosol pour les myofilaments ou les ATPases sarcoplasmiques lors de la contraction, il est échangé contre de l'ADP vers l'espace inter-membranaire, grâce à l'ADP/ATP translocase ou ANT (Adénine Nucléotide Transférase). Les charges sont équilibrées grâce à l'action d'une phosphatase-translocase qui fait entrer en parallèle un proton et un ion phosphate.

Les muscles oxydatifs à activité soutenue tels que les muscles posturaux (ex : soléaire) et le myocarde doivent en permanence ajuster la production d'énergie à la demande. Plusieurs théories ont été proposées pour comprendre la régulation des flux énergétiques entre les mitochondries et les sites d'utilisation (Saks *et al.*, 2012). Ainsi, la régulation de la chaîne respiratoire pourrait dépendre d'un flux suffisant en substrats de l'ATP synthétase (ADP, Pi) et ceux de la chaîne des transporteurs d'électrons (O2, $NADH,H^+$). Des facteurs cytosoliques sensibles aux variations du travail cellulaire comme le calcium pourraient aussi servir de signal pour stimuler la respiration (Balaban, 1990; Brown, 1992). En conséquence, lors de rapports $NAD^+/NADH,H^+$ et ATP/ADP+Pi élevés dans une cellule au repos, l'activité de la chaîne respiratoire tourne au ralenti, mais elle peut être stimulée par la diminution de ces rapports lors d'un effort.

Toutefois, le flux de consommation d'oxygène peut être contrôlé par l'activité respective des différents complexes de la chaîne respiratoire, qui est variable d'un tissu à un autre (Letellier *et al.*, 1993; Rossignol *et al.*, 2000).

En résumé, les systèmes de production d'énergie (sous forme d'ATP) au sein des muscles striés sont extrêmement adaptés à la fonction des muscles. Alors que le métabolisme du muscle squelettique rapide est essentiellement glycolytique anaérobie, celui des muscles lents et cardiaque est essentiellement oxydatif aérobie.

De plus, la capacité aérobie d'un muscle est en grande partie dépendante des capacités de production d'ATP, mais elle implique une communication efficace entre les compartiments cellulaires de production et d'utilisation d'énergie.

4. *Transferts énergétiques dans les cellules musculaires striées*

Dans les myofibrilles, lors de la contraction, le stock d'ATP est utilisé. Il se produit alors un déséquilibre dans le rapport ATP/ADP. Cet équilibre entre la consommation et la production d'énergie est restauré par la régénération et le transfert intracellulaire rapide de l'énergie sous l'action de systèmes enzymatiques spécialisés tels que la créatine kinase (CK) (Wallimann *et al.*, 1992) et l'adénylate kinase (AK) (Dzeja & Terzic, 2003) (**Figure 15**), ou par la canalisation directe des nucléotides adenyliques (Kaasik *et al.*, 2001).

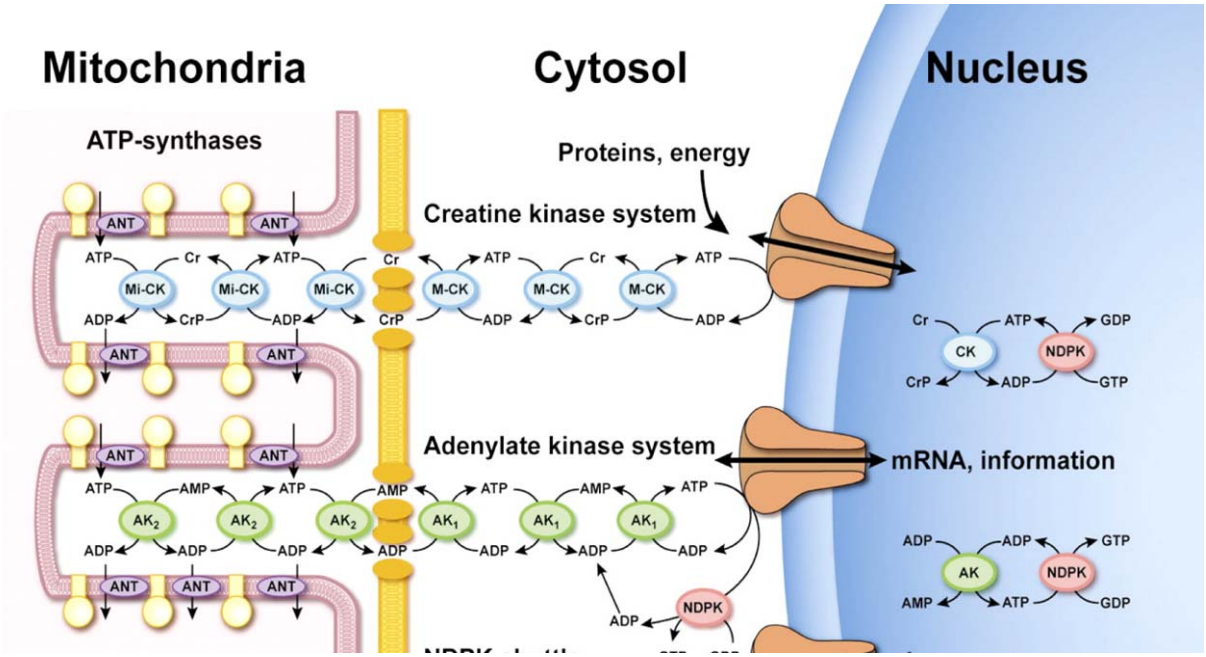
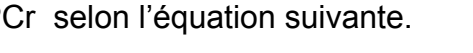


Figure 15 : Présentation des différents systèmes de transfert énergétique AK & CK. *(Modifée d'après, Source : de Dzeja & Terzic, 2003)*

4.1-Le système créatine kinase (CK)

Le contrôle et le transfert d'énergie des cellules musculaires sont assurés en grande partie par la CK, mais son expression et son activité fonctionnelle sont variables en fonction des tissus (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Cette enzyme catalyse de manière réversible la conversion d'ADP en ATP, via le transfert de liaison riche en énergie provenant de la PCr selon l'équation suivante.



ADP + PCr + H+ ⇄ ATP + Cr

Il existe quatre monomères de CK (~41kDa) localisés au niveau des sites de production et d'utilisation d'énergie dans les muscles striés : Les sous-unités M (*Muscle*), B (*Brain*) forment des dimères MM-CK, MB-CK et BB-CK. L'isoenzyme MM-CK est principalement cytosolique et est également associée au sarcolemme, aux myofilaments et au réticulum endoplasmique, à proximité de la pompe NA+/K+ du sarcolemme, la myosine-ATPase et la CA2+-ATPase du RS respectivement (Minajeva *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 1990; Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Les deux sous-unités mitochondriales (mi-CK) situées sur la face externe de la membrane mitochondriale interne (Wallimann *et al.*, 1992) sont exprimées soit ubiquitairement et majoritairement dans les muscles lisses et le cerveau (mi-CKu), soit spécifiquement dans les muscles striés (mi-CKs). On retrouve la mi-CK sous deux formes dimérique (~80kDa) ou octamérique (~330kda) (Fritz-Wolf *et al.*, 1996; Payne & Strauss, 1994; Wallimann *et al.*, 1992)).

Le système CK peut remplir différents rôles selon l'activité cellulaire et le type de métabolisme prédominant (**Figure 16**) (Saks *et al.*, 1996; Wallimann *et al.*, 1992). Il peut agir en tant que navette en transférant l'énergie entre les sites de production et d'utilisation (Joubert *et al.*, 2002; Saks *et al.*, 1994; Wallimann *et al.*, 1992), par exemple dans le myocarde, ou comme système de tampon temporel et spatial de l'ATP en permettant la mobilisation rapide de l'énergie dans tous les compartiments cellulaires. Lors des contractions musculaires, des disparités d'énergie peuvent apparaître, la CK limite ces effets en contrôlant localement les concentrations en ADP et ATP et en mettant en relation ces pools d'ATP localisés aux différents sites d'utilisation et de production de l'énergie. Elle stimule également la respiration en recyclant les H^+ produits au niveau des sites d'utilisation de

l'énergie, ce qui contribue au maintien des activités ATPasiques et du gradient électrochimique mitochondrial.

Dans le muscle rapide, le système CK permet de maintenir un niveau élevé des réserves à haute énergie sous forme de PCr, tout en contrôlant la concentration en ATP. La fonction de tampon spatio-temporel est nécessaire lors d'une demande intense, rapide et brève de la contraction musculaire. La fonction navette du système CK ne fonctionne pas, car la respiration mitochondriale est sous la dépendance de l'ADP cytosolique et non celui produit localement par la mi-CK (Veksler *et al.*, 1995).

Dans les muscles lents et le muscle cardiaque, l'organisation cellulaire et la présence de nombreuses mitochondries permettent un transfert d'énergie facilité par le système CK, et une adéquation rapide entre utilisation et production d'énergie, sans variation notable des concentrations cytosoliques des produits et des substrats, pour assurer une contractilité soutenue. Cette spécialisation des flux énergétiques est rendue possible par une faible perméabilité de la mitochondrie à l'ADP cytosolique, ainsi que par une forte activité de la CK mitochondriale dans ces muscles.

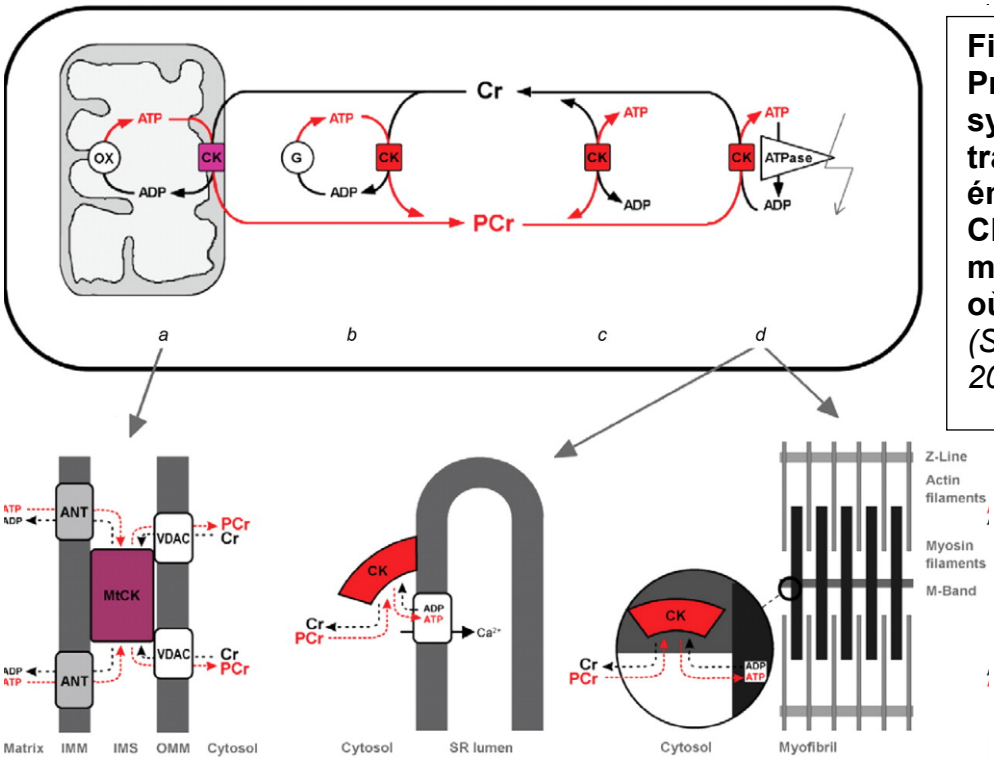


Figure 16 : Présentation du système de transfert énergétique CK–PCr et des micro-domaines où agit la CK. *(Source : Saks, 2006)*

4.2-Les adénylates kinases (AK)

L'AK constitue un autre système de transfert d'énergie important dans la synthèse et l'homéostasie des nucléotides adényliques, mais aussi lors de la contraction musculaire (Savabi, 1994), via un couplage fonctionnel avec les sites producteurs et utilisateurs d'énergie (Dzeja & Terzic, 2003). Elle assure également un rôle dans la modulation du potentiel membranaire par le biais de la transduction du signal métabolique par l'AMP. Elle catalyse réversiblement la réaction suivante :

Diverses isoformes de l'AK sont exprimées différemment selon les tissus considérés et sont localisées dans différents compartiments subcellulaires (Tanabe *et al.*, 1993). Les tissus à forte demande énergétique tels que le muscle squelettique lent et le myocarde sont particulièrement riches en isoforme AK1. L'AK1 est localisée dans le cytosol, associée aux myofilaments (Savabi, 1994), ou au sarcolemme à proximité des canaux potassiques sensibles à l'ATP dont il régule la fonction (Elvir-Mairena *et al.*, 1996). Les autres isoformes AK2 et AK3 sont moins abondantes dans les muscles (~10 % de l'activité totale) et sont respectivement confinées dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

4.3-Les autres systèmes et la canalisation directe entre organites

Les systèmes CK et AK ne sont pas les seuls systèmes cellulaires assurant la fonction de transfert d'énergie dans les compartiments (Dzeja & Terzic, 2003), et particulièrement dans les cardiomyocytes où les différents compartiments subcellulaires sont en contact. La proximité des mitochondries, du RS et des myofilaments favorise le transfert direct des nucléotides entre les organites au niveau de micro-domaines à l'interface de ces organites (Kaasik *et al.*, 2001). Cette canalisation directe de l'ATP et de l'ADP au sein de micro-domaines participe au maintien du rapport ATP/ADP élevé au voisinage des ATPases. Cette canalisation directe dépend de l'agencement entre les mitochondries et les autres organites (Wilding *et al.*, 2006), et donc de l'architecture cellulaire.

Des enzymes de la glycolyse et des nucléosides mono-et diphosphate kinases également localisées à différents sites subcellulaires (Dzeja *et al.*, 2004) peuvent participer à l'homéostasie énergétique cellulaire.

Tous ces systèmes de transfert énergétiques sont différents dans les diverses fibres musculaires et adaptés à chaque fonction musculaire. Ils contribuent au maintien du statut énergétique cellulaire dans des conditions normales et pathologiques. L'architecture cellulaire et l'agencement des organites entre eux jouent un rôle dans l'optimisation de ces transferts énergétiques, et leur altération peut donc diminuer l'efficience énergétique de la cellule.

Chapitre III : PLASTICITE MITOCHONDRIALE

Nous l'avons vu, la mitochondrie joue un rôle important dans la production de l'énergie dans les cellules musculaires striées. Mais elle est aussi impliquée dans de nombreuses autres fonctions cellulaires qui nécessitent l'intégrité et un fonctionnement optimal de cet organite, ainsi qu'une capacité à s'adapter en fonction des besoins cellulaires.

Dans ce troisième chapitre, les phénomènes qui assurent son 'contrôle-qualité', qui passent notamment par des mécanismes de biogénèse et de dynamique mitochondriale, seront principalement décrits.

1. Généralités sur la mitochondrie

1.1-Structure

Les mitochondries possèdent une certaine plasticité qui leur permet d'acquérir des formes diverses en fonction du type cellulaire (Kuznetsov *et al.*, 2009). Il est communément décrit dans la littérature que ces organites ont une dimension moyenne de 0,5-2 µm de long pour 0,5 µm de largeur lorsqu'ils sont isolés *(Frey & Mannella, 2000)* (**Figure 17**). Toutefois, il est assez rare de les observer sous cette forme/dimension de par leur propriété dynamique.

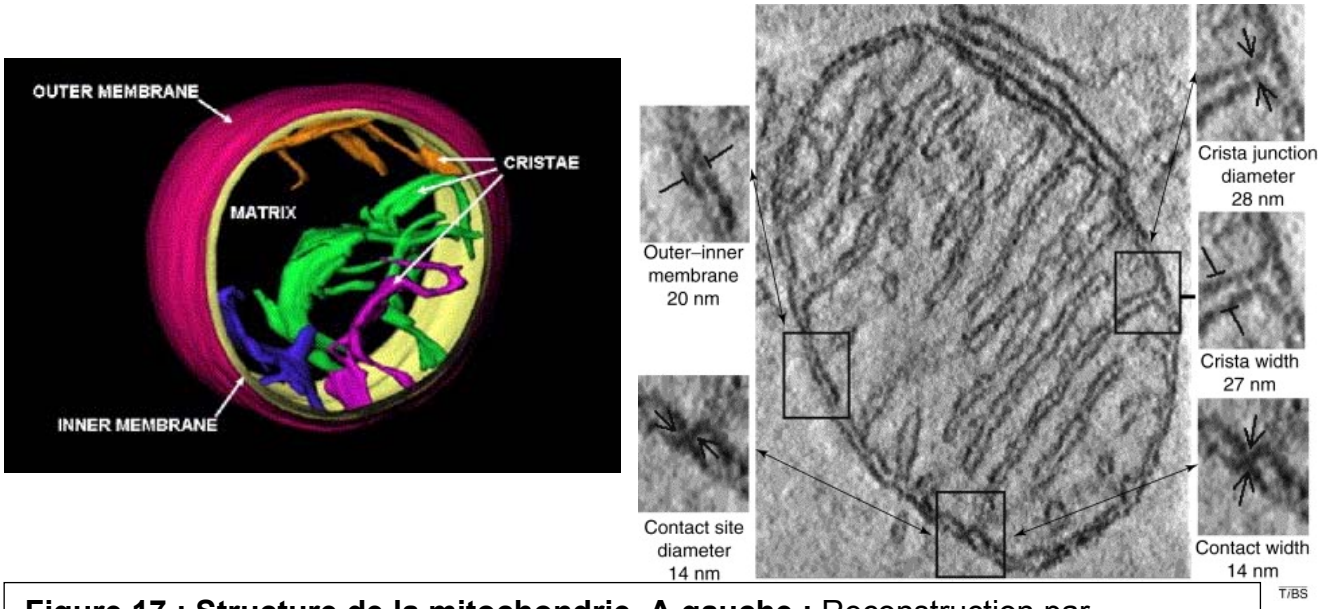


Figure 17 : Structure de la mitochondrie. A gauche : Reconstruction par tomographie de l'organisation interne d'une mitochondrie **; A droite :** visualisation par microscopie électronique des différents compartiments mitochondriaux.
(Source: Mannella, 2006 et Frey & Mannella, 2000).

Les mitochondries se composent de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux différents : le milieu extra-mitochondrial, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Ces membranes diffèrent par leur composition, leur activité et leurs fonctions.

La membrane externe délimite la mitochondrie du cytoplasme et est perméable aux molécules de poids moléculaire inférieur à 10 kDa. La présence de la porine VDAC (*Voltage-dépendant anion chanel*) joue un rôle important dans la régulation de la fonction mitochondriale (Xu *et al.*, 1999), car c'est par ce pore que transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale (entre autres l'ADP, l'ATP, le Pi, la Cr, la PCr). Cette porine serait aussi responsable du transport bidirectionnel du Ca^{2+} (Gincel *et al.*, 2001).

L'espace intermembranaire contient plusieurs kinases utilisant l'ATP telles que la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) (Wallimann *et al.*, 1992) et l'adénylate kinase (AK). Cette localisation leur permet d'avoir un accès privilégié à l'ATP généré dans la matrice mitochondriale et de fournir localement de l'ADP pour stimuler la respiration.

La membrane interne, organisée avec des crêtes, est de perméabilité réduite et sélective. Elle constitue une barrière maintenant un gradient de concentration d'ions et de charges qui est utilisé dans la phosphorylation oxydative pour produire l'ATP. Elle contient les complexes de la chaîne respiratoire, le complexe ATP synthétase et de nombreux systèmes de transport spécifiques pour les échanges d'ions (Ca^{2+}, K^+, Na^+, H^+) et de métabolites (acides aminés, acides gras, hydrate de carbone et de Pi).

La matrice mitochondriale contient le matériel génétique mitochondrial, ainsi que les enzymes participant aux différentes voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, l'oxydation des acides gras et le cycle de l'urée.

1.2-Fonctions

Les mitochondries sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires vitales. Le rôle central pour les mitochondries est l'approvisionnement des cellules en énergie par la phosphorylation oxydative. Mais elles sont aussi impliquées dans de nombreuses réactions cataboliques et anaboliques, y compris le cycle de l'acide

citrique, la β-oxydation des acides gras et la biosynthèse de l'hème, de certains phospholipides et d'autres métabolites (Westermann, 2010).

La mitochondrie, en dehors de son rôle dans ces différentes voies biochimiques, participe aussi à l'homéostasie ionique de la cellule (Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, H^{+}) (Duchen, 1999), l'homéostasie des lipides et des hydrates de carbone, la synthèse d'hormones stéroïdiennes et de l'hème, mais aussi la régulation du pH intracellulaire, le turnover des neurotransmetteurs, et le processus de thermogénèse. De plus, elles participent aux processus de développement et de vieillissement (Westermann, 2010).

Enfin, les mitochondries sont considérées comme étant un carrefour de la vie de la cellule, car elles sont des régulateurs clés de la mort cellulaire programmée (apoptose) (Desagher & Martinou, 2000). L'apoptose est mécanisme physiologique indispensable à l'homéostasie de l'organisme. Il participe au renouvellement cellulaire et à l'élimination des cellules défectueuses et potentiellement dangereuses pour l'organisme.

L'espace intermembranaire mitochondrial contient de nombreuses protéines impliquées dans la cascade apoptotique comme le cytochrome c et l'AIF. Ces protéines proapoptotiques sont libérées par deux voies métaboliques suite à un stimulus. La première est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 et aboutit à la formation de larges canaux au sein de la membrane mitochondriale externe. La seconde repose sur la rupture de la membrane mitochondriale externe consécutive au gonflement mitochondrial, lui-même provoqué par l'ouverture du canal de la membrane mitochondriale interne dénommé PTP (*Permeability transition pore*) (Zoratti & Szabo, 1995).

Pour assurer toutes ces fonctions, et répondre à différents stress physiologiques et pathologiques, les mitochondries des cellules cardiaques et musculaires peuvent s'adapter grâce à l'activation de la biogénèse mitochondriale. Cette plasticité mitochondriale est finement régulée par de nombreuses protéines et voies de signalisation que je vais maintenant vous présenter.

2. Biogénèse mitochondriale

2.1-Introduction

En raison de leur origine bactérienne, les mitochondries sont des organites semi-autonomes qui disposent de leur propre génome (ADN_{mt}) et machinerie de synthèse protéique. Chez les mammifères, l'ADN_{mt} est organisé en structures nucléoïdes , répartis dans l'ensemble de la matrice mitochondriale (Legros *et al.*, 2004). L'ADN_{mt} est circulaire, double-brin et multicopie (10^3-10^4 copies/cellule). Ce génome est dégénéré puisqu'il ne code plus que pour environ 1% des protéines mitochondriales totales qui correspondent à 13 protéines des sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire. Les mitochondries sont donc les produits de la transcription et la traduction de gènes mitochondriaux, mais surtout de gènes nucléaires qui contribuent à la synthèse de plus de 1500 protéines différentes (Calvo *et al.*, 2006) nécessaires pour la fonction mitochondriale et le maintien du génome mitochondrial. Etant donnée l'origine mixte de cet organite, la synthèse des protéines mitochondriales nécessite donc une étroite coordination de l'expression entre le génome mitochondrial et nucléaire, et un adressage et un import correct, permettant une maturation et un assemblage efficace des protéines codées. Ces processus complexes sont finement régulés par l'intervention de divers mécanismes de régulation.

Le terme de biogénèse mitochondriale est utilisé pour décrire à la fois la formation des mitochondries au cours du cycle cellulaire et la phylogenèse et l'ontogenèse des mitochondries. La biogenèse mitochondriale est le processus clef régulant et contrôlant la masse et la fonction mitochondriale, par lequel de nouvelles mitochondries sont formées pour permettre leur renouvellement ou une synthèse additionnelle dans la cellule (Hood, 2001).

L'ensemble des études tendent à prouver que la biogenèse mitochondriale résulte de la croissance et de la division de mitochondries préexistantes, indépendamment du cycle cellulaire. La néosynthèse de mitochondries débute avec une augmentation de la surface membranaire à l'aide d'un recrutement accru en phospholipides dans les membranes mitochondriales, et se poursuit par la synthèse et l'adressage des différentes protéines dans l'ensemble des compartiments submitochondriaux. La mitochondrie ayant ainsi doublée sa masse, elle se scinde en

deux pour pouvoir produire deux mitochondries-filles, par des processus de fission qui seront abordés dans la partie suivante (**Figure 18**).

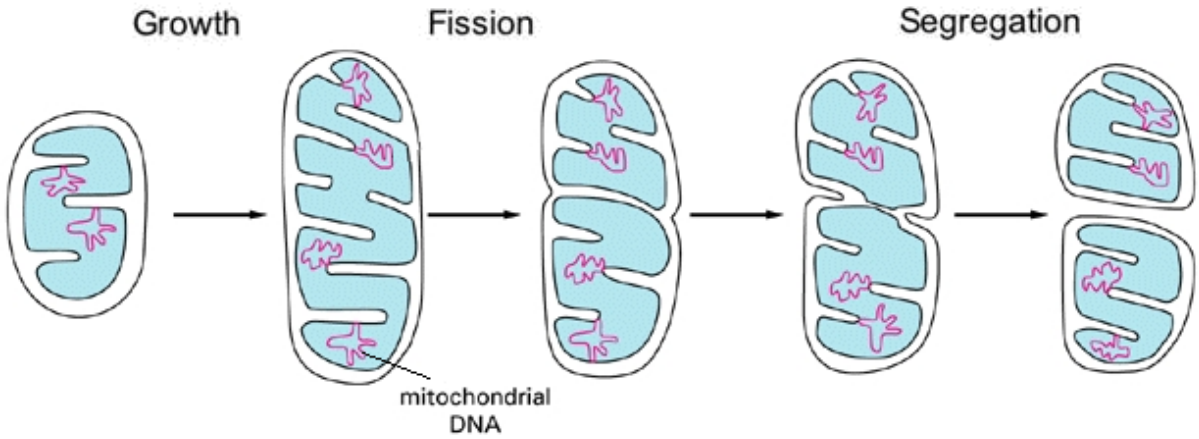


Figure 18 : Etapes de la biogénèse mitochondriale. *(Modifiée d'après, Source: Alberts B et al, Molecular Biology of the Cell-3rd edition, N Y: Garland Science; 1994)*

La biogénèse mitochondriale est ainsi un processus complexe qui doit être finement contrôlé en fonction des conditions physiologiques, et qui nécessite une coordination étroite entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial étant donné l'origine mixte des protéines mitochondriales. Toutefois, les principaux mécanismes d'adaptation intervenant dans la régulation coordonnée de l'expression du génome mitochondrial et nucléaire sont encore assez mal connus (Ventura-Clapier *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2012).

2.2-Voies de signalisation induisant la biogénèse mitochondriale

Une cellule, en fonction de sa spécificité fonctionnelle, est capable d'adapter ses capacités énergétiques et sa fonction mitochondriale. En réponse à de multiples signaux cellulaires comme le développement, l'activité physique, l'exposition à certains facteurs (hormonaux, de croissance), une restriction calorique, l'exposition au froid et certains traitements médicamenteux (Hock & Kralli, 2009), une augmentation des capacités énergétiques va être nécessaire, ce qui va provoquer une activation de la biogénèse mitochondriale.

Les publications actuelles suggèrent que la majorité des stimuli extracellulaires converge, via des voies de signalisation spécifiques, vers un régulateur majeur de la biogenèse, PGC-1*α* (*Peroxisome proliferators-activated*

receptor gamma coactivator-1 α), mais dans certains cas, la biogénèse peut tout de même s'opérer en l'absence de ce co-activateur de facteurs transcriptionnels. PGC-1*α* permet de moduler les différentes cascades de signalisation, depuis la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial et nucléaire, jusqu'à l'expression des facteurs de transcription nucléaire intervenant dans le métabolisme oxydatif, la réponse au stress oxydant, et l'expression de protéines de la chaîne respiratoire (**Figure 19**).

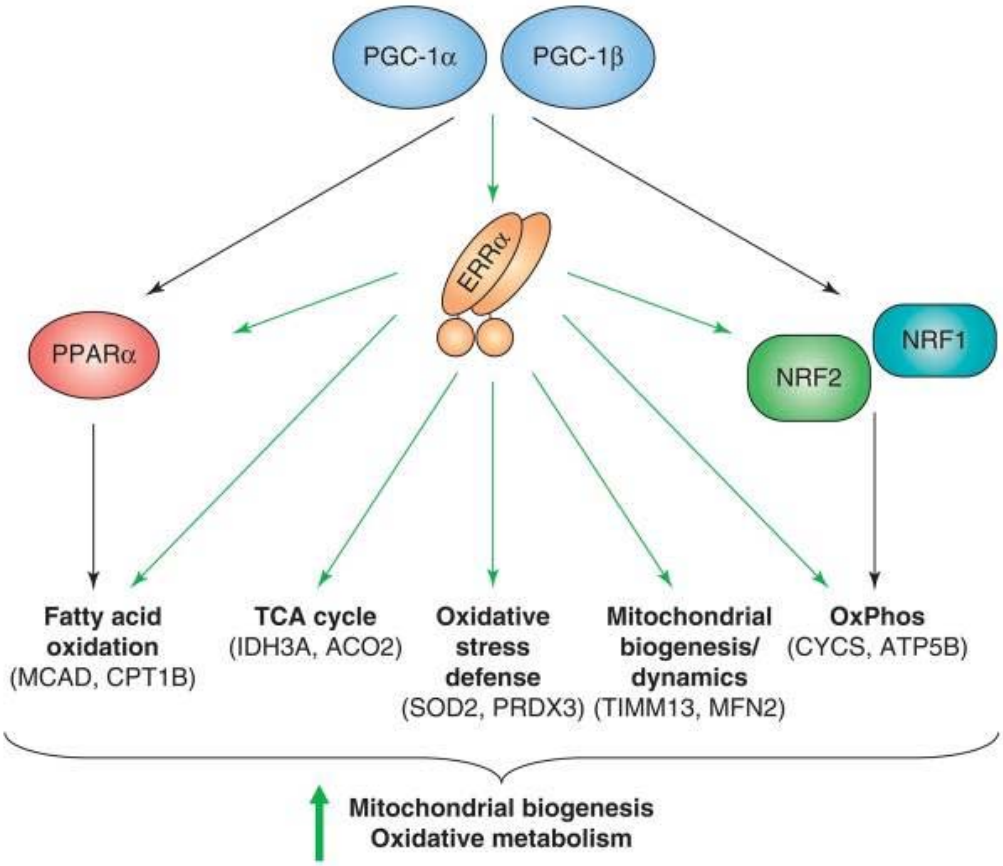


Figure 19 : Régulation coordonnée du génome mitochondrial & nucléaire. *(Source : Villena & Kralli, 2008)*

2.2.a-Réplication, transcription, traduction des génomes

Au niveau de l'ADN mitochondrial, la transcription est sous le contrôle du facteur mitochondrial TFAM (*mitochondrial transcription factor A*). Ce facteur d'origine nucléaire participe au maintien de la stabilité de l'ADN_{mt} (Hood *et al.*, 2006) et s'associe à l'action d'autres facteurs de transcription que sont TFB1M, TFB2M (*Human mitochondrial transcription specificity factor* B1 et B2) (Falkenberg *et al.*, 2002) pour réguler le nombre de copie d'ADN_{mt}. TFAM est un activateur clef de l'initiation de la transcription bidirectionnelle et de la réplication du génome

mitochondrial par synthèse d'amorce ARN, en s'associant aux zones promotrices des deux brins d'ADN et à l'ARN polymérase (Shadel & Clayton, 1997). Le contrôle du rapport ARNm/ARNr est assuré par le facteur mTERF (*Mitochondrial transcription termination factor*).

Au niveau de l'ADN nucléaire, la régulation de la transcription se fait par interaction du co-activateur PGC-1α avec différents ligands spécifiques tels que des facteurs de transcription comme NRFs (Nuclear *respiratory factors*), ou bien ceux appartenant à la sous- famille des récepteurs nucléaires ERRs (*Estrogen-related receptors*) ou PPARs (*Peroxisome-proliferator-activated receptors*) (Lin *et al.*, 2005).

2.2.b-Principaux régulateurs de la biogénèse mitochondriale

Les PGC-1s (PGC-1α et PGC-1β) sont fortement présents dans les tissus avec une activité oxydative importante. PGC-1α est un co-activateur de transcription (Wu *et al.*, 1999), qui induit l'expression d'une multitude de gènes en se liant à d'autres facteurs de transcription, car il est incapable de se lier par lui-même à l'ADN. Son expression est en lien direct avec les stimuli de stress externes et la stimulation de la biogenèse mitochondriale (Meirhaeghe *et al.*, 2003). Son activité est aussi associée à son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique (Garnier *et al.*, 2003; Lehman *et al.*, 2000). En tant que facteur important régulant la néoglucogénèse, il participe à la détermination du type de fibres musculaires, à la trans-différenciation des adipocytes et à la sécrétion d'insuline par le pancréas. Son intervention sur le transport du glucose est encore assez mal définie. Situé en amont de la cascade transcriptionnelle, PGC-1α se retrouve impliqué avec NRF-1 et 2 sur le promoteur de Tfam dans la stimulation de l'expression des protéines mitochondriales (Wu *et al.*, 1999), avec PPAR-γ dans la thermogénèse adaptative en contrôlant UCP-I (Puigserver *et al.*, 1998) et UCP-II (Wu *et al.*, 1999). Avec PPAR-α/RXR ou ERR-α, selon les tissus, ils stimulent l'oxydation des acides gras par induction de l'expression de MCAD et CPT-I (Finck, 2007; Vega *et al.*, 2000), mais également la chaîne respiratoire (Scarpulla, 2008).

Les NRFs (NRF-1 et NRF-2) sont des facteurs de transcription nucléaires activés par PGC-1α (Puigserver *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999) qui participent activement à la communication noyau-mitochondrie et à la coordination des deux

génomes, en étant responsables de la stimulation de la transcription de nombreuses protéines mitochondriales d'origine nucléaire (Kelly & Scarpulla, 2004). Ils activent l'expression de certains gènes clés de la croissance cellulaire, via le contrôle de gènes impliqués dans la traduction (eIF2α), de gènes nucléaires nécessaires pour la respiration mitochondriale (ATP synthase β, COX II et IV, cytochrome c (Wu *et al.*, 1999) et pour la réplication et la transcription de l'ADN_{mt}, via l'activation de l'expression des facteurs TFAM, TFB1M et TFB2M. (Gleyzer *et al.*, 2005).

Les ERRs (ERR-α, ERR-β et ERR-γ) sont des récepteurs nucléaires orphelins constitutivement actifs. Ils agissent comme des régulateurs de transcription spécifiques sur des séquences promotrices (ERRE ; *ERR response element*), qu'ils lient sous forme de mono, homo ou hétréo-dimères. Ils présentent également des interactions avec l'œstrogène et TFIIB (qui lie directement les facteurs de transcription et l'ARN polymérase). ERR-α est exprimé ubiquitairement, et constitue la forme majoritaire. Son action est multiple, il contrôle à la fois les gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Wu *et al.*, 1999), la néoglucogenèse (Yoon *et al.*, 2001), la phosphorylation oxydative via son rôle sur les cibles des NRFs (Mootha *et al.*, 2004) et aussi le métabolisme des acides gras (internalisation / production et transfert d'énergie) (Huss *et al.*, 2004).

Les PPARs (PPAR-α, γ et β/δ) (Berger & Moller, 2002) sont des récepteurs nucléaires qui activent la transcription de leurs gènes cibles en se liant, sous forme d'hétérodimères avec les récepteurs RXR *(Retinoid X receptor)*, aux séquences promotrices (PPRE ; *PPAR response element*). Ils jouent un rôle important dans le métabolisme des acides gras, l'inflammation et le développement embryonnaire. Le mode d'action de ces protéines inductibles est le recrutement de complexe de remodelage de la chromatine et de facteurs initiant et activant la transcription (Pol II). PPAR-α est exprimé dans les tissus utilisant préférentiellement les acides gras et participe à la régulation des gènes impliqués dans les transports membranaires des acides gras au niveau cellulaire (FAT) et au niveau mitochondrial (CPT-I), ainsi que les gènes responsables de la β-oxydation (MCAD, LCAD). De même, PPAR-β/δ, majoritaire dans le muscle squelettique, lecerveau, le tissu adipeux et la peau, est nécessaire à l'homéostasie lipidique et participe à l'activation des processus glycolytiques (Burkart *et al.*, 2007).

2.3-Modulation des voies de signalisation

Étant l'intégrateur des signaux externes, PGC-1α subit l'action d'une multitude de facteurs, régulant ainsi son expression et son activité. Ces voies de signalisation responsables de sa modulation commencent seulement à être appréhendées (pour revue, voir (Ventura-Clapier *et al.*, 2008)).

2.3.a-Régulation transcriptionnelle

Différentes voies de signalisation ont été décrites comme intervenant dans la régulation transcriptionnelle de PGC-1α. Les plus largement décrites dans la littérature sont celles intervenant dans la réponse à l'entraînement physique. En effet, une activité d'endurance provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, qui stimule l'activation des protéines dépendantes du calcium comme la calcineurine A (CnA) et la Calcium-calmoduline kinase (CamK). CnA active entre autres le promoteur de PGC-1α. De même, la CaMK participe à la régulation du métabolisme du glucose et active le promoteur de PGC-1α (Schaeffer *et al.*, 2004) via l'activité transcriptionnelle du CREB (*cAMP response element-binding*) en se fixant sur les éléments de réponse (CRE) du promoteur de PGC-1α (Akimoto *et al.*, 2004). En conclusion, la majorité de ces voies convergent vers une augmentation de l'expression de PGC-1α. Toutefois, la majorité des données découle d'études sur le muscle squelettique et demande à être vérifiée dans les autres tissus (notamment dans le tissu cardiaque).

Cette revue des voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1α n'est évidement pas exhaustive. De nombreuses autres voies ont été mises en évidence tel que l'AMPK (*5' AMP-activated protein kinase*), la protéine kinase B / Akt, qui semble réguler négativement l'expression cardiaque de PGC-1α et PPARα (Cook *et al.*, 2002), mais active ses effecteurs NRF1 et NRF2. Des études récentes (Goldenthal *et al.*, 2004; Irrcher *et al.*, 2003) ont aussi montré que les hormones thyroïdiennes pouvaient contrôler la biogénèse mitochondriale, sans nécessiter forcément PGC-1α.

2.3.b-Régulation post-transcriptionelle de PGC-1α

L'activité de la protéine PGC-1α peut être également régulée par des modifications post-traductionnelles incluant son activation via sa phosphorylation par l'AMPK (Jager *et al.*, 2007), sa déacétylation par SIRT1 (Situine1) (Lin, 2009) et sa méthylation par PRMT1 (*Protein arginine methyltransferase 1*) (Teyssier *et al.*, 2005) ou bien son inhibition par sa SUMOylation (Rytinki & Palvimo, 2009).

2.4-Biogénèse mitochondriale et muscles striés

L'ARNm et la protéine PGC-1α sont enrichis dans les tissus ayant une forte activité oxydative comme dans le cœur (Rimbaud *et al.*, 2009) et les muscles ayant des fibres lentes, à la différence des fibres glycolytiques. L'induction rapide de PGC1α lors d'une demande énergétique accrue, par exemple un exercice d'endurance chez le rat et chez l'Homme (Baar *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2000), est corrélée avec les niveaux de protéines mitochondriales, la masse mitochondriale et la capacité oxydative (Garnier *et al.*, 2003; Lehman *et al.*, 2000). Il permet l'amélioration des performances physiques (Calvo *et al.*, 2008) par l'adaptation des muscles squelettiques, en régulant et coordonnant l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et la modification du profil métabolique de fibres vers une utilisation plus importante des AG chez la souris.

Dans le muscle cardiaque, de nombreux résultats diffèrent sur l'impact d'un exercice d'endurance. Certaines études démontrent une augmentation de l'expression de PGC-1 α (Watson *et al.*, 2007), qui s'accompagne d'une modification des activités enzymatiques mitochondriales et des capacités oxydatives (Coleman *et al.*, 1988; Stuewe *et al.*, 2000), d'autres études ne montrent pas ces effets (Murakami *et al.*, 1995; Terblanche *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2007). Il semble que dans le cœur, la biogenèse mitochondriale puisse être stimulée en fonction des besoins de l'organisme, mais jamais en excès comme cela est le cas dans les muscles squelettiques, et en adéquation avec l'augmentation de la masse cardiaque observée lors de ce type de stress physiologique (Rimbaud *et al.*, 2009).

En résumé, bien que les acteurs et les systèmes d'intégration des signaux soient similaires, l'adaptation des muscles squelettique et cardiaque en réponse à un exercice semble différente. La biogénèse mitochondriale ne joue donc pas le même rôle dans ces deux muscles, et des stratégies différentes se mettent en place en réponse à un stress.

Il ne faut pas perdre de vue que la stimulation de la biogenèse mitochondriale n'est rendue possible que lorsque les processus de la dynamique mitochondriale sont opérationnels. En effet, une mitochondrie ne peut se multiplier sans ses capacités de fusion-fission (voir Figure-(20) résumé suivante). La dynamique mitochondriale peut donc être un des processus primordiaux pour permettre l'adaptation d'un muscle à un stress.

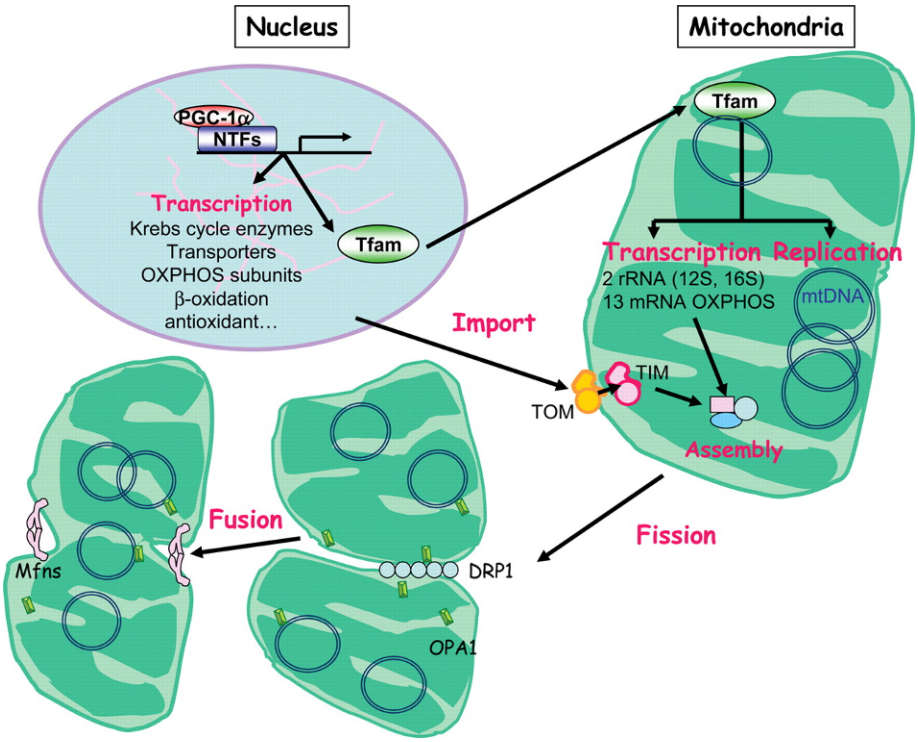


Figure 20 : Schématisation du rôle de la dynamique mitochondriale dans la biogénèse mitochondriale. *(Source : Ventura-Clapier, 2008)*

3. Dynamique mitochondriale

3.1-Introduction

Le terme de dynamique mitochondriale regroupe les notions de motilité, qui permet la distribution des mitochondries dans les cellules, ainsi que les mécanismes de contrôle de la morphologie mitochondriale par les processus de fusion-fission. Le processus de dynamique mitochondriale permet de répondre aux fortes demandes énergétiques de certaines zones de la cellule, en relocalisant et répartissant les mitochondries dans ces zones, à l'aide du trafic intracellulaire. Le mouvement et la répartition des mitochondries sont contrôlés par des protéines comme MULAN (*Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFκB*), qui relie directement NFκB et la régulation de la morphologie et la distribution mitochondriale (McBride *et al.*, 2006), ou bien par la protéine Miro *(Mitochondriale-Rho-GTPase)* (Guo *et al.*, 2005) une Rho GTPase qui interviendrait aussi probablement dans les processus régulant la morphologie mitochondriale (Fransson *et al.*, 2006; Saotome *et al.*, 2008).

La forme du réseau mitochondrial correspond à un équilibre dynamique entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries. Une prédominance de la fusion favorise la génération de mitochondries sous la forme d'un réseau de filaments plus ou moins longs et interconnectés (du grec *mitos*, signifant « fil »). À contrario, si la fission est prépondérante, les mitochondries apparaissent sous forme de nombreux fragments mitochondriaux isolés les uns des autres (du grec *chondros, «* grain ») (Westermann, 2010). Les cycles de fusion/fission sont contrôlés selon les conditions et les besoins physiologiques (Hom & Sheu, 2009a; Jazbutyte, 2010; Liesa *et al.*, 2009; Ong & Hausenloy, 2010; Soubannier & McBride, 2009). Une illustration possible est que l'on retrouve fréquemment de grands réseaux mitochondriaux interconnectés dans les cellules métaboliquement actives (Skulachev, 2001) et des mitochondries fragmentées dans les cellules quiescentes (Collins *et al.*, 2002). Toutefois, cette hypothèse n'est pas valable dans le muscle cardiaque, car les cardiomyocytes sont métaboliquement très actifs, mais disposent d'un réseau mitochondrial fragmenté (Kuznetsov *et al.*, 2009).

La structure intracellulaire du muscle cardiaque et squelettique étant hautement organisée et très dense, la motilité mitochondriale y est limitée (Beraud et al., 2009; Vendelin et al., 2005). Concernant les mécanismes de fusion-fission, peu d'études avaient été effectuées sur les cellules musculaires striées lorsque j'ai commencé ma thèse, même si depuis, de nombreux laboratoires ont commencé à s'y intéresser.

3.2-Protéines impliquées dans la fusion-fission mitochondriale

Initialement, les principales protéines impliquées dans les phénomènes de fusion et de fission mitochondriales ont été identifiées chez la levure (**Tableau 3**).

Yeast protein*	Mammalian protein*	Proposed function
Core components of the fusion machinery		
Fzo1	MFN1 and MFN2‡	Outer membrane fusion
Mgm1	OPA1	Inner membrane fusion
Ugo1	Unknown	Outer membrane fusion and linking of Fzo1 and Mgm1
Core components of the fission machinery		
Dnm1	DRP1 (DLP1)	Outer membrane division
Fis1	FIS1	Outer membrane receptor for recruitment of Dnm1 or DRP1
Mdv1 and Caf4‡	Unknown	Adaptor for Dnm1 binding to Fis1 and nucleator for Dnm1 oligomerization
Unknown	MFF	Putative alternative DRP1 recruitment factor
Accessory components of fusion and fission		
Pcp1 (Rbd1 and Mdm37)	PARL	Processing of Mgm1 or OPA1
Unknown	Intermembrane space and matrix AAA proteases	Processing of OPA1
Unknown	OMA1	Processing of OPA1
Num1	Unknown	Cell cortex anchor with Dnm1
Mdm36	Unknown	Formation of Num1–Dnm1 cell cortex anchor

Tableau 3 : Protéines de la dynamique mitochondriale chez la levure et les mammifères. *(Source : Westermann, 2010)*

FZO (*Drosophilia fozzy onion*) fut le premier médiateur caractérisé en 1997 (Hales & Fuller, 1997). Grâce aux nombreuses études menées ces dernière années, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes de fusion et de fission sont de mieux en mieux caractérisés chez les mammifères. En effet, en plus des protéines principalement décrites dans la littérature (MFN1, MFN2, OPA1, FIS1, DRP1),

d'autres facteurs commencent à être également proposés comme intervenant dans les processus de régulation de la dynamique mitochondriale (pour revue, (Chan, 2006; Liesa *et al.*, 2009)).

3.2.a-La fission mitochondriale : rôle de FIS1 et DRP1

Le processus de fission se produit en deux étapes (**Figure 21**), une étape de constriction des membranes internes pour créer deux matrices indépendantes, puis une étape d'invagination / constriction des membranes externes, aboutissant à la production de deux mitochondries-filles. La fission mitochondriale est probablement coordonnée avec les autres processus cellulaires. Car les mitochondries filles contiennent au moins un nucléoïde mitochondrial, même dans des cellules dont le réseau est très fragmenté (Legros *et al.*, 2004; Margineantu *et al.*, 2002). La synchronisation ou la régulation conjointe de la fission des mitochondries au cycle cellulaire est encore mal connue. Les mitochondries seraient fragmentées avant la division cellulaire, afin de faciliter leur ségrégation (Barni *et al.*, 1996; Margineantu *et al.*, 2002).

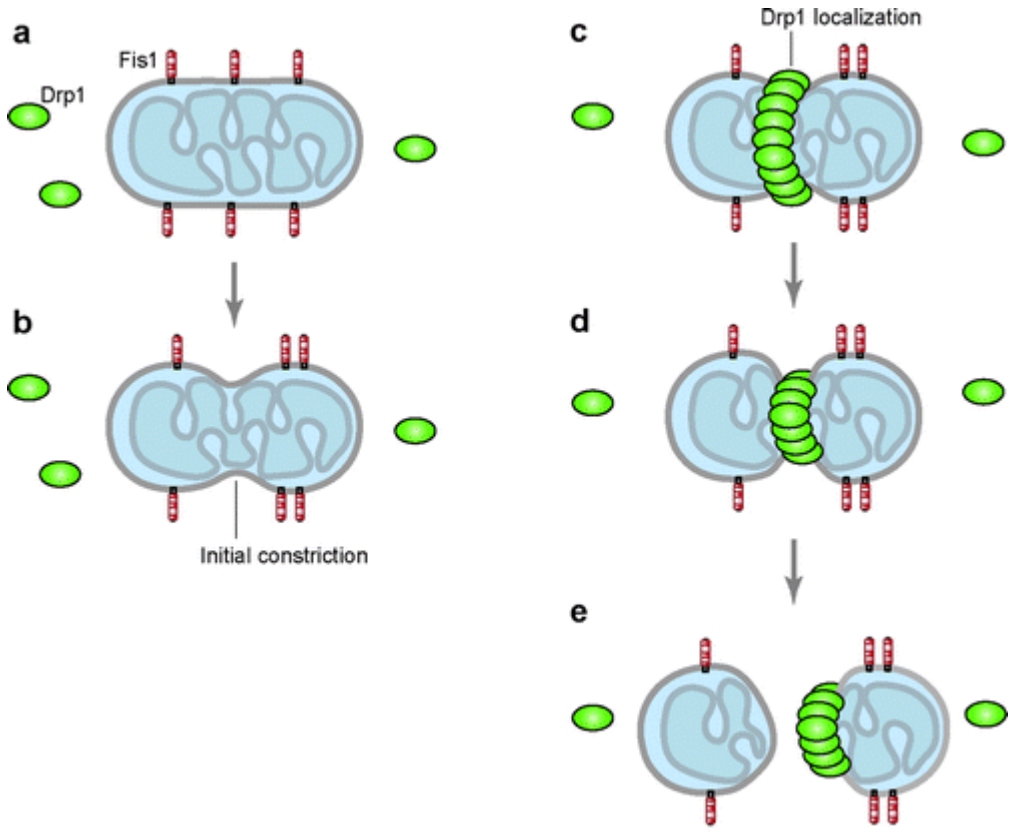


Figure 21 : Mécanismes moléculaires de la fission mitochondriale par les protéines Fis1 et DRP1. *(Source : Chan, 2006)*

Chez les mammifères, les composants majeurs de la fission identifiés sont DRP1 (*Dynamin-related protein 1*) et FIS1 (*Fission protein 1*) (James *et al*., 2003; Smirnova *et al*., 2001; Yoon *et al*., 2003). L'autre composant le plus probable de cette machinerie est MTP18 (*Mitochondrial protein 18kDA*), qui superviserait la distribution de DRP1 et modulerait l'activité de FIS1 (Tondera *et al.*, 2005). De même, le processus de fission ferait également intervenir la protéine Endophilin B1/Bif 1 (Karbowski *et al.*, 2002) en régulant la composition en lipides de la membrane externe mitochondriale (Liesa *et al.*, 2009), Mff (*Mitochondrial fission factor*) (Gandre-Babbe & van der Bliek, 2008) et GDAP1 (*Ganglioside-induced differentiation activated protein 1*). Ce processus de fission n'est pas spécifique à la mitochondrie, les même acteurs interviennent également dans les processus de fission des endosomes et des peroxysomes (Koch *et al.*, 2005).

L'expression de FIS1 est ubiquitaire et similaire entre les différents tissus. Il s'agit d'une petite protéine de 17kDa ne disposant pas d'isoforme, qui est dispersée et intégrée uniformément tout le long de la membrane externe des mitochondries face au cytosol (**Figure 21a**) (Yoon *et al.*, 2003). De par la composition de sa région C-terminale (Hélice α, domaine transmembranaire), son insertion dans la membrane externe mitochondriale est sensible à la composition lipidique de la membrane (Jofuku *et al.*, 2005; Liesa *et al.*, 2009), tandis que sa région N-terminale (Suzuki *et al.*, 2003) contrôle l'oligomérisation entre FIS1 ou l'interaction de FIS1 avec les autres protéines de fission. FIS1 est considérée comme étant un des facteurs limitant de la fission, car sa surexpression induit la fragmentation du réseau mitochondrial, ce qui n'est toujours pas le cas avec celle de DRP1 (James *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2002). FIS1 a également été décrite comme intervenant dans de nombreux autres processus tels que l'initiation à l'apoptose (Lee *et al.*, 2004), la sénescence cellulaire (Lee *et al.*, 2007) et la mitophagie.

DRP1, appelée également DNM1L /DLP1, est exprimée dans tous les tissus et plus fortement dans le cerveau, les muscles squelettiques et le cœur. Cependant, il existe une isoforme spécifique dans le cerveau, non détectée ou absente des autres tissus (Smirnova *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 1998). La localisation de cette protéine de 80kDa est majoritairement cytosolique, mais une fraction non négligeable est détectée au niveau des mitochondries dans des structures localisées au niveau

des futurs sites de scission mitochondriale (**Figure 21c**) (Smirnova *et al.*, 2001). La protéine DRP1 possède plusieurs domaines caractéristiques de la famille des GTPases, disposant entre autres d'un domaine GTPasique, un domaine central et une région GED (Chan, 2006). Au cours du processus de fission des membranes mitochondriales, les protéines DRP1 cytosoliques s'oligomérisent par leur domaine GED pour former des anneaux et des spirales autour du site de fission des membranes (Hoppins *et al.*, 2007; Ingerman *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2003). La force mécanique nécessaire à leur constriction est fournie par l'hydrolyse du GTP par l'activité du domaine GTPasique (Praefcke & McMahon, 2004) (**Figure 21d**). Le domaine GED est aussi important pour la régulation du domaine GTPasique (Zhu *et al.*, 2004), ainsi que pour l'adressage mitochondrial de DRP1 (Pitts *et al.*, 2004). De plus, les fonctions du domaine central sont encore peu connues, mais semblent intervenir dans l'assemblage correct des spirales sur la mitochondrie (Ramachandran *et al.*, 2007).

La régulation du processus de fission mitochondriale est encore mal connue dans les cellules de mammifères. Cependant, quelques études ont permis de mettre en évidence que l'activité de DRP1 serait modulée et régulée par différentes voies. Sa phosphorylation sur la sérine S616 par la Cdk1/cyclin B (*Cyclic dependent kinase 1*) stimulerait la fission mitochondriale lors de la mitose Taguchi 2007. L'autre kinase étant capable de catalyser la phosphorylation de DRP1 sur la sérine S637 est la protéine kinase A (PKA) (Cereghetti *et al.*, 2008; Cribbs & Strack, 2007). Toutefois, la phosphorylation par la PKA inhiberait l'activité de DRP1 contrairement à Cdk1/cyclin B. Le changement de localisation et de l'activité de DRP1 serait également modulé par les voies de signalisation calcique via la calmoduline kinase (CamK) et la calcineurine (Smirnova *et al.*, 2001). La régulation de l'activité de DRP1 par phosphorylation varie donc selon le résidu sérine phosphorylé. DRP1 peut être régulée par d'autres processus post-traductionnels comme la SUMOylation et l'ubiquitination qui favorisent respectivement la stabilisation ou au contraire la dégradation de la protéine, ou bien encore par la S-nitrosylation qui stimule l'action fissionnelle de DRP1 (Cho *et al.*, 2009).

Une conséquence intéressante de la modulation de l'activité GTPasique de DRP1 est que si la vitesse d'hydrolyse du GTP est plus lente que la vitesse de son oligomérisation, alors elle peut induire une tubulation au lieu d'une simple fission (Praefcke & McMahon, 2004).

3.2.b-La fusion mitochondriale : Mfn1, Mfn2 et OPA1

La fusion mitochondriale est un processus particulièrement complexe, car elle fait intervenir deux systèmes indépendants mais coordonnés (Malka *et al.*, 2005). Dans un premier temps, les membranes externes fusionnent ensemble, puis ce sont les membranes internes. Cette temporalité est rendue possible par le fait que la fusion de la membrane externe implique des protéines différentes de celles intervenant pour la fusion de la membrane interne. Les protéines sont indispensables pour la fusion des différentes membranes, mais les lipides (acide phosphatidique et ergostérol) et le Δψ jouent également un rôle important.

Chez les mammifères, trois GTPases sont nécessaires pour la fusion mitochondriale: les mitofusines (MFN1 et MFN2) régissent la fusion des membranes externes, tandis qu'OPA1 (*Optic atrophy type I*) permet entre autres la fusion des membranes internes (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes mis en jeu pour l'initiation et la coordination des processus de fusion restent mal connus.

La famille des mitofusines est composée de MFN1 et MFN2 (Santel & Fuller, 2001). Ces deux protéines ubiquitaires, qui contiennent deux régions transmembranaires, disposent d'une homologie de séquences de 60% et sont encastrées dans les membranes externes des mitochondries avec les principales parties de la protéine face au cytosol (Fritz *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2002). A l'aide de leur structure composée d'un domaine GTPasique (N-ter) et de deux domaines « coiled coil », elles permettent respectivement la fusion des membranes externes par l'hydrolyse du GTP et la création d'un lien physique entre les membranes externes par l'interaction forte entre mitofusines (Chan, 2006; Koshiba *et al.*, 2004). Ce rapprochement membranaire se fait par la constitution d'un système de reconnaissance homotypique (MFN1-MFN1 ou MFN2-MFN2) ou hétérotopique (MFN1-MFN2) (Chen *et al.*, 2003) (**Figure 22**). L'interaction via le dimère MFN1-MFN1 est plus forte que celle via MFN2-MFN2 (Ishihara *et al.*, 2004). Que ce soit dans le domaine « coiled-coil » ou dans le domaine GTPase, l'apparition d'une mutation/délétion provoque l'arrêt de la fusion et conduit à une apposition des membranes.

La régulation du processus de fusion mitochondriale des membranes externes reste encore peu étudiée. Néanmoins, certains partenaires ont déjà été identifiés. L'activité phospholipase de MitoPLD (*Mitochondrial phospholipase D*) serait nécessaire pour le processus de fusion par les MFNs (Choi *et al.*, 2006). De même, une interaction directe entre les mitofusines et Mib (*Mitofusin-binding protein*) ou Bak, permettrait d'inhiber la fusion mitochondriale (Brooks *et al.*, 2007; Eura *et al.*, 2006), alors qu'une interaction avec MARCH-V (Me*mbrane associated RING-CH*), la stimulerait au contraire. L'interaction entre les mitofusines et OPA1 (Guillery *et al.*, 2008) pourrait expliquer comment les deux processus de fusion réussissent à se coordonner.

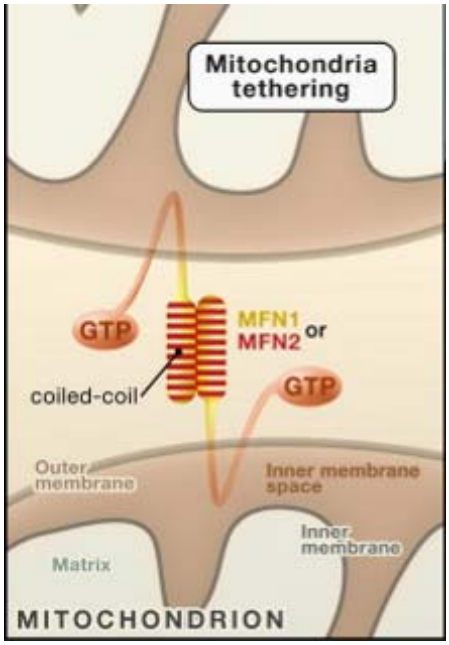


Figure 22 : Rôle des MFNs dans la fusion mitochondriale. *(Source : Merkwirth & Langer, 2008)*

Initialement, la protéine OPA1 a été identifiée «in silico» comme jouant un rôle chez l'homme dans la dynamique mitochondriale par homologie avec Mgm1p dans Saccharomyces cerevisiae (Alexander *et al.*, 2000), et ses mutations ont été jugées responsables de l'apparition des symptômes d'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) (Delettre *et al.*, 2000). Cette protéine ubiquitaire est majoritairement exprimée dans certains tissus tels que la rétine, le cœur, le cerveau, le foie et le pancréas. La traduction de cette protéine aboutit à la production d'isoformes longues ou courtes suite à un clivage (Song *et al.*, 2007) dont l'abondance est tissu-spécifique (Akepati *et al.*, 2008; Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2001).

OPA1 est une dynamine (Belenguer & Pellegrini, 2012), constituée de trois régions conservées: un domaine GTPase, un domaine central et un domaine effecteur (GED) contenant une région coiled-coil, localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Akepati *et al*., 2008). De par sa structure similaire à celle des mitofusines, OPA1 permet à la fois le rapprochement et la fusion des membranes internes des mitochondries, grâce à son activité GTPasique (Olichon *et al., 2007)* de ses complexes homotypiques formés par les domaines « coiled-coil » (Akepati *et al*., 2008) (**Figure 23**). Bien que son rôle dans la régulation de la fusion des membranes internes soit sa première fonction, OPA1 nécessite l'activité conjointe de celle de MFN1, mais pas de MFN2 (Belenguer & Pellegrini, 2012). Elle participe également à de nombreux autres processus qui seront explicités par la suite.

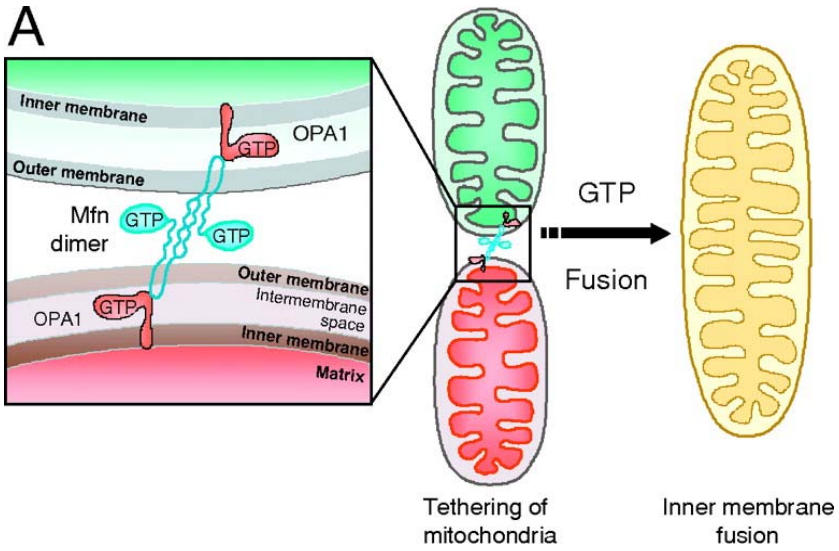


Figure 23 : Schématisation de la fusion mitochondriale. *(Source : Nisoli & Carruba, 2006)*

La régulation de cette protéine se fait à différents niveaux, que ce soit sur le plan transcriptionnel ou traductionnel. Le taux de cette protéine influence le type de fusion : « fusion transitoire » qui résulte d'un bref échange des composants solubles sans affecter la morphologie mitochondriale, ou une « fusion complète » qui permet l'échange de tous les composés mitochondriaux et perturbe la morphologie mitochondriale (Liu *et al*., 2009).

3.3-Rôles de la dynamique mitochondriale

Comme nous l'avons présenté précédemment, lorsqu'un stimulus induit une augmentation des capacités énergétiques et provoque une activation de la biogénèse mitochondriale, il y a alors création de nouvelles mitochondries. Cette étape nécessite des évènements de fusion et de fission mitochondriales et un contrôle de la qualité des mitochondries. Pour assurer ce contrôle-qualité, la fusion mitochondriale intervient en permettant la restauration des mitochondries déficientes (protéines altérées, perte d'ADN) grâce à des échanges avec des mitochondries fonctionnelles, tandis que la fission permet la réorganisation et la séquestration des composants endommagés, puis leur élimination par autophagie/mitophagie (Mouli *et al.*, 2009; Twig *et al.*, 2008). La dynamique mitochondriale doit donc être logiquement impliquée dans le bon déroulement de la biogénèse mitochondriale.

3.4-Autres fonctions des protéines de la dynamique mitochondriale

En dehors de leur implication dans les processus de fusion-fission, et dans la modulation architecturale des mitochondries (biogénèse, contrôle qualité), les protéines de la dynamique mitochondriale peuvent être impliquées dans de nombreuses fonctions mitochondriales (métabolisme, maintien de l'ADN_{mt}) ou cellulaires (prolifération cellulaire, signalisation, apoptose).

3.4.a-Dans les fonctions mitochondriales

3.4.a.i-Métabolisme

Les processus de fusion-fission jouent un rôle important dans l'énergétique des mitochondries, et en particulier la fusion mitochondriale, car elle permet la coopération des mitochondries entre elles (Chen *et al.*, 2003). Les données actuelles montrent que la perturbation de la dynamique mitochondriale par une surexpression ou une répression de la fusion (MFN2, OPA1) (Chen *et al.*, 2005; Olichon *et al.*, 2003) ou de la fission mitochondriale (Benard *et al.*, 2007), provoque des altérations dans le métabolisme mitochondrial (Chen *et al.*, 2005) selon le degré de différenciation du type cellulaire considéré. Ces altérations peuvent s'accompagner d'une modulation du potentiel membranaire des mitochondries, et de l'expression

des sous-unités des complexes I, IV, et V (Chan, 2006; Liesa *et al.*, 2009; Pich *et al.*, 2005).

3.4.a.ii-Maintien de l'ADN$_{mt}$

Actuellement, les études démontrent que les altérations de l'ADN$_{mt}$, causées par des changements dans les composants de la dynamique mitochondriale, sont plus probablement dues à des altérations de l'équilibre de la fusion-fission mitochondriale et non pas seulement à des modifications de la fusion mitochondriale. En effet, les observations faites chez S. cerevisiae et les cellules MEF, convergent pour indiquer que l'activité normale d'OPA1 (Chen *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 1993; Jones & Fangman, 1992) ou des MFNs (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007; Hermann *et al.*, 1998; Rappaport *et al.*, 1998) sont cruciales pour maintenir l'intégrité des nucléoides d'ADN$_{mt}$ (Liesa *et al.*, 2009). A ce jour, peu de preuves ont été faîtes sur un éventuel rôle des protéines de la fission mitochondriale dans la stabilité de l'ADN$_{mt}$ (via DRP1 (Parone *et al.*, 2008)).

3.4.b-Dans la signalisation cellulaire

Les protéines MFN2 participent également aux processus de signalisation cellulaire. En effet, les interactions MFN2-MFN2 ou MFN2-MFN1 se retrouvent impliquées dans celles reliant les mitochondries au réticulum endoplasmique (RE) et pourraient être à l'origine de l'intercommunication entre organites lors de la signalisation Ca^{2+} (**Figure 24**) (de Brito & Scorrano, 2008; Szabadkai *et al.*, 2004).

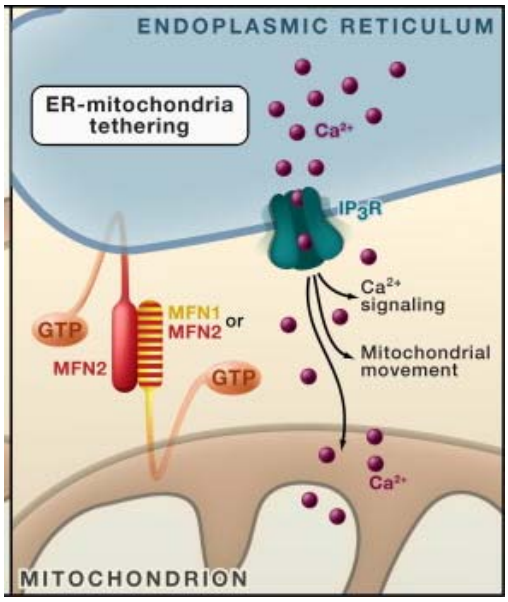


Figure 24 : Rôle des MFNs dans les contacts mitochondrie-réticulum endoplasmique.
(Source : Merkwirth & Langer, 2008)

La répression de MFN2 (et non MFN1) dans des fibroblastes embryonnaires de souris et des cellules HeLa perturbe la morphologie du RE et altère les contacts mitochondries-RE, ce qui réduit l'efficacité de la capture de Ca^{2+} par les mitochondries. La perte de MFN2 entrainerait donc la perturbation des voies de signalisation métabolique par la modification des flux de Ca^{2+}.

3.4.c-Dans la survie cellulaire

Les données actuelles suggèrent également un rôle potentiel de la dynamique mitochondriale dans la prolifération cellulaire, par une action antiproliférative de MFN2 (Liesa *et al.*, 2009). Plusieurs éléments tendent à montrer, dans les cellules musculaires lisses vasculaires, que la surexpression de MFN2 inhibe la prolifération cellulaire par un arrêt des cellules en phase G0/G1. De plus, la répression de MFN2 est associée à des états hyperprolifératifs (Chen *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007). Le mécanisme proposé pour comprendre le rôle de MFN2 dans la régulation du cycle cellulaire est la liaison et la séquestration de Ras, l'une des GTPases contrôlant le cycle cellulaire, par MFN2. En accord avec un rôle antiproliératif de MFN2, une étude récente sur les cellules déficientes en PHB2 révèle que leur défaut de prolifération est partiellement restauré par l'expression d'un variant non clivable d'OPA1 (Merkwirth & Langer, 2008).

3.4.d-Dans la mort cellulaire programmée

Pour permettre la survie des organismes multicellulaires, ainsi que le maintien de l'équilibre avec la prolifération cellulaire, les cellules sont capables d'initier leur autodestruction. Cette mort cellulaire programmée également appelée apoptose est gouvernée par deux voies principales d'activation : la voie extrinsèque (qui implique des récepteurs tels que TNFR, Fas/CD95, TRAILR, et la voie intrinsèque, également connue comme la voie mitochondriale. L'étape mitochondriale de cette voie intrinsèque est considérée comme «un point de non-retour», car dès lors qu'elle est activée, elle provoque irréversiblement la mort de la cellule par la perméabilisation de ses membranes (Kroemer *et al.*, 2007).

Comme cela vient d'être montré, DRP1, MFN2 et OPA1 peuvent moduler le métabolisme mitochondrial et l'énergétique cellulaire (Bach *et al.*, 2003; Benard *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005; Pich *et al.*, 2005). Il ne peut donc être écarté l'hypothèse d'une régulation de l'apoptose par les protéines de la dynamique mitochondriale via

leur contribution dans les paramètres bioénergétiques. Cependant, l'ensemble des données actuelles suggèrent que la régulation de l'apoptose par la dynamique mitochondriale repose plus sur l'activité spécifique des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale que sur les modifications de la morphologie mitochondriale en soit. En effet, les protéines impliquées dans la fusion-fission mitochondriale (FIS1, DRP1, OPA1) peuvent stimuler l'apoptose dans certaines conditions (Alirol *et al.*, 2006; Arnoult *et al.*, 2005; Griparic *et al.*, 2004; James *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003; Sugioka *et al.*, 2004; Szabadkai *et al.*, 2004), indépendamment de leur rôle dans le contrôle de la morphologie mitochondriale (Pich *et al.*, 2005).

Certaines études ont aussi permis de montrer que la fragmentation mitochondriale est un événement en amont de l'activation des caspases. Il n'est pas un événement tardif de l'apoptose ou une conséquence de l'activité des caspases. De même, la machinerie de la fission mitochondriale (DRP1, FIS1) contribue à l'inhibition de la libération du cytochrome c, mais pas d'autres facteurs apoptogènes (Arnoult *et al.*, 2005; Parone *et al.*, 2006), et permet donc seulement de retarder la réponse apoptotique (Frank *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Toutefois, il reste encore à déterminer si la fission mitochondriale est un facteur clé dans la régulation apoptotique, ou si elle n'est qu'un épiphénomène de la mort cellulaire programmée (Martinou & Youle, 2006; Sheridan *et al.*, 2008). De même, les protéines de la fusion (MFN1, MFN2) ne protègent pas forcément contre l'apoptose (Fukushima *et al.*, 2001).

En outre, DRP1 et OPA1 jouent un rôle dans l'apoptose, indépendamment de leur activité respective de contrôle de la fission et de la fusion mitochondriale. Tous deux régulent la morphologie des crêtes des mitochondries, indépendamment de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Frezza *et al.*, 2006; Germain *et al.*, 2005). OPA1 régule indirectement l'activation de l'apoptose (Frezza *et al.*, 2006) par la modulation directe des crêtes mitochondriales et donc de leur capacité de libération du cytochrome c.

De par les différences d'activité/abondance des composants de la dynamique mitochondriale selon les tissus, la contribution de la dynamique mitochondriale pour l'apoptose est donc très différente selon le contexte tissulaire.

3.5-Impact des mutations-délétions des protéines de la dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est reconnue comme étant un processus essentiel chez les mammifères. En effet, dans le modèle murin, la perte totale en protéine MFN1, MFN2, MFN1/MFN2 ou OPA1 induit respectivement une létalité *in utero* aux stades précoces de 10,5 -11,5 jours (Chen *et al.*, 2003), 9,5 jours (Chen *et al.*, 2011) et de 8,5 jours (Alavi *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2007). Cependant, la perte de fonction de MFN1 ou MFN2 n'induit pas les mêmes effets chez des souris knock-out conditionnelles (Chen *et al*., 2007).

De même, la perte partielle en protéine MFN2 ou OPA1 peuvent être à l'origine de développement de pathologies neurodégénératives (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2004). Les fibroblastes provenant de patients atteints de certaines mutations d'OPA1 (type ADOA) peuvent présenter des déficiences d'activité mitochondriale et énergétique (Agier *et al.*, 2012; Zanna *et al.*, 2008), mais pas toujours (Mayorov *et al.*, 2008; Spinazzi *et al.*, 2008). Tout comme les fibroblastes provenant de patients présentant des mutations de MFN2 (Charcot-Marie-Tooth Type 2A) montrent aussi des altérations métaboliques (consommation d'oxygène basale et potentiel de la membrane mitochondriale réduits) (Loiseau *et al.*, 2007), alors que d'autres mutants de MFN2 ne présentent pas d'altération métabolique (Amiott *et al.*, 2008).

La présence de mutations dans le gène de *Drp1* mène également à des défauts de développement cérébral. Les fibroblastes provenant de ces patients présentent de sévères altérations des fonctions mitochondriales et peroxisomales (Ramachandran *et al.*, 2007; Waterham *et al.*, 2007).

La moindre altération dans les processus de fusion-fission est donc soit létale, soit conduit à des pathologies neurodégénératives, ce qui souligne l'importance des protéines de la dynamique mitochondriale dans les fonctions cellulaires.

3.6-Dynamique mitochondriale et muscles striés

En conditions physiologiques, les mitochondries des cellules cardiaques adultes présentent un arrangement spatial caractéristique et très régulier entre les myofibrilles (Vendelin *et al.*, 2005) (**Figure 25.A**), fournissant la base bioénergétique de la contraction. Ces mitochondries ne montrent aucun signe visible de fission ou de fusion, à des échelles de temps compatibles avec une expérience (~16 jours (Chen *et al.*, 2011)), ni de déplacement (Beraud *et al.*, 2009). Cependant, les mitochondries possèdent l'ensemble des protéines nécessaires aux processus de la dynamique (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006), ce qui permet notamment leur renouvellement et leur régénération (Hom & Sheu, 2009a).

Dans le muscle squelettique, l'arrangement caractéristique et ordonné des mitochondries est différent de celui des cardiomyocytes, avec la majorité des mitochondries arrangées par paire (Vendelin *et al.*, 2005). Globalement, l'organisation du réseau mitochondrial entre le soléaire (**Figure 25.B**) et le gastrocnémien superficiel (**Figure 25.C**) est similaire, bien que le soléaire présente une densité mitochondriale plus forte. De même, bien que la majorité des protéines de la dynamique mitochondriale ait été identifiée, l'existence d'une dynamique mitochondriale dans les fibres musculaires squelettiques reste largement à confirmer (Pham *et al.*, 2012; Picard *et al.*, 2012).

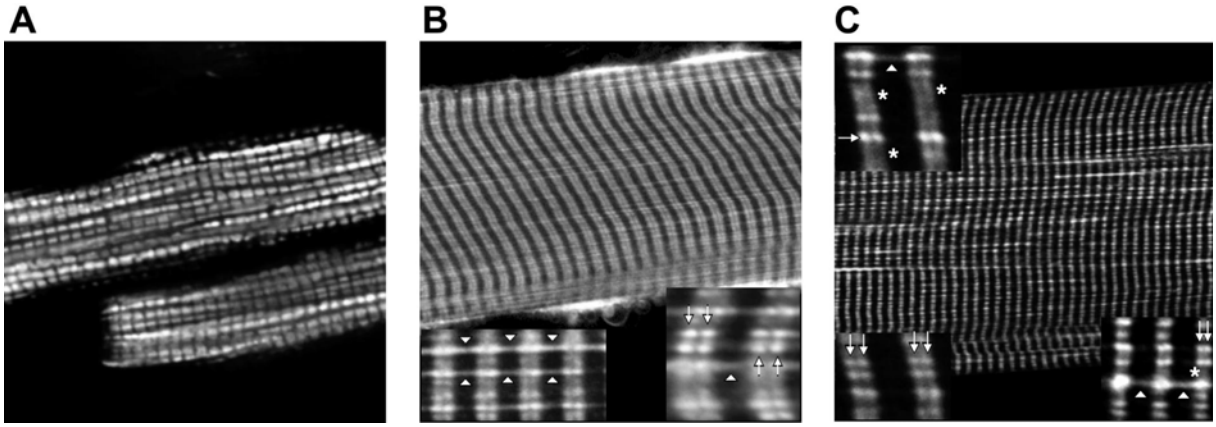


Figure 25 : Images confocales de cardiomyocytes (A), de fibres provenant de soléaire (B), et de fibres provenant de gastrocnémien superficiel (C).
(Source : Vendelin, 2005)

On ne peut donc pas exclure que ce soient les propriétés secondaires des protéines de la fusion-fission qui soient à l'origine des pathologies neuromusculaires lors de leur déficience (Picard *et al.*, 2012).

En conditions pathologiques (ischémie-reperfusion, hypoxie), les mitochondries des cardiomyocytes présentent des dommages hétérogènes dans leur morphologie, leur état d'oxydo-réduction et le taux de calcium, qui pourraient être liés à une surproduction de ROS locale (Kuznetsov *et al.*, 2004).

Sachant qu'un excès de fragmentation mène à l'apoptose (Wasiak *et al.*, 2007), le taux de fission des mitochondries pourrait être un indicateur des dommages musculaires lorsqu'un exercice intense perdure. En effet, MFN2 serait un facteur déterminant de l'apoptose induit par le stress oxydatif(Shen *et al.*, 2007) et OPA1 pourrait participer à la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006).

Les mitochondries adaptent continuellement leur forme à l'évolution des conditions physiologiques (division cellulaire) (Bereiter-Hahn & Voth, 1994; Mozdy & Shaw, 2003) et physio-pathologiques (apoptose, contraintes diverses …) (Karbowski & Youle, 2003; Perfettini *et al.*, 2005) et modifient leur comportement en conséquence (Benard *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2004). Il est également connu que des changements dans les conditions métaboliques de la cellule peut moduler les processus de fusion-fission, et par voie de conséquence provoquer un changement de l'organisation rigide et précise des mitochondries (Hackenbrock, 1968; Mannella, 2006; Mannella *et al.*, 2001).

En conclusion, la spécificité cellulaire de la dynamique mitochondriale est importante, non seulement pour le contrôle de la morphologie et de l'organisation spatiale des mitochondries, mais aussi pour leur fonctionnement, la régulation du métabolisme (McBride et al. 2006) et leur interaction avec les autres systèmes intracellulaires. L'existence d'une spécificité cellulaire de la dynamique mitochondriale suggère qu'il serait incorrect d'extrapoler les caractéristiques de la dynamique mitochondriale étudiées dans un type cellulaire particulier à un autre type de cellule.

Chapitre IV : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR OPA1

Ce quatrième chapitre se concentre sur OPA1, l'un des rares participants connus de la fusion de la membrane interne, dont les mutations provoquent une neuropathie optique plus ou moins associée à d'autres syndromes. Depuis sa première identification en 2000, la caractérisation de ses fonctions par le développement de modèles *in vivo* de la maladie ont permis la compréhension des processus physiopathologiques conduisant à une atrophie visuelle autosomique dominante de type 1 (ADOA-1, *Autosomal dominant optic atrophy*). Un bilan actuel des connaissances sur cette protéine et de son rôle dans les cas de neuropathie optique constitue ce chapitre.

1. Isoformes et régulation de l'expression de la protéine OPA1

Bien que l'expression de la protéine OPA1 soit ubiquitaire (Aijaz *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Pesch *et al.*, 2001), la répartition spécifique des variants d'ARNm (Akepati *et al.*, 2008) et de la protéine (Delettre *et al.*, 2001; Olichon *et al.*, 2002) suggère l'implication d'une forme spécifique de cette dynamine dans la spécificité tissulaire de la pathogenèse de type ADOA-1 (Olichon *et al.*, 2006).

1.1-Structure du gène Opa1

Chez l'homme, le gène *Opa1* est constitué de 30 exons, dont trois (4, 4b et 5b) à épissage alternatif qui conduisent à l'expression de huit ARNm (Delettre *et al.*, 2001), contre quatre ARNm chez la souris (Akepati *et al.*, 2008). Le gène *Opa1* code pour une protéine mitochondriale (85-100KDa) qui appartient à la famille des dynamines (Delettre *et al.*, 2000; Praefcke & McMahon, 2004), avec lesquelles il partage trois régions conservées: un domaine GTPase, un domaine intermédiaire, et un domaine GTPase effecteur (GED) contenant un domaine coiled-coil (CC2) (**Figure 26**).

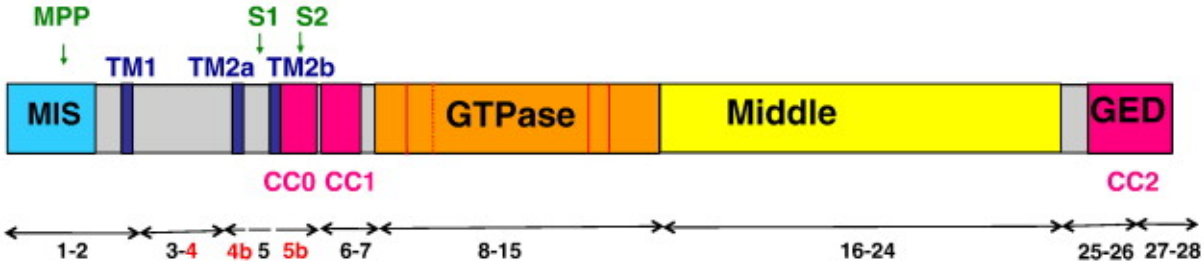


Figure 26 : Représentation schématique des domaines et des sites de clivage protéolytiques de la protéine OPA1 humaine. ***Indication de la nomenclature des exons en dessous de la structure, et localisation des sites de clivage protéolytique par des flèches : MPP (Mitochondrial processing peptidase), paraplegin (S1) et YME1L (S2).***
(Source : Belenguer & Pellegrini, 2012)

Les huit transcrits primaires exprimés avec une spécificité tissulaire (Akepati *et al.*, 2008; Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2001) sont dirigés à la mitochondrie via une séquence d'importation mitochondriale (MIS) en N-terminale, qui est ensuite éliminée par la peptidase de traitement mitochondriale (MPP) pour donner lieu à des isoformes longues (l-OPA1) (Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003).

L'exon 4 a été conservé au cours de l'évolution et ne présente pas de domaine remarquable, alors que les deux exons 4b et 5b, qui sont spécifiques aux vertébrés (Olichon *et al.*, 2007), codent respectivement pour les domaines hydrophobes (TM2a et TM2b) et le domaine « coiled-coil » (CC0) (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007).

Tout comme le domaine GED qui participe à l'oligomérisation et l'activation des dynamines, le domaine CC0 situé dans l'exon 5b est impliqué dans des interactions avec des régions CC1, et ce domaine CC1, situé en aval de la région d'épissage alternatif, pourrait être responsable de la formation de complexes OPA1 homotypiques (Akepati *et al.*, 2008).

1.2-Génération et régulation des isoformes

La régulation des fonctions de la protéine OPA1 se fait par diverses voies. Le clivage protéolytique est le plus documenté, comparé à l'étude de l'impact des autres modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

1.2.a-Modifications post-transcriptionnelles par clivage

Chaque isoforme L-OPA1 est sujet à des processus protéolytiques distincts, ce qui aboutit à la création d'isoformes courtes (short, s-OPA1) dépourvues de domaines transmembranaires (Song *et al.*, 2007). Ces deux formes sont localisées dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Akepati *et al.*, 2008). Il est proposé que l-OPA1 soit insérée dans la membrane interne, tandis que s-OPA1 soit attachée superficiellement à la membrane interne et dispose de la possibilité d'être soluble dans l'espace intermembranaire, et ainsi interagir avec les protéines de la membrane externe (Cipolat *et al.*, 2006; Griparic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003).

OPA1 est clivée sous deux conditions (constitutif, induit). Les études réalisées sur la compréhension de la génération des différentes isoformes sont nombreuses et discordantes. Le clivage constitutif semble être assuré par l'intervention de trois protéases mitochondriales reconnaissant deux sites de clivage : l'enzyme PARL (*Presilin-associated rhomboid-like protease*) assure la production de la forme soluble (Cipolat *et al.*, 2006); la paraplégine, une m-AAA protéase, qui clive OPA1 en S1 (Ishihara *et al.*, 2006) et YMEL1, une i-AAA protéase, qui clive OPA1 en S2 (Song *et al.*, 2007).

En plus du processus constitutif, le clivage de l-OPA1 est induit par la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial (mΔψ), le stade du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, en corrélation avec la fragmentation mitochondriale (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). En effet, la perte de mΔψ déstabilise l-OPA1 et provoque sa coupure au niveau de sites multiples dont S1 (Griparic *et al.*, 2007; Guillery *et al.*, 2008; Ishihara *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). Dans ce cas, le clivage est assuré entre autres par la métalloprotéase OMA1 (Ehses *et al.*, 2009; Head *et al.*, 2009; Quiros *et al.*, 2012).

L'activité des m-AAA protéases, qui contrôlent à la fois le clivage et le renouvellement de la protéine OPA1, est sous le contrôle de la prohibitine. La suppression de la prohibitine 1 ou 2 induit la perte sélective de l-OPA1, et provoque une altération de la morphologie des crêtes et une moindre résistance à l'apoptose (Merkwirth & Langer, 2009; Sato *et al.*, 2011).

1.2.b-Modifications post-traductionnelles

Les rares études menées sur les modifications post-traductionnelles montrent une régulation de l'expression d'OPA1 par l'ubiquitine ligase APC/CCDH1 lors de l'entrée-sortie dans le cycle cellulaire (Garedew *et al.*, 2012) et une éventuelle modification d'OPA1 par ubiquitination et O-Glucose-N-Acetylation (Kar *et al.*, 2010; Makino *et al.*, 2011).

2. Fonctions de la protéine OPA1

Les causes pathogéniques proposées dues à la mutation d'OPA1 sont des altérations de la morphologie et de la distribution des mitochondries (Kamei *et al.*, 2005; Spinazzi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), des désordres bioénergétiques (synthèse ATP) (DiMauro *et al.*, 1998; Lodi *et al.*, 2004; Lodi *et al.*, 2011; Yu-Wai-Man *et al.*, 2011), ou une sensibilité accrue à l'apoptose (Landes *et al.*, 2010b; Olichon *et al.*, 2007).

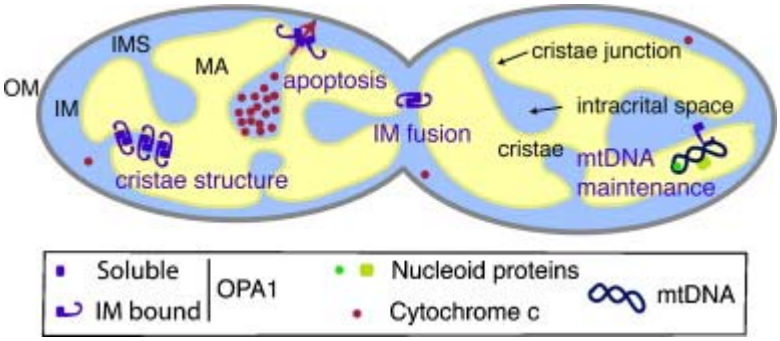


Figure 27 : Schématisation des fonctions mitochondriales d'OPA1. *(Source : Landes, 2010)*

Ces multiples altérations mitochondriales sont sous-tendues par la multiplicité de fonctions de la protéine OPA1 (**Figure 27**).

2.1-Fusion mitochondriale

Dans les fibroblastes de patients ADOA-1, le réseau mitochondrial semble être plus fragmenté par rapport à ceux des sujets témoins (Chevrollier *et al.*, 2008; Olichon *et al.*, 2007; Zanna *et al.*, 2008), même si quelques études ont montré des résultats différents (Agier *et al.*, 2012). Ces altérations de la fusion mitochondriale ont été par la suite confirmées dans des modèles murins et cellulaires (Chen *et al.*, 2005;

Cipolat *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2007) validant l'activité pro-fusion de la protéine OPA1.

Chez les mammifères, les deux domaines GTPase et GED sont essentiels pour la fonction pro-fusion d'OPA1 (Cipolat *et al.*, 2004). De plus, les formes longues et courtes des OPA1 fonctionnent ensemble pour la fonction fusiogène de la dynamine, mais avec des rôles distincts (Cipolat *et al.*, 2004). s-OPA1 ne peut intervenir directement dans les processus de fusion membranaire (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Griparic *et al.*, 2007), mais participe indirectement en interagissant avec la forme longue (Song *et al.*, 2007).

2.2-Organisation des crêtes mitochondriales et apoptose

En plus de la fragmentation mitochondriale, la déficience en OPA1 augmente aussi la sensibilité des cellules à l'apoptose spontanée et induite (Lee *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003; Olichon *et al.*, 2007) (Frezza *et al.*, 2006), tout comme sa surexpression protège les cellules contre l'apoptose induite par des stimuli intrinsèques (Frezza *et al.*, 2006). Là encore, certaines études, où une élongation des mitochondries est observée chez des patients ADOA, ont montré cependant que les cellules ne présentaient pas de modification de leur sensiblité à l'apoptose (Agier *et al.*, 2012). L'ensemble de ces observations ont conduit à proposer que la protéine OPA1 avait également une fonction anti-apoptotique. Mais les fonctions fusiogènes et apoptotiques d'OPA1 sont indépendantes, de par l'existence d'isoformes. Les isoformes contenant l'exon 4 sont importantes pour la fusion mitochondriale, tandis que celles contenant l'exon 4b ou 5b régulent la libération de cytochrome c (Olichon *et al.*, 2007).

Le lien entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose est au cœur de nombreuses controverses. L'une des controverses qui persistent est la suite d'événements reliant le remodelage des crêtes mitochondriales, le désassemblage des oligomères d'OPA1 et la libération du cytochrome c (Scorrano, 2009; Yamaguchi & Perkins, 2009). OPA1 intervient dans la formation et le maintien des crêtes mitochondriales. Il a donc été proposé que le remodelage des crêtes contribuait à la séquestration du cytochrome c (Perkins *et al.*, 2009). Le complexe le contenant pourrait être désassemblé au cours de l'apoptose induite par BNIP3 (Landes *et al.*,

2010b), et induirait la formation d'ouvertures permettant le passage de molécules de 60-100 kDa (Landes *et al.*, 2010b), de façon dépendante de son interaction avec des membres pro-apoptotique de la famille BCL2 (Belenguer & Pellegrini, 2012) (**Figure 28**). De même, certaines incertitudes persistent sur l'implication de Bax et Bak, et le rôle des domaines BH3 dans ce processus (Landes *et al.*, 2010b).

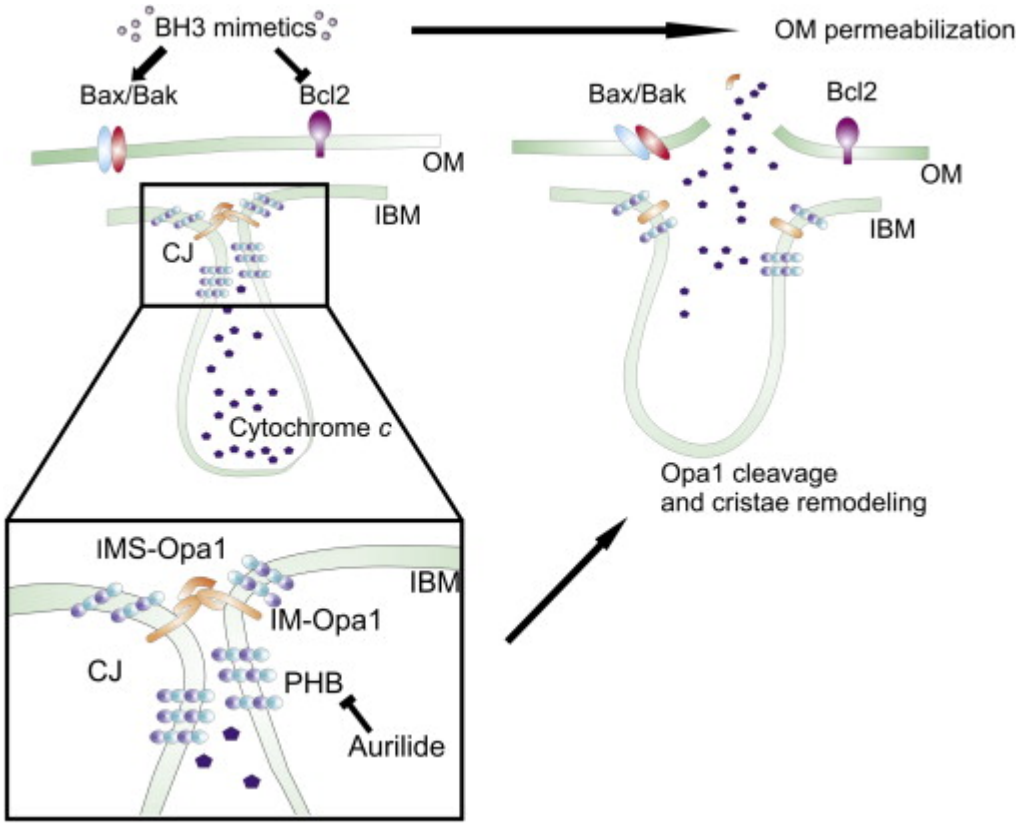


Figure 28 : Mécanismes moléculaires pro-apoptotiques d'OPA1 et sa localisation mitochondriale. *(Source : Semenzato, 2011)*

Le mécanisme alternatif qui explique la rétention du cytochrome c dans les crêtes mitochondriales est l'existence d'une liaison entre la protéine OPA1 et la cardiolipine (Ban *et al.*, 2010; Ow *et al.*, 2008), un phospholipide permettant l'ancrage du cytochrome c à la membrane interne.

2.3-Maintenance et stabilité de l'ADN$_{mt}$

Actuellement, il est rapporté que certains patients atteints de syndrome "ADOA-1^{+}" ont une légère réduction du nombre de copies d'ADN$_{mt}$ dans le muscle squelettique et les lymphocytes, mais pas dans les fibroblastes (Agier *et al.*, 2012;

Kim *et al.*, 2005; Zanna *et al.*, 2008). Cette perte de nucléoïdes mitochondriaux et d'ADN_{mt} a également été confirmée dans différentes cellules déficientes en OPA1 (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Elachouri *et al.*, 2011). Les mitochondries de ces cellules appauvries en OPA1 présentent une structure interne altérée avec des changements de la morphologie des crêtes (Griparic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003), qui peuvent être entre autres à l'origine de la perturbation du maintien, de la réplication et de l'expression de l'ADN_{mt} (Landes *et al.*, 2010b).

Les mécanismes moléculaires qui régissent l'entretien de l'ADN_{mt} en lien avec la dynamique mitochondriale sont encore mal compris. Actuellement, deux hypothèses ont été émises pour expliquer le rôle potentiel d'OPA1 dans la stabilisation de l'ADN_{mt}: il pourrait avoir un rôle direct en interagissant par son extrémité N-terminale avec les molécules d'ADN_{mt}, ce qui contribuerait à l'ancrage des nucléoïdes à la membrane interne, et favoriserait leur réplication et leur distribution (Elachouri *et al.*, 2011). Une autre possibilité est qu'il ne s'agisse que d'un effet secondaire de l'affaiblissement de la fusion mitochondriale. Le maintien des fonctions mitochondriales n'étant plus assuré par l'échange des contenus mitochondriaux, ceci accroîtrait l'instabilité de l'ADN_{mt} et empêcherait sa réparation (Landes *et al.*, 2010b). Une autre conséquence indirecte de la perte d'OPA1 serait l'affaiblissement des fonctions mitochondriales par l'accumulation de mitochondries défectueuses, suite au défaut de leur élimination par autophagie (Twig *et al.*, 2008).

Inversement, certains patients présentent une prolifération du nombre de copies d'ADN_{mt} dans leurs fibres musculaires (Yu-Wai-Man *et al.*, 2010). Cette augmentation serait un mécanisme de compensation pour maintenir un niveau adéquat en ATP, mais engendrerait une sensibilité accrue à l'apoptose (Aure *et al.*, 2006).

2.4-Métabolisme énergétique

Les muscles de patients ADOA-1 présentent également des défauts de phosphorylation oxydative et une synthèse d'ATP réduite (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Chevrollier *et al.*, 2008; Lodi *et al.*, 2004; Van Bergen *et al.*, 2011; Zanna *et al.*, 2008). Ce défaut de synthèse d'ATP ne se produit que chez les patients ayant une mauvaise vision (Van Bergen *et al.*, 2011). Les patients qui ont une vision

relativement préservée, pourraient maintenir un taux normal d'ATP par une augmentation de la respiration.

La physiopathologie de ces patients porteurs de mutations différentes d'OPA1 pourrait être liée à un défaut mitochondrial énergétique plutôt qu'une altération de la distribution et de la morphologie mitochondriale. En effet, différentes études d'immunoprécipitation ont permis de révéler qu'OPA1 serait également capable de réguler les processus de phosphorylation oxydative en stabilisant les complexes de la chaîne respiratoire par interaction avec les complexes I, II et III (Zanna *et al.*, 2008). Les défauts énergétiques pourraient être minoritairement dus aux modifications de la morphologie des crêtes (lieu de la phosphorylation oxydative) et à la perte d'ADN_{mt}, en conséquence de la déficience en OPA1.

Certains fibroblastes de patients ADOA-1 présentent une activité réduite du complexe IV, sans altération de la production d'ATP et de la morphologie mitochondriale (Chevrollier *et al.*, 2008), mais avec une sensibilité accrue à l'apoptose (Olichon *et al.*, 2007).

Une étude récente a décrit la présence d'OPA1 en dehors des mitochondries, notamment dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes. Dans cette étude, OPA1 jouerait également un rôle dans le métabolisme en intervenant dans la régulation adrénergique de la lipolyse, mais pas dans l'accumulation des gouttelettes lipidiques ou du contenu lipidique des adipocytes, en tant que protéine d'ancrage de la protéine Kinase A (Pidoux *et al.*, 2011).

3. Dysfonction d'OPA1 et développement de pathologies

L'ADOA-1 (ou maladie de Kjer) est une neuropathie optique héréditaire (fréquence de 1:10.000 à 1:50.000 (Amati-Bonneau *et al.*, 2009)) causée dans 60 % des cas par diverses mutations d'OPA1 (Marchbank *et al.*, 2002; Pesch *et al.*, 2001), qui affectent les cellules ganglionnaires de la rétine et conduisent à une diminution de l'acuité visuelle, voir éventuellement à la cécité (Amati-Bonneau *et al.*, 2009; Landes *et al.*, 2010b). Jusqu'à 20 % des patients atteints d'ADOA-1 peuvent également présenter un dysfonctionnement mitochondrial plus généralisé, et développer d'autres complications neuromusculaires (syndrome ADOA-1^+) tels que

la surdité, l'ataxie, la myopathie (faiblesse musculaire), la neuropathie périphérique et l'ophtalmoplégie externe progressive (Amati-Bonneau *et al.*, 2008; Yu-Wai-Man *et al.*, 2010,Hudson *et al.*, 2008).

Parmi les patients atteints d'ADOA-1 et d'ADOA-1^{+}, plusieurs études ont révélé que certaines mutations *Opa1* conduisaient à de multiples délétions d'ADN$_{mt}$ et à des défauts de cytochrome c oxydase dans les muscles squelettiques (Yu-Wai-Man *et al.*, 2010; Hudson *et al.*, 2008).

Les 96 mutations d'OPA1 relevées correspondent à une délétion partielle ou totale du gène, avec pour conséquence la production d'une protéine tronquée (50 % des cas). Les mutations se produisant dans le domaine GTPase (40 % des cas) (**Figure 29**) exerceraient un effet dominant négatif, tandis que celles localisées dans le domaine GED causeraient une haplo-insuffisance (Olichon *et al.*, 2006).

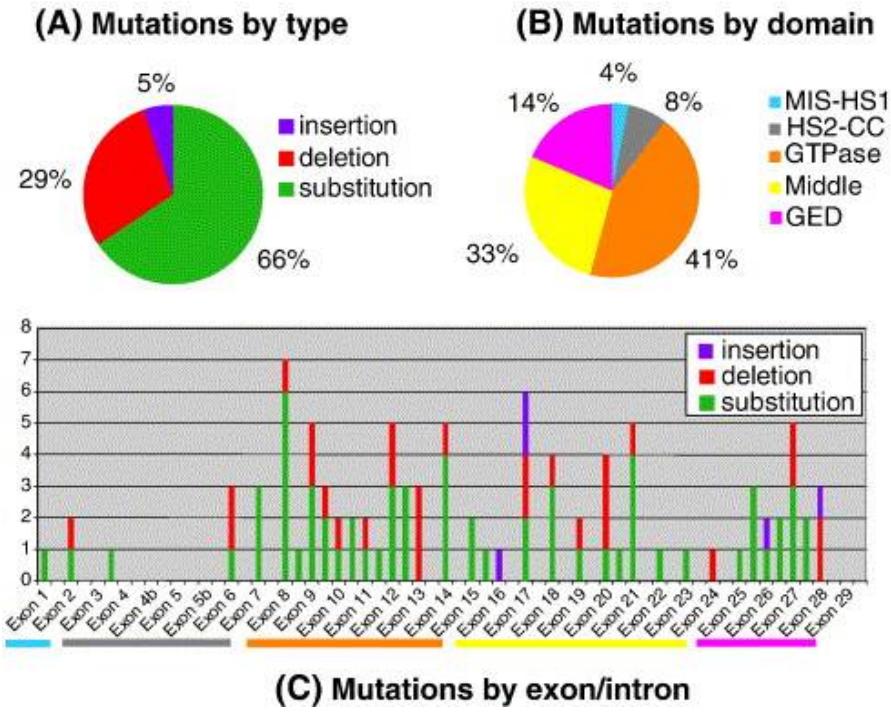


Figure 29 : Spectre des mutations OPA1. (A) Répartition des 96 mutations d'OPA1 en fonction de leur type, **(B)** de leur domaine et (C) de leur emplacement.

(Source : Olichon, 2006)

4. Etudes cliniques en cours

Des études cliniques sont actuellement en cours de réalisation pour déterminer si les patients d'ADOA-1 et d'ADOA-1+ présenteraient également des troubles cardiaques. Chez l'homme, l'unique étude réalisée sur des patients souffrant

d'insuffisance cardiaque montre qu'ils présentent des modifications de l'expression d'OPA1 (Chen *et al.*, 2009).

En conclusion, il a été montré que le défaut en protéine OPA1 conduisait à de multiples altérations dans les fibres des muscles squelettiques, dont une perte des capacités oxydatives.

Or, bien qu'OPA1 exerce de nombreuses fonctions et qu'il soit fortement présent dans le cœur, peu de choses sont actuellement connues dans ce tissu. Il serait donc intéressant de savoir si la perte d'OPA1 serait également à l'origine d'altérations des fonctions mitochondriales, pouvant perturber les capacités d'adaptations du muscle cardiaque à divers stress.

Chapitre V : ADAPTATION MUSCULAIRE SUITE A UN STRESS CHRONIQUE

L'adaptation des muscles et du cœur à une augmentation d'une charge de travail est très spécifique et dépend à la fois du type de travail, (aérobie vs force, surcharge de travail vs surcharge volumique), de la fréquence, de la durée d'activation (chronique vs aigüe) et de l'intensité du stimulus. L'adaptation aux nouvelles conditions de travail aboutit entre autres à un changement de phénotype musculaire et cardiaque par l'induction de l'expression de gènes impliqués dans des processus comme l'hypertrophie ou/et la transition du type de fibres musculaires. Elle implique en particulier un remodelage métabolique et mitochondrial. Ces adaptations peuvent résulter de stimuli physiologiques ou pathologiques.

Dans ce cinquième et dernier chapitre d'introduction, nous restreindrons notre propos à deux exemples d'adaptation musculaire impliquant un remodelage métabolique : la réponse musculaire et cardiaque à l'entraînement (stimulus physiologique) et la surcharge de pression cardiaque induite par sténose de l'aorte (stimulus pathologique).

1. *Adaptation des muscles striés lors d'un stress physiologique*

L'entraînement en endurance se trouve être bénéfique pour la fonction et le métabolisme énergétique des muscles squelettique et cardiaque.

1.1-Adaptation du muscle cardiaque suite à un entraînement d'endurance

L'entraînement en endurance induit une surcharge volumique qui conduit principalement à une hypertrophie excentrique non pathologique (Lorell & Carabello, 2000), ainsi qu'une amélioration de la fonction ventriculaire, caractérisée par une augmentation du diamètre de la cavité, sans épaississement majeur des parois, et une augmentation de la résistance du cœur à un accident ischémique (Moore, 1998). Cette adaptation du tissu cardiaque s'accompagne d'un remodelage de la vascularisation coronaire permettant d'assurer une perfusion adéquate (Tomanek & Torry, 1994).

Au cours d'un exercice d'endurance, le cœur est capable d'utiliser le substrat majoritaire dans la circulation sanguine, le lactate. En effet, la captation du lactate au niveau du cœur est proportionnelle à l'intensité de l'effort (Carlsten *et al.*, 1961). Le cœur dispose d'une isoforme de la LDH (LDH-1) associée à la réaction lactate ➔ pyruvate, ce qui lui permet ensuite de l'utiliser pour la phosphorylation oxydative. Le lactate va alors représenter plus de 60% des apports énergétiques, contre 25% pour les acides gras libres et 15% le glucose (Carlsten *et al.*, 1961) (au lieu de 60-70% pour les acides gras libres, 28% le glucose et 10% le lactate, lorsque l'organisme est au repos).

Actuellement, l'existence d'une augmentation du métabolisme énergétique et de la biogénèse mitochondriale dans la mise en place temporelle de l'adaptation cardiaque est encore controversée. Selon les études, l'expression et l'activité des transporteurs et des enzymes métaboliques (cycle de krebs, glycolyse ou β-oxydation) ou de la chaîne respiratoire sont soit induits par un entraînement régulier (Strom *et al.*, 2005; Stuewe *et al.*, 2000), soit restent inchangés (De Sousa *et al.*, 2002; Iemitsu *et al.*, 2003; Kemi *et al.*, 2007).

Dans une étude récente au laboratoire, nous avons montré que la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale n'est pas augmentée et suit principalement l'hypertrophie cardiaque (Rimbaud *et al.*, 2009). Cette absence d'activation de la biogenèse mitochondriale est retrouvée dans les études comparant la réponse du muscle squelettique et du cœur (Li *et al.*, 2011; Siu *et al.*, 2003). Cependant, une augmentation de la capacité mitochondriale à utiliser les acides gras ainsi que l'induction de PPARα, le facteur de transcription impliqué dans le transport et le métabolisme des acides gras des enzymes de la β-oxydation et de ses cibles a été observée, suite à un entraînement sur tapis roulant (Rimbaud *et al.*, 2009). Cette augmentation des capacités d'utilisation des acides gras suite à un entraînement n'est pas systématiquement confirmée dans les modèles animaux (pour revue (Ventura-Clapier *et al.*, 2007)) mais pourrait dépendre du type et de l'intensité de l'entraînement. De plus le système de transfert d'énergie par la créatine kinase est augmenté par l'entraînement en endurance dans le myocarde permettant ainsi un meilleur transfert de l'énergie entre sites de production et d'utilisation de l'énergie au cours de l'exercice (Kemi *et al.*, 2007).

En conclusion le cœur s'adapte à l'entraînement en endurance principalement en augmentant la masse cardiaque et le rendement énergétique par amélioration des transferts d'énergie et de l'utilisation des acides gras.

1.2-Adaptation des muscles squelettiques suite à un entraînement d'endurance

L'adaptation musculaire à l'endurance implique une résistance à la fatigue qui nécessite un approvisionnement continu en énergie, qui ne peut être obtenu que par une augmentation des capacités oxydatives musculaires, de la vascularisation et la biogenèse mitochondriale. De plus, des modifications des capacités à utiliser les acides gras et des systèmes de transferts d'énergie permettent un couplage fonctionnel efficient entre production et utilisation d'énergie (Mettauer *et al.*, 2006). En outre, la masse musculaire et le phénotype contractile ne vont subir que peu de modifications, avec des changements mineurs de la composition en myosines (Fluck & Hoppeler, 2003; Hood *et al.*, 2006; Koulmann & Bigard, 2006).

L'entraînement en endurance favorise essentiellement une augmentation du nombre et du volume des mitochondries, ainsi que de l'expression des protéines les composant, dans tous les types de fibres quelque soit leur métabolisme prédominant (pour revue (Hood *et al.*, 2006; Ventura-Clapier *et al.*, 2007)). Les mitochondries sous-sarcolemmales seraient les plus aptes à s'adapter à un entraînement, comparé aux mitochondries intermyofibrillaires (Koves *et al.*, 2005). Cette adaptation cellulaire à l'entraînement s'accompagne d'une augmentation du taux de fusion-fission mitochondriale. Il y a à la fois, une augmentation coordonnée des capacités respiratoires, et du taux de MFN2 et DRP1 (Cartoni *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 2005).

1.3- Activation de la biogénèse mitochondriale

La plasticité mitochondriale implique l'existence de mécanismes de détection des changements d'activité contractile et environnementaux (Holzer *et al.*, 2006). La régulation de l'expression des différentes protéines mitochondriales est réalisée par l'activation des processus de la biogenèse mitochondriale. L'expression de PGC-1α, le régulateur clef de la biogénèse mitochondriale, a été montrée comme étant

suractivée lors d'exercices d'endurance dans le muscle squelettique chez l'homme (Pilegaard *et al.*, 2003) ou chez la souris (Li *et al.*, 2011), mais absente ou seulement activée de façon transitoire dans le muscle cardiaque (Hood, 2009; Kemi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Rimbaud *et al.*, 2009).

La biogénèse mitochondriale, qui permet la mise en place du programme hypertrophique cardiaque et l'ajustement des capacités aérobies des fibres musculaires, est stimulée par deux signaux majeurs lors de l'activité contractile chronique (Hood, 2001): l'étirement et les facteurs neuro-hormonaux. Les contractions musculaires lors d'un entraînement mettent en jeu l'activation de nombreuses voies de signalisation (**Figure 30**) (Koulmann & Bigard, 2006; Ventura-Clapier *et al.*, 2007).

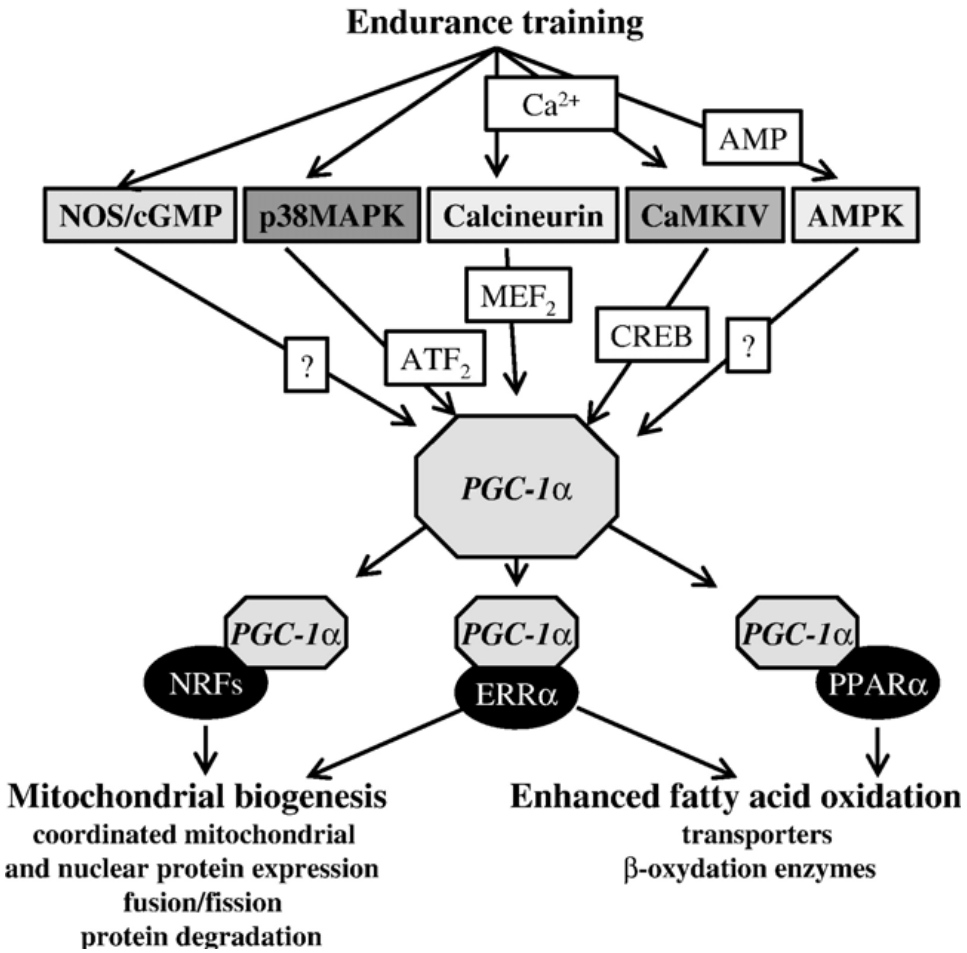


Figure 30 : Schématisation des voies de signalisation induites lors d'un exercice d'endurance dans les muscles squelettiques.
(Source : Ventura-Clapier, 2007)

L'augmentation des besoins énergétiques provoque une augmentation du rapport AMP/ATP, conduisant à l'activation allostérique de l'AMPK (*5' AMP-activated protein kinase*) (Atherton *et al.*, 2005; Frosig *et al.*, 2004), qui est associée à une augmentation de la synthèse des enzymes mitochondriales (Jorgensen *et al.*, 2007; Winder *et al.*, 2000) et à une stimulation de la biogenèse mitochondriale (PPAR α, PGC-1 α et Tfam) dans le muscle squelettique de rat (Atherton *et al.*, 2005; Bergeron *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2002).

De même, l'activité régulière de contraction musculaire provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, qui stimule l'activation des protéines dépendantes du calcium comme la CnA (*Calcineurin A*) et la CamK (*Calmoduline kinase*). En plus de son rôle d'activateur transcriptionnel de PGC-1α, la CnA est impliquée dans le contrôle du métabolisme des acides gras, via la stimulation de l'expression de PPARα et de CPT-I (Schaeffer *et al.*, 2004), et CaMK participe à la régulation du métabolisme du glucose via l'expression de GLUT4, PFK et de la PDH (Schaeffer *et al.*, 2004).

Sans oublier la participation, des voies impliquant les récepteurs couplés aux protéines Gq, telles que les MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (Akimoto *et al.*, 2005), et la PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*).

Les signaux reçus peuvent ainsi : 1) activer ou inhiber les facteurs de transcription, affectant la vitesse de transcription, 2) activer ou inhiber les facteurs de stabilité des ARNm, influençant leur vitesse de dégradation, 3) altérer l'efficacité de la traduction, 4) modifier les mécanismes post-traductionnels des protéines, 5) changer la cinétique d'import des protéines mitochondriales, 6) altérer la vitesse d'incorporation ou d'assemblage des protéines dans les complexes multienzymatiques (Hood, 2001). Ainsi, l'ensemble des signaux participent à l'activation de la biogénèse mitochondriale, ainsi qu'à la stimulation du métabolisme des acides gras via l'activation de l'expression des transporteurs des acides gras (CD36, CPT1b) et des enzymes du catabolisme des acides gras (MCAD), mais aussi des répresseurs de la voie des hydrates de carbone (PDK4) dans les muscles squelettiques.

En conclusion, l'entraînement d'endurance conduit à une adaptation différente selon le tissu considéré. La surcharge de travail favorise l'oxydation des acides gras et l'hypertrophie des cardiomyocytes, tandis qu'elle favorise l'oxydation des acides gras et la sur-activation de la biogénèse mitochondriale dans les muscles squelettiques.

2. *Adaptation cardiaque lors d'un stress pathologique*

2.1-Métabolisme énergétique

Soumis à un stress pathologique tel qu'une surcharge hémodynamique, le cœur subit un remodelage, qui va également provoquer des modifications fonctionnelles et métaboliques pour s'adapter à la demande énergétique croissante des cardiomyocytes.

Cependant malgré de nombreux travaux, la réponse cardiaque à un stress pathologique reste en partie inconnue et sujette à débats. De manière générale il semble que dans la phase compensée hypercinétique, la fonction mitochondriale ne soit pas altérée et que la biogenèse mitochondriale suive l'hypertrophie cardiaque (Rimbaud et al 2009). De même, un changement d'utilisation de substrats vers les hydrates de carbone aux dépens des acides gras a été souvent observé mais ne semble pas systématique. Il semble que l'adaptation du cœur à une surcharge de travail dépende de l'origine, de la durée et de l'intensité du stress (pour revue voir Rimbaud et al 2009).

Les mécanismes d'adaptation du myocarde permettent également de diminuer la charge de travail par une minimisation de la demande énergétique et une augmentation de l'efficacité de contraction via l'expression ventriculaire de facteurs diurétiques et vasorelaxants tels que l'ANF (A*trial natriuretic factor*) et le BNP (*Brain natriuretic peptide*), normalement sécrétés chez l'adulte par les oreillettes (Mercadier *et al.*, 1987).

Quand le stimulus, auquel le cœur est confronté, est trop prolongé ou trop intense, une transition de l'hypertrophie compensée vers l'insuffisance cardiaque se produit quand les mécanismes compensatoires de la surcharge de travail sont dépassés (Lorell & Carabello, 2000).

Le cœur insuffisant est caractérisé par une dilatation ventriculaire qui résulte de l'étirement et de la croissance excentrique des sarcomères, une fibrose et des défauts de vascularisation, avec notamment une diminution du flux sanguin et de la réserve coronaire (Maruyama *et al.*, 1997). Les altérations de l'unité contractile et de la compliance cardiaque sont à l'origine d'une augmentation du volume systolique et d'un défaut de remplissage. Ces différents facteurs conduisent à la détérioration de la fonction cardiaque.

Le myocarde insuffisant présente un déficit de capacité oxydative, une déficience d'utilisation et de transfert énergétique vers les sites consommateurs d'ATP (pour revue (Ventura-Clapier *et al.*, 2007)). En effet, les altérations de la contraction et de la relaxation cardiaque sont associées à une altération généralisée (expression et activité) du système créatine kinase (CK) avec les isoenzymes cytosolique et mitochondriale (pour revue (Dzeja *et al.*, 2000; Ingwall & Weiss, 2004; Ventura-Clapier *et al.*, 2004), au profil de la réexpression des isoformes fœtales MB-CK (Vatner & Ingwall, 1984; Younes *et al.*, 1985). De plus, les mécanismes des voies énergétiques lors de l'hypertrophie pathologique vont être modifiés pour favoriser le métabolisme glucidique au dépend de celui des acides gras.

Il a également été montré d'autres altérations de la fonction mitochondriale telles que l'expression et l'activité de la citrate synthase et de celles d'autres enzymes du cycle de Krebs, ainsi que des capacités oxydatives (OXPHOS), sont diminuées dans le myocarde insuffisant (Degens *et al.*, 2006)(pour revue (Ventura-Clapier *et al.*, 2007)). Les fonctions mitochondriales sont altérées dans de nombreux modèles d'insuffisance cardiaque que ce soit chez le chien (Marin-Garcia *et al.*, 2001; Sharov *et al.*, 1998), chez le rongeur (De Sousa *et al.*, 1999; Garnier *et al.*, 2003; Javadov *et al.*, 2005; Jullig *et al.*, 2008) ou chez l'homme (Garnier *et al.*, 2009; Mettauer *et al.*, 2006; Sharov *et al.*, 2000), et sont corrélées avec les altérations architecturales, provoquant des perturbations des échanges énergétiques qui participent directement à la dysfonction contractile (Joubert *et al.*, 2008). D'un point de vue morphologique, les mitochondries présentent une hétérogénéité de forme et de taille et un réseau fragmenté.

Le myocarde insuffisant présente également une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, le stress oxydant et l'inflammation et une production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui contribue ainsi à accroitre les dommages mitochondriaux (ADN_{mt}, enzymes et cardiolipides), la susceptibilité à l'apoptose et la fibrose.

2.2-Altérations de la biogénèse mitochondriale

L'ensemble des données actuelles tend à démontrer que la dysfonction énergétique du cœur insuffisant résulte en partie de l'altération de toute la cascade transcriptionnelle contrôlant la biogénèse mitochondriale, qui est altérée dans le cœur insuffisant (**Figure 31**).

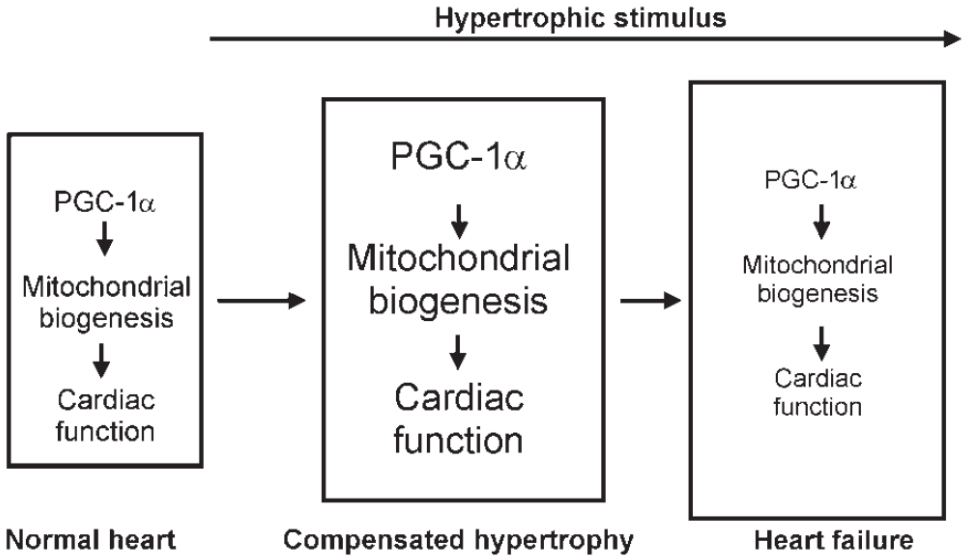


Figure 31 : Schématisation de l'activation de la biogenèse mitochondriale dans le cœur normal, hypertrophié et défaillant. *(Source : Rimbaud, 2009)*

En effet, la diminution de l'expression cardiaque de PGC-1α décrite pour la première fois dans un modèle expérimental par sténose de l'aorte thoracique chez le rat (Garnier *et al.*, 2003) puis retrouvé dans de nombreux modèles animaux et chez l'homme (Garnier *et al.*, 2009; Sebastiani *et al.*, 2007; Witt *et al.*, 2008). De plus, une diminution des facteurs de transcription activés par PGC-1α tels que ERR α (Sihag *et al.*, 2009), les NRFs, TFAM et leurs cibles ont été retrouvés chez l'animal ou chez l'homme (Garnier *et al.*, 2003; Garnier *et al.*, 2009; Jullig *et al.*, 2008; Karamanlidis *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2010; Kemi *et al.*, 2007; Sebastiani *et al.*, 2007). Cette

altération de la biogénèse mitochondriale favorise la perte des capacités mitochondriales.

En conclusion, le métabolisme et plus particulièrement la biogénèse mitochondriale apparaissent comme essentiel dans l'adaptation musculaire à une surcharge de travail, par un maintien des capacités de production et de transfert d'énergie.

Sachant que les stress pathologiques s'accompagnement le plus souvent d'un remodelage de l'architecture cellulaire, il est donc particulièrement intéressant d'étudier la corrélation pouvant exister entre l'architecture cellulaire et la plasticité mitochondriale.

Objectifs de l'étude

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Comme nous l'avons vu, la mitochondrie joue un rôle clef dans de nombreux processus cellulaires, en particulier dans les cellules du muscle cardiaque et squelettique. Une de ses propriétés, sa capacité à fusionner et à fissionner, est étudiée depuis une dizaine d'années dans de nombreux types cellulaires, mais de manière étonnante, ce n'est que récemment que ces processus ont commencé à être étudiés dans les cellules musculaires striées qui pourtant possèdent une grande quantité de mitochondrie (Hom & Sheu, 2009b) . Par ailleurs, la mitochondrie joue un rôle primordial dans les phénomènes d'adaptation des cellules musculaires striées pour répondre aux besoins de l'organisme, notamment en réponse à un stress ou à un exercice d'endurance. L'adaptation de ces cellules à une surcharge de travail est permise par l'activation de processus intervenant dans la plasticité mitochondriale. Notre hypothèse est donc que la dynamique mitochondriale pourrait jouer un rôle majeur dans cette adaptation.

Ces dernières années, la protéine OPA1 (Optic atrophy type 1) a été identifiée comme étant l'un des acteurs majeurs de la dynamique mitochondriale en modulant la fusion des membranes internes, et plus largement la fonction mitochondriale (pour revue (Belenguer & Pellegrini, 2012; Landes *et al.*, 2010b)). Par ailleurs, elle participe activement au contrôle-qualité des mitochondries, au métabolisme mitochondrial, à la stabilité de l'ADN_{mt} et à la sensibilité à l'apoptose. Cette dynamine GTPasique apparait essentielle à l'architecture et au maintien des fonctions mitochondriales, car son absence totale induit une létalité embryonnaire (Alavi *et al.*, 2007).

Bien que la protéine OPA1 soit fortement exprimée dans le cœur, très peu d'études ont été menées pour comprendre son rôle dans ce tissu. Pour l'étudier, nous avons décidé d'utiliser un modèle murin hétérozygote pour *Opa1* (*Opa1*$^{+/-}$). Chez ces souris, nous avons regardé l'impact de cette mutation sur la fonction cardiaque, mais aussi sur l'organisation et la morphologie des mitochondries, ainsi que sur leur fonctionnement (capacités oxydatives, fonctionnement du pore de transition de perméabilité, etc.). Ce travail a été rendu possible en combinant

différentes approches de physiologie, de microscopie, de biochimie et de biologie moléculaire.

Une seconde question qui nous intéressait était de savoir l'implication d'OPA1 dans la réponse à un stress physiologique ou pathologique des cellules musculaires striées, et ainsi étudier le lien éventuel entre OPA1 et la mise en place de la biogénèse mitochondriale. En effet, lors d'une surcharge de travail, le myocarde et le muscle squelettique s'adaptent différemment, soit en s'hypertrophiant (pour le cœur), soit en sur-activant la biogénèse mitochondriale (pour le muscle squelettique), ceci dans le but de maintenir une fonction contractile adéquate. Dans les deux cas, la dynamique mitochondriale pourrait jouer un rôle dans la plasticité mitochondriale nécessaire à l'adaptation musculaire. Nous avons donc soumis notre modèle *Opa1*$^{+/-}$ à différentes formes d'hypertrophie physiologique (exercice d'endurance) ou pathologique (sténose de l'aorte), et analysé les effets de la délétion d'OPA1 sur la réponse à ces stress au niveau de la fonction mitochondriale des muscles striés, de la fonction cardiaque, et des capacités d'entraînement des animaux via des techniques d'exploration fonctionnelle, de biochimie et de biologie moléculaire.

Matériels & Méthodes

MATERIELS & METHODES

Chapitre I : MODELE ANIMAL

Afin de comprendre l'importance de la dynamique mitochondriale dans l'architecture et la mise en place du réseau mitochondrial, et dans l'adaptation des mitochondries à un exercice physique, nous avons utilisé un modèle murin transgénique pour la protéine de fusion OPA1. Les avantages d'un tel modèle sont nombreux, dont la rapidité et l'efficacité de reproduction des souris. Toutefois, il ne nous faut pas oublier que l'invalidation totale ou partielle d'un gène, dans le but de provoquer la perte de fonction de la protéine, ne va pas induire que des effets spécifiques. Les observations faites par la suite ne seront donc pas forcément dues uniquement à une modification du rôle de la protéine, mais pourront correspondre à des compensations ou à d'autres adaptations induites par des voies de signalisation touchées.

1. *Description du modèle*

Pour mener à bien nos différentes études, plus de 287 animaux ont été nécessaires.

1.1-Phénotype

Les souris *Opa1*$^{+/+}$ et *Opa1*$^{+/-}$ sont issues de croisements réguliers avec des souris provenant de la souche C57BL/6, à l'aide de couples bigames. Cette souche fut développée par C. C. Little à partir d'un croisement du stock d'A. Lathrop, la colonie C57BL du Jackson laboratory ayant ensuite été subdivisée en sous-lignées (6 et 10) avant 1937. Dans notre cas, cette souche consanguine permet d'entretenir le fond génétique de nos animaux. Les souris *Opa1*$^{+/-}$ transgéniques ont été obtenues en collaboration avec le Dr MV. Alavi (Université de Mayence, Allemagne). Elles ont été conçues par le groupe de Wissinger (Alavi *et al.*, 2007) par une délétion de 26 acides aminés (OPA1 329-355) créant une mutation non sens dans le domaine de l'exon 10. L'expression de cette protéine tronquée au niveau du domaine

GTPasique la rend inactive et provoque sa rapide prise en charge par la voie de dégradation du protéasome. La perte totale de la protéine OPA1 conduit à une mort *in utero* dès 8 jours après la fécondation. L'impossibilité d'obtenir des animaux homozygotes pour cette mutation confirme le rôle essentiel de la protéine OPA1 dans la physiologie cellulaire. Le modèle utilisé est donc une souris hétérozygote, dont le taux d'expression d'OPA1 est diminué de 50 % dans l'ensemble de ses tissus, par rapport à celui de souris non mutées provenant du même élevage.

A partir de 10 mois, ce modèle murin développe les mêmes symptômes caractéristiques de l'atrophie optique observés chez l'homme, visibles par une atteinte du nerf optique, ainsi qu'une dégénérescence progressive des cellules du ganglion rétinien. Ainsi, pour éviter une éventuelle influence de leur cécité grandissante sur le résultat de nos expériences, il a été choisi de mener l'ensemble des investigations uniquement sur les mâles *Opa1*$^{+/+}$ et *Opa1*$^{+/-}$ âgés de 6 mois, ou bien à 8 mois une fois leur entraînement physique terminé.

Les pratiques expérimentales ont été réalisées dans le respect des directives européennes relatives aux soins et à l'utilisation des animaux (directive 2010/63/UE), et approuvées par les autorités juridiques (décret français n °. 92-284, Juin 27, 2007).

1.2-Hébergement

La souche C57BL/6 est très sensible à son environnement et à l'ordre social dans la cage. Pour cette raison, les souris ont été hébergées dans un environnement contrôlé : bénéficiant de la nourriture et de l'eau *ad libitum,* d'un cycle jour/nuit alterné de 12 h, d'une température de 22°C et d'une pression constante, et d'un nombre d'individus par boite variant de 1 à 5. Pour les tests comportementaux, les animaux étaient par contre hébergés par lot de 3 à 5 individus par boite.

1.3-Sacrifice

Selon le type d'expériences, les animaux ont été sacrifiés par deux méthodes différentes. Pour les expériences effectuées sur cœurs isolés, les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (200mg/kg), avant de subir une thoracotomie. Le cœur ainsi prélevé était rapidement rincé dans une

solution de Krebs sans calcium (composition en mM : NaCl 118 ; $NaHCO_3$ 25 ; KCl 4,7 ; KH_2PO_4 1,2 ; MgSO4 1,2 ; BDH 2,5 ; Glucose 7 ; Mannitol 1,1) à 4°C, puis canulé au niveau de l'aorte permettant ainsi une perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff. Pour les expériences menées sur les paramètres anatomiques, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. S'en suivait un rapide prélèvement du cœur dont le ventricule gauche, puis les muscles squelettiques (gastrocnémien superficiel, plantaire, soléaire). Les tissus prélevés étaient brièvement rincés dans une solution de Krebs sans calcium à 4°C, pesés, puis plongés directement dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Une fois les échantillons stockés, les poumons, le foie et le rein gauche étaient prélevés pour être pesés, avant que la longueur du tibia gauche ne soit mesurée.

2. ***Comportement***

Avant de pouvoir mener les tests d'adaptation à un entraînement volontaire, il nous a fallu s'assurer que la mutation ubiquitaire d'OPA1 n'altérait pas le comportement des animaux, ce qui aurait pu modifier leur activité en roue.

Les tests comportementaux de souris (12 *Opa1*$^{+/+}$ et 12 *Opa1*$^{+/-}$) âgées de 6 mois ont été réalisés en collaboration avec D.David (Unité EA 3544). La réalisation de ce tests nécessite le respect de certaines conditions : 1) réaliser l'étude sur des animaux élevés par lot de 3 à 5 individus/cage; 2) manipuler les souris exclusivement à l'aide de gants pour éviter de les humaniser ; 3) effectuer l'ensemble des tests sur les mêmes animaux, en allant du test le moins stressant au plus éprouvant pour ne pas biaiser les résultats obtenus. Les tests ont été réalisés dans l'ordre suivant: test de l'open field, test de l'elevated plus maze, test de suspension caudale et le test rotarod, avec un repos minimum de 3 jours entre les tests. L'ensemble des tests comportementaux s'est déroulé entre 10h00 et 14h00. Afin d'éviter des biais dus aux marques olfactives, chaque équipement était minutieusement nettoyé après chaque essai avec du chlorure de benzalkonium dilué.

2.1-Test de l'open field ou test de champ ouvert

Initialement décrit par Hall (1934), le test de l'Open field a été développé dans le but de mesurer des différences de réactivité émotionnelle chez le rat.

Ce test est l'un des plus utilisés en psychopharmacologie, il consiste à placer l'animal dans un environnement inconnu et spacieux, puis à observer son activité déambulatoire, comme mesure de sa réactivité émotionnelle (**Figure 32**). En plus des informations sur l'activité locomotrice, ce test permet de prédire une activité de type anxiolytique. En effet, le fait de se retrouver dans un espace inconnu génère une situation conflictuelle entre la tendance naturelle de la souris à vouloir explorer ce nouvel environnement, et son aversion pour les espaces ouverts (cible pour prédateurs). De ce fait, en général, les animaux présentent un haut degré d'évitement de l'aire centrale par rapport à la périphérie (Dulawa *et al.*, 2004), à contrario d'animaux sous anxiolytiques, qui vont aller plus souvent et passer plus de temps dans l'aire centrale (Prut & Belzung, 2003).

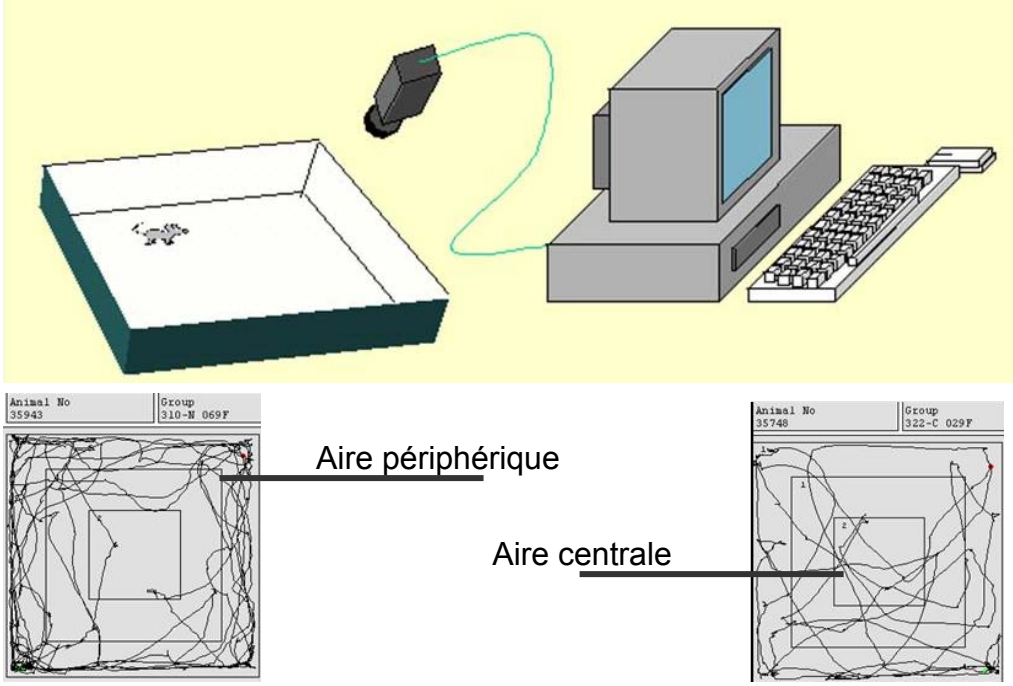


Figure 32 : Test d'Open field chez la souris. *(Modifié de Hong CJ, Oct 15, 2006)* Classiquement, les souris se déplacent sur les cotés de la cage (photo gauche). L'administration d'un anxiolytique augmente le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale de l'arène chez la Souris (photo droite).

Le dispositif utilisé était constitué de 4 champs ouverts, automatisés par l'utilisation d'un logiciel. Chaque champ comporte une enceinte carrée (40x 40cm) en PVC transparent et fond blanc (Activity Monitor, MED Associates, Georgia, VT, USA), et deux lignes de faisceaux infrarouges permettant de mesurer les déplacements horizontaux et verticaux de la souris. Le test se déroulant entièrement

dans le noir, les animaux sont d'abord habitués à ces conditions pendant 15min, puis sont placés dans un coin du champ, et le logiciel d'acquisition aussitôt lancé. Les variables dont l'activité ambulatoire totale (distance parcourue), le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale, ainsi que le nombre de redressements, sont enregistrées pendant 30min, en l'absence d'expérimentateur dans la pièce.

2.2-*Test elevated plus maze (EPM) ou le labyrinthe en croix surélevée*

Il s'agit du test le plus populaire et le plus couramment utilisé pour détecter un comportement anxieux chez les rongeurs, développé d'abord chez le rat (Pellow & File, 1986), puis chez la souris. Le test exploite le dilemme de l'animal qui oscille entre l'envie naturelle d'explorer et ses peurs pour les espaces ouverts et le vide. L'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe (**Figure 33**).

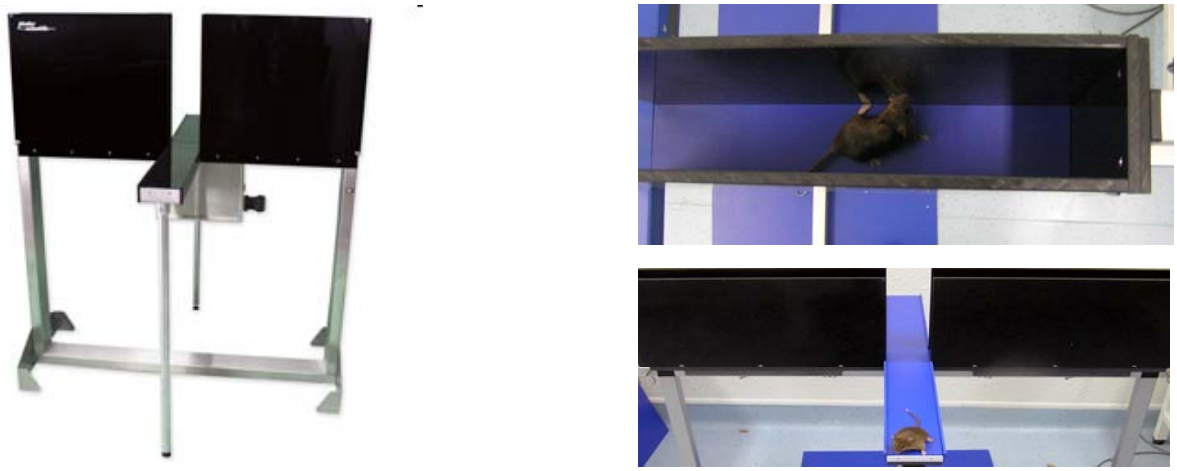


Figure 33 : Test d'elevated plus maze chez la souris. Classiquement, les souris restent majoritairement dans les bras fermés (photo droite-haut). Lors d'un traitement par anxiolytiques, le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts augmentent (photo droite-bas). *(Crédit photo : Lafayetteneuroscience; D.David)*

Le labyrinthe en forme de croix est constitué de 2 bras fermés (avec parois latérales) et de 2 bras ouverts (sans parois) opposés reliés par une plate-forme centrale, le tout surélevé de 50cm par rapport au sol et éclairé de façon homogène par une lampe de faible puissance (20Watts). Les bras fermés représentent la sécurité, alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratoire. Plus une souris

est anxieuse, plus elle va hésiter avant d'explorer un bras ouvert, et moins elle va s'y aventurer (Lira *et al.*, 2003; Ramboz *et al.*, 1998). La souris est placée au centre de la croix et peux explorer librement le labyrinthe pendant 5min, pendant lesquelles son activité exploratoire est enregistrée à l'aide d'une caméra placée au dessus du dispositif et reliée à un logiciel de suivi (ANY-Maze, Stoelting Co, IL, USA). Durant ce laps de temps, les paramètres suivants sont comptabilisés : le temps passé dans les différentes régions du labyrinthe ainsi que le nombre d'entrées dans ces zones. Le nombre global d'entrées dans les différentes régions du labyrinthe constitue quant à lui un indice supplémentaire de locomotion des animaux.

2.3-Test de suspension caudale

Ce test est rapide et facile à mettre en place, car entièrement automatisé. Il fait partie de l'un des tests d'évaluation de la dépression les plus anxiogènes utilisés chez les rongeurs, initialement développé par Steru et ses collaborateurs en 1985 (Mayorga & Lucki, 2001; Steru *et al.*, 1985).

Le principe repose sur le comportement de la souris essayant de se libérer de son accrochage, par la mesure de sa force déployée au cours de ses agitations, ainsi que sur la durée de ses mouvements (**Figure 34**).

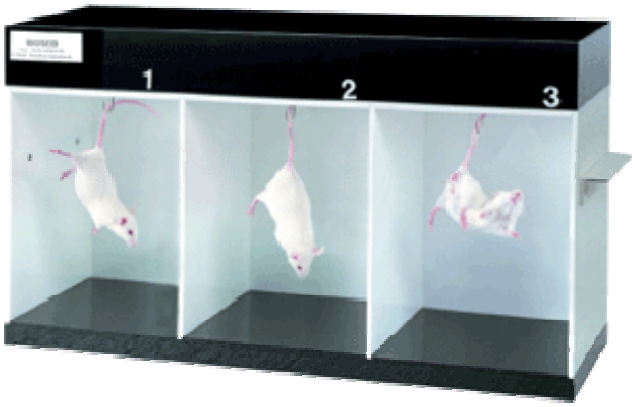


Figure 3 : Test de suspension caudale chez la souris. Les souris contrôles (n°3) vont tenter d'échapper à cette situation contraignante de manière beaucoup plus énergique et longue que ne le ferait une souris dépressive qui se résignera plus rapidement (n°2).
(*Crédit photo : Eb Instrument*)

Le dispositif est constitué de 6 chambres de suspension, reliées à un ordinateur permettant d'enregistrer les différents paramètres de l'expérience : temps d'immobilité, valeurs d'énergie et de puissance en mouvement. Les souris sont suspendues par la queue avec du ruban adhésif à un crochet relié à un capteur qui enregistre les variations de mouvements (Bio-TST2, Bioseb, Vitriolles, France).

Pendant les 6min de test, les souris alternent les phases d'agitation et d'immobilité, elles se débattent vigoureusement en début de test, puis finissent progressivement par abandonner. La durée d'immobilité permet de déterminer leur seuil de résignation.

2.4-Test rotarod ou test du cylindre rotatif

Il s'agit d'une méthode simple et automatisée pour évaluer la coordination motrice et l'équilibre des rongeurs via la mesure de leurs capacités de maintien sur une barre en rotation (Minasyan *et al.*, 2009; Stemmelin *et al.*, 2008) (**Figure 35**).

Le dispositif est composé d'un cylindre de 50 cm de long avec un système de grip et d'un diamètre de 3,2 cm, délimité en 5 compartiments par des cloisons, ce qui permet de soumettre simultanément 5 souris au test sans qu'elles interfèrent entre elles. Chaque souris est placée sur le cylindre pendant 3min, avec une accélération de la vitesse de rotation constante allant de 4 à 40 rpm. Dès que l'animal chute de sa position, il est aussitôt remis sur le cylindre, autant de fois que nécessaire jusqu'à la fin du test. La latence avant de tomber est utilisée comme un indicateur de la coordination motrice, et le nombre de chutes au cours du test comme celui de l'équilibre des animaux.

Figure 35 : Test du rotarod chez la souris. Les souris contrôles vont être capables de suivre la vitesse de rotation de la barre, tandis qu'une souris souffrant de troubles moteur et de coordination en sera incapable.
(*Crédit photo :Bioseb ; Eurekalert*)

Chapitre II : ETUDE DES PARAMETRES ANATOMIQUES ET FONCTIONNELS

Pour étudier l'effet de la mutation OPA1 sur les capacités d'adaptation à un effort physique, les animaux ont été soumis à différents efforts, allant du stress chronique physiologique, au stress chronique pathologique, en passant par le stress aigu. De plus, nous avons aussi voulu savoir si le génotype murin influençait la fonction cardiaque, la pression artérielle et le métabolisme sanguin de ces animaux.

1. *Induction d'un stress physique volontaire, forcé ou pathologique*

1.1-Stress physiologique : Activité physique volontaire dans une roue

Pour induire un stress physique chronique, les animaux ont été soumis à une activité physique volontaire dans des roues (**Figure 36**). Le groupe des souris entrainées représentait 36 animaux (19 *Opa1*$^{+/+}$ et 17 *Opa1*$^{+/-}$), qui ont été soumis à un entraînement physique de 8 semaines à partir de l'âge de 6 mois. Parallèlement, 33 animaux sont restés dans leur cage d'élevage jusqu' à l'âge de 8 mois, pour former le groupe des sédentaires (17 *Opa1*$^{+/+}$ et 16 *Opa1*$^{+/-}$).

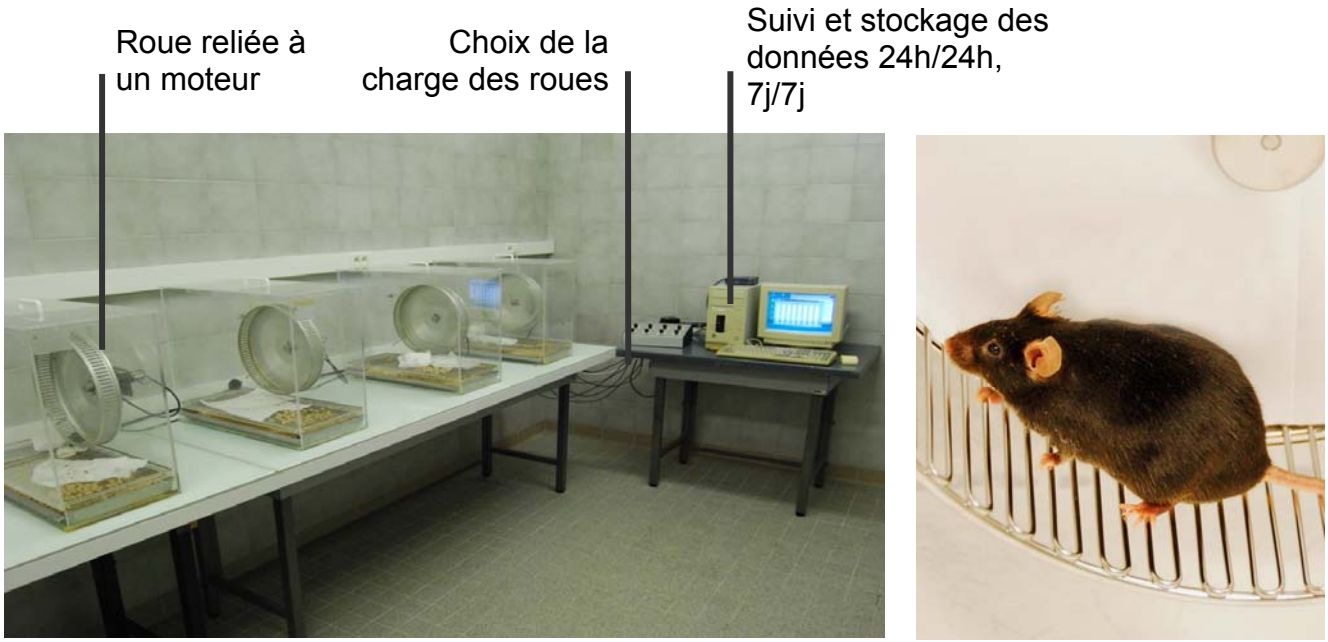


Figure 36 : Activité physique volontaire des souris dans une roue. Les souris entrainées disposent de leur propre cage avec roue et environnement amélioré, pour s'y entrainer selon leur volonté pendant 8 semaines.
(*Crédit photo :F.Caffin, Mdc-berlin*)

Les animaux ont été logés individuellement dans des cages en plexiglas (origine : Bionox, Ancy, France) équipées de roue et avec accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau (De Sousa *et al.*, 2002; Momken *et al.*, 2004). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une roue d'un diamètre de 31,8 cm et 5 cm de largeur, connectée à un moteur permettant de contrôler la résistance de la roue (25 x 10^{-3} N.m). Les acquisitions ont été obtenues en continu à l'aide du logiciel « Macactiv » conçu au laboratoire par P. Lechêne. La vitesse instantanée, calculée à partir de la tension et la charge résistive sur le générateur, a permis de quantifier la distance parcourue quotidiennement. Tous les paramètres ont été moyennés par semaine et par animaux.

1.2-Stress physiologique : Activité physique forcée sur un tapis roulant

Pour obtenir un stress physique aigu, les animaux ont été soumis à une activité physique forcée sur tapis roulant (MEDICAL DEVELOPPEMENT) selon un protocole établi par A. Prola (**Figure 37**). Près de 31 animaux (16 *Opa1*$^{+/+}$ et 15 *Opa1*$^{+/-}$) de 6 mois ont été testés, ainsi que 18 animaux de 8 mois, repartis en deux groupes : sédentaires (3 *Opa1*$^{+/+}$ et 3 *Opa1*$^{+/-}$) et entrainés (7 *Opa1*$^{+/+}$ et 5 *Opa1*$^{+/-}$).

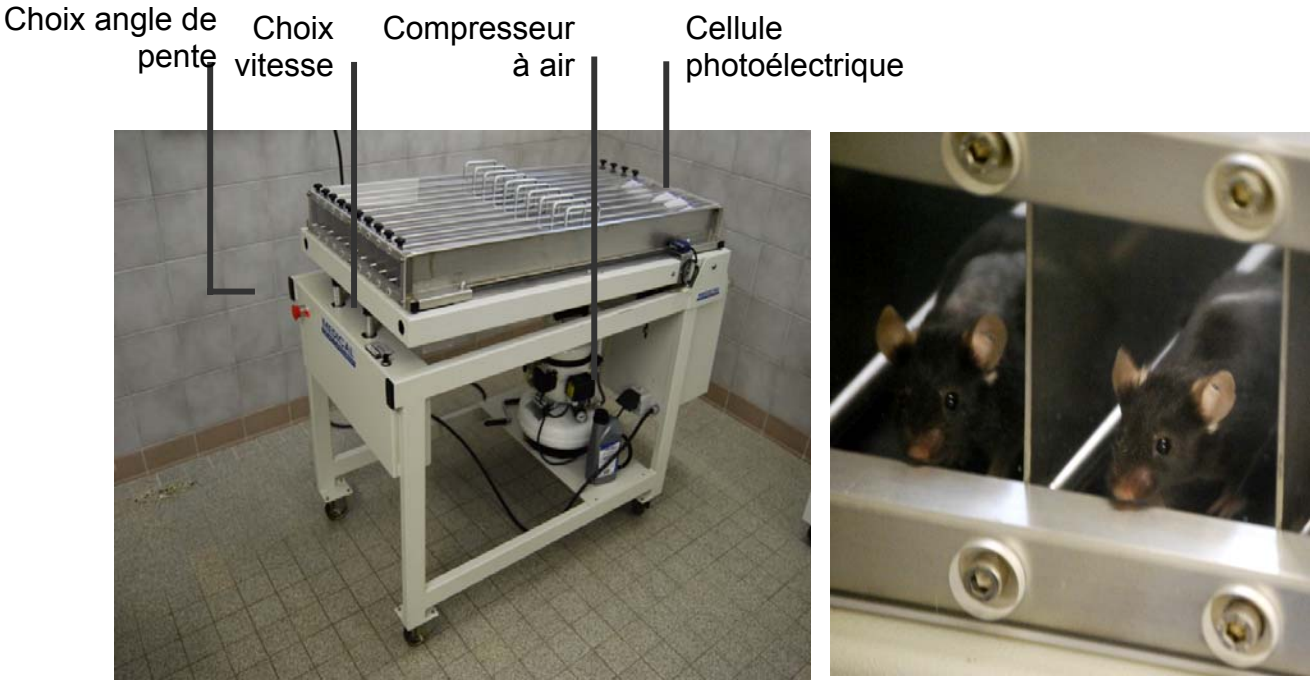


Figure 37 : Activité physique forcée des souris sur tapis roulant.
Les souris entrainées ou sédentaires disposent d'une ligne de course individuelle et effectuent sur ce tapis deux habituations (J-4, J-3), puis le test de leur vitesse maximale (J0) et pour finir un test d'endurance jusqu'à épuisement (J+2).
(*Crédit photo :F.Caffin*)

Pour maintenir leur motivation à la course lors des différentes mises sur tapis, les animaux ont été soumis à une propulsion d'air comprimé déclenchée par leur passage devant une cellule photoélectrique située en bout de tapis.

Avant de commencer les expériences, les souris ont été habituées au fonctionnement du tapis roulant et à la pratique d'un exercice par le biais de deux mises en condition de 12 min avec une pente de 4% (**Tableau 4**).

J-4 : **1ère Initiation au tapis**.

	Durée (min)	**Intensité (m/min)**	**Intensité (Km/h)**	**Temps (min)**
1ère séance	2	10	0,6	2
	4	13	0,8	6
Pente 4%	2	15	0,9	8
	2	16,5	1,0	10
	2	18	1,1	12

J-3 : **2nde Initiation au tapis**.

	Durée (min)	**Intensité (m/min)**	**Intensité (Km/h)**	**Temps (min)**
2nde séance	2	13	0,8	2
	2	16	1,0	4
Pente 4%	2	18	1,1	6
	4	20	1,2	10
	2	22	1,4	12

Tableau 4 : Protocole des séances d'initiation au tapis des souris. Partie supérieure en J-4 **et partie inférieure** en J-3. Initiation au tapis de course à une vitesse modérée pendant 12 min

Les animaux ont ensuite été mis au repos pendant 2 jours avant d'effectuer le premier test pour déterminer leur vitesse maximale aérobie (VMA) à une pente de 4%. Après un bref échauffement de 6 min à 10 m/min, la vitesse du tapis a été progressivement augmentée par étape de 3,3 m/min toutes les 1,5 min, pendant 9 min, puis augmentée par l'étape de 3,3 m/min toutes les minutes. La performance vitesse maximale était identifiée lorsque les animaux testés devenaient incapables de maintenir la vitesse croissante du tapis roulant.

Les animaux ont été de nouveau mis au repos pendant 2 jours avant d'effectuer le second test pour mesurer l'endurance à un effort modéré pour une pente de 4%. Pour être en condition d'endurance aérobie et après un échauffement progressif de 6 min à 10m/min, les animaux ont été forcés à courir à 60% de leur propre VMA, jusqu'à épuisement.

1.3-Stress pathologique : Surcharge hémodynamique

Afin d'induire une surcharge hémodynamique dans notre modèle murin, nous avons eu recours à une chirurgie invasive pour induire un stress chronique pathologique. Sous anesthésie à l'isoflurane, les souris ont subi une ouverture intercostale pour dégager la crosse aortique. A l'aide d'un guide, une ligature partielle de l'aorte ascendante a été effectuée afin de créer une sténose partielle du flux sanguin (TAC, *Transversal aortic constriction*). En parallèle, un groupe de souris contrôles (SHAM) a été opéré dans les mêmes conditions, sans la pose du clip aortique. Ces opérations ont été effectuées sur des animaux de 4 semaines par P. Mateo, puis suivis jusqu'à leur sacrifice 6 semaines plus tard. Pour ces expériences, nous avons eu recours à l'utilisation de 26 souris SHAM (12 *Opa1*$^{+/+}$ et 14 *Opa1*$^{+/-}$) et 26 souris TAC (13 *Opa1*$^{+/+}$ et 13 *Opa1*$^{+/-}$).

2. Mesure non invasive de la fonction cardiaque par échocardiographie

La fonction cardiaque a été suivie par échocardiographie avec l'aide de P. Mateo pour estimer l'impact de l'induction du stress pathologique sur nos souris *Opa1*, et identifier si le génotype de ces souris induisait une réponse différente.

L'exploration de la fonction cardiaque a été effectuée à l'aide d'une sonde adaptée à la taille des petits animaux (Vivid 7, 12MHz, General Electric Healtcare). Afin de pouvoir effectuer les mesures, il était nécessaire de réaliser une anesthésie préalable de l'animal, car les mesures nécessitent que la sonde reste plusieurs secondes à un endroit fixe. L'immobilisation indispensable des souris pour obtenir des mesures fiables a été obtenue à l'aide d'une anesthésie légère par inhalation d'isoflurane à 2,5%, ce qui évite également la diminution de la fréquence cardiaque. Une fois les souris anesthésiées, les différents branchements pour la mesure de l'électrocardiogramme ont été installés sur les pattes de l'animal. Une épilation

chimique sur le thorax a été alors appliquée pour permettre à la sonde de glisser plus facilement sur la cage thoracique et limiter aussi les bruits de fond causés par les bulles d'air contenues dans le pelage. Le dispositif utilisé a permis de déterminer le diamètre de la cavité du ventricule gauche en diastole (Dtd) et en systole (Dts), l'épaisseur pariétale postérieur (PP) et intraventriculaire (SIV) ainsi que la fréquence cardiaque à partir des images en 2D acquises (**Figure 38**). Ces données brutes ont également permis de déterminer les paramètres de contraction du myocarde, tels que : la fraction de raccourcissement (FR = [Dtd-Dts)/Dtd] x 100), les volumes télédiastolique (Vtd) et télésystolique (Vts), en ayant recours à la formule de Teicholz (Vtd = 7 Dtd^3 / (2.4 + Dtd)) et à la fraction d'éjection (FE = [(Vtd-Vts)/Vtd] x 100).

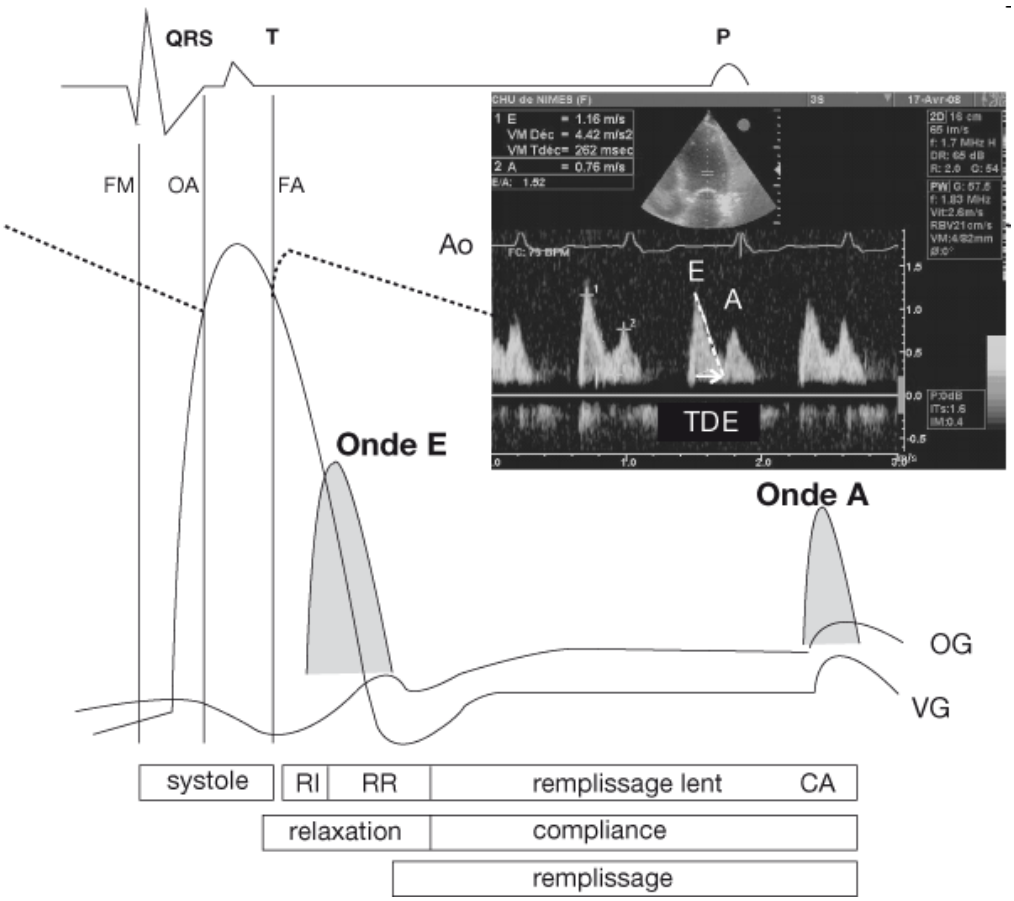


Figure 38 : Echographie doppler pulsée mitral en 2D des souris.
Chez les souris SHAM et TAC, les flux sanguins intracardiaques ont été explorés en parallèle des autres paramètres cardiaques (diamètre et épaisseur de la paroi musculaire). (*Source : Muller L., Lefrant J.-Y.; Congrès national d'anesthésie et de réanimation 2008. Les Essentiels, p. 553-594*)

3. Mesure non invasive de la pression artérielle

Le système d'enregistrement des pressions et des volumes (CODA, Emka technology) permet une mesure rapide et automatique de la pression artérielle chez la souris éveillée sans chirurgie. Cette approche non invasive de la pression artérielle a été réalisée sur 19 souris (9 *Opa1*$^{+/+}$ et 10 *Opa1*$^{+/-}$) âgées de 6 - 7 mois.

Afin d'effectuer les mesures, les souris ont été placées sur une plateforme chauffante afin d'augmenter l'afflux sanguin dans la queue, améliorant la détection des signaux. Les animaux ont été maintenus dans un tube de contention, et la pression caudale était effectuée par le biais d'un manchon et d'une bague d'occlusion appliquée sur leur queue (**Figure 39**). Le rythme cardiaque a été simultanément détecté par un capteur. Le gonflage du manchon et de la bague ont été assurés de manière contrôlée et automatique par le système, équipé d'une pompe interne. La pression appliquée par la bague augmentant (correspond à la pression systolique), le signal du rythme cardiaque a diminué jusqu'à disparition dans le manchon posé en aval. La pression a été alors relâchée jusqu'à ce que le signal du rythme cardiaque soit de nouveau perçu. Lorsque la valeur pression revenait à son taux initial, cela correspondait à la pression diastolique. Pour obtenir des mesures de qualité, fiables et reproductibles, il a été respecté deux points méthodologiques : 1) les souris ont été habituées à l'appareillage pendant 2 jours consécutifs, afin de réduire le stress associé à la manipulation, à la contention et au dispositif placé autour de la queue de la souris, et ainsi améliorer la fiabilité des mesures. 2) le jour de la mesure, chaque souris recevait d'abord 6 cycles de gonflage/dégonflage pour les acclimater, puis la pression artérielle moyenne était déterminée à partir des 6 cycles de mesure suivants.

Figure 39 : Mesure de la pression artérielle chez les souris. Afin de mesurer leur tension, les souris sont maintenues à l'aide de tube de contention, pour leur installer le dispositif de mesure sur leur queue. (*Source : Article.wn*)

4. Mesure non invasive des lipides et glucides sanguins

Pour s'assurer que les animaux ne souffrent d'aucun désordre métabolique risquant de perturber leur activité physique, leur taux de lipides et de glucides circulants a été mesuré à l'aide du système Alere Cholestech LDX ®. Cette approche non invasive a été réalisée sur 19 souris (10 *Opa1*$^{+/+}$ et 9 *Opa1*$^{+/-}$), âgées de 6 mois, avant et après leur épuisement à un effort physique forcé.

La ponction sanguine a été effectuée au niveau de la joue supérieure des animaux, une partie du corps possédant une forte irrigation. Un coup d'aiguille était appliqué au niveau de la zone d'irrigation provoquant la sortie du sang, puis, à l'aide d'une seringue héparinée (solution 50 USP/ml) sans aiguille, le sang était directement recueilli, soit en moyenne un volume de 0,5ml. Le sang prélevé était ensuite homogénéisé avec l'héparine à l'intérieur de la seringue par aspiration-refoulement, pour éviter la formation de caillot sanguin susceptible d'obstruer les cassettes de mesures. Cette étape réalisée, 50 µL de sang était déposé sur la cassette (Profil lipidique-GLU cassette), jusqu'à sa diffusion aux extrémités. La cassette était alors introduite dans le système qui effectuait une lecture automatique, et indiquait les résultats obtenus par le biais d'une impression. Ces cassettes permettent le dosage du cholestérol total (TC), des lipoprotéines de haute densité (HDL ; «bon cholestérol»), des triglycérides (TRG), ainsi que du glucose (GLU) contenu dans le sang. Elles indiquent également le rapport TC/HDL, le taux de cholestérol non-HDL et estiment le taux de lipoprotéines de basse densité (LDL ; « mauvais cholestérol»).

Chapitre III : ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

La protéine OPA1 étant une protéine indispensable dans le processus de dynamique mitochondriale, sa mutation doit certainement provoquer des effets sur la structure et le fonctionnement de la mitochondrie. Afin d'évaluer l'impact de sa diminution sur le réseau et l'architecture des mitochondries, divers techniques de microscopie complémentaires ont été employées. De même, l'étude de son rôle sur les propriétés fonctionnelles de l'organite a nécessité les mesures des capacités oxydatives et de la sensibilité à la mort cellulaire, via l'analyse des propriétés d'ouverture du PTP.

1. *Analyse de l'architecture cellulaire et du réseau mitochondrial*

1.1-Observation qualitative de l'architecture du réseau par microscopie électronique à transmission (MET)

Cette technique nous permet d'accéder à la fois à la structure globale de la cellule cardiaque, mais également à la morphologie des mitochondries et à leur organisation interne.

Le premier prototype de microscope électronique a été construit en 1931 par E. Ruska et M. Knoll. Bien que les microscopes électroniques modernes possèdent un grossissement des objets allant jusqu'à 2.000.000 de fois, ils fonctionnent toujours sur le principe du premier prototype. Ce dispositif est basé sur l'utilisation de lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former un faisceau d'électrons qui illumine l'échantillon et permet d'en créer une image très agrandie. L'image détectée par le CCD est ensuite dirigée vers un ordinateur. La résolution maximale et le grossissement sont plus grands pour la microscopie électronique, car, contrairement aux microscopes optiques, la résolution n'est pas limitée par la longueur d'onde des électrons (plus petite qu'un photon de lumière visible), mais par les aberrations dues aux lentilles magnétiques. En effet, la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre, ce qui permet d'observer la structure interne des organites tel que l'aspect des crêtes mitochondriales.

Bien que ce dispositif soit extrêmement puissant, il nécessite un contrôle précis de l'environnement de son utilisation (sensible aux vibrations et aux champs magnétiques externes), ainsi qu'une préparation rigoureuse des échantillons. Les tissus doivent être préparés de façons à être stabilisés, avec une épaisseur réduite et un contraste accru, pour être ensuite examinés dans le vide, ce qui évite la dispersion des électrons par l'air.

1.1.a-Préparation des échantillons

Ce protocole est effectué avec l'aide de D. Fortin et se déroule sur 4 jours : Une fois la souris sacrifiée par élongation cervicale, les tissus sont récupérés (gastrocnémien supérieur et papillaires cardiaque), puis brièvement lavés dans une solution de Krebs sans calcium à 4°C. Les muscles sont ensuite étirés à 25% à l'aide de micro-épingles réparties aux extrémités. La solution saline est alors remplacée par une solution fixant les protéines membranaires (en mM : Na-Cacodylate 150 ; HCl 3,6 ; $MgCl_2$ 2 ; EGTA 1 ; Glutaraldéhyde 2% ; pH 7,3) et les tissus y sont incubés pendant 30min. Après ce laps de temps, pour permettre une meilleur diffusion du fixateur dans les fibres les plus profondes du morceau étiré, les extrémités contenant les épingles sont éliminées et le morceau central divisé en deux transversalement à l'aide d'un scalpel. Les 2 morceaux ainsi obtenus sont incubés pendant 20min dans la même solution. Les morceaux sont ensuite séparés dans des microtubes contenant de la solution de fixation et remis à fixer pendant 45min. Le fixateur est ensuite éliminé à l'aide d'une dizaine de rinçages dans une solution exempte de glutaraldéhyde (en mM : Na-Cacodylate 150 ; HCl 3,6 ; $MgCl_2$ 2 ; EGTA 1 ; pH 7,3) pendant 10min. Les tissus bénéficient ensuite d'une étape de fixation des lipides membranaires de 45min à l'aide d'une solution d'osmium (en mM : Na-Cacodylate 150 ; HCl 3,6 ; $MgCl_2$ 2 ; EGTA 1 ; Osmium 1% ; pH 7,3). Les tissus ayant pris une teinte foncée sont ensuite lavés plusieurs fois à l'eau distillée pendant 10min, avant de subir un traitement à l'acétate d'uranyle pour contraster les membranes. Ce traitement se fait sur la nuit à l'abri de la lumière dans une solution saturée.

Le lendemain matin, les échantillons sont déshydratés par des bains d'alcool successifs ayant une concentration croissante, puis par des bains d'acétone, avant d'être plongés dans un mélange acétone-durcupan durant 1h. L'imprégnation progressive des fibres en durcupan se fait par l'augmentation régulière de sa proportion, due à l'évaporation naturelle de l'acétone sur la nuit (tube ouvert).

Au troisième jour, les tissus sont disposés dans un bloc selon une orientation précise (longitudinale ou transversale) avec leur identifiant dans du durcupan, puis inclus par polymérisation 24h à 60°C.

1.1.b-Analyse des préparations

Les échantillons sont ensuite transformés, puis analysés par notre collaboratrice M. Novotova. Ils sont transformés en coupes ultrafines de 60-90nm d'épaisseur, au moyen d'un ultramicrotome muni d'une lame de diamant. Ces tranches sont ensuite contrastées par une courte incubation au citrate de plomb et enfin insérées dans la chambre sous vide du MET (JEM 1200) afin d'y être analysées avec des grossissements allant de x7.500 à x50.000.

1.2-Observation quantitative du réseau par microscopie confocale

Afin de pouvoir confirmer et quantifier les observations faîtes par microscopie électronique sur le réseau et la structure des mitochondries, des observations complémentaires ont été réalisées par microscopie confocale, sur cardiomyocytes isolés.

Le fonctionnement d'un microscope optique est similaire à un microscope électronique, à la différence que, dans ce cas-ci, ce sont les lentilles en verre qui font converger la lumière sur l'échantillon pour former l'image, et le grossissement est limité à 2.000 fois. En microscopie confocale, la résolution latérale maximum n'est que de 180-160 nm (contre 0,08 nm pour MET) et de l'ordre de 600 nm en Z (profondeur). Ces conditions techniques permettent seulement d'observer l'aspect et l'organisation des mitochondries, et non leur structure interne.

1.2.a-Préparation des cellules

Pour obtenir des cardiomyocytes fraichement isolés, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (200mg/kg), puis ont subis une thoracotomie. Le cœur ainsi prélevé a été rapidement rincé dans une solution de Krebs sans calcium à 4°C, puis canulé au niveau de l'aorte permettant une perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff avec une solution tampon I à 37°C (composition en mM : NaCl 113 ; Taurine 30 ; Glucose 20 ; HEPES 10 ; BDM 10 ; KCl 4,7 ; $NaHCO_3$ 1,6 ; $MgSO_4$ 1,2 ; KH_2PO_4 0,6 ; NaH_2PO_4 0,6 ; pH 7,4)

pendant 4min. Cette étape de lavage était suivie d'une étape de digestion par l'ajout de libérase (0,042mg/mg ; Libérase blenzyme 3 TM research grade, Roche) à la solution I, permettant la digestion de la matrice extracellulaire en 7-10min. Ce délai écoulé, la réaction de digestion était immédiatement arrêtée par transfert du cœur dans 10ml de solution III, supplémentée en BSA (5mg/ml) et calcium (200µM). L'aorte et les oreillettes étaient ensuite éliminées, avant un rapide découpage des ventricules en petits morceaux à l'aide de ciseaux. Cette grossière séparation des cellules était ensuite affinée par de délicats mouvements d'aspiration-refoulement par une pipette à embout rodé. Les cellules étaient ensuite séparées des débris de tissus conjonctifs par une simple filtration sur tissu nylon. Puis, à l'aide de deux étapes de décantation cellulaire et changement de milieu, les cellules subissaient une remontée progressive de calcium de 0,2 à 1mM (solution IV, V) en 20min. Les cardiomyocytes isolés ont ensuite été répartis dans des boites (diamètre 2cm) munies d'un fond de verre recouvert de laminine, et incubées 2h à température ambiante pour permettre la fixation des cellules au support.

	Solution I	**Solution II**	**Solution III**	**Solution IV**	**Solution V**
Volume Tampon isolation	50 ml	30 ml	20 ml	20 ml	10 ml
[Libérase]	-	0,042 g/L	-	-	-
[$CaCl_2$]	-	-	0,2 mM	0,5 mM	1 mM
[BSA]	-	-	5 g/L	5 g/L	-

1.2.b-Chargement des sondes

Une étape de marquage spécifique des mitochondries et de la cellule a ensuite été réalisée avant l'acquisition par microscopie confocale. Une fois fixés (en solution V), les cardiomyocytes étaient incubés en présence de Mito-Tracker Orange (MTO, 500nM) et de calcéine (1µM) pendant 45min (Molecular Probes, Inivtrogen). Le MTO permet de marquer spécifiquement les mitochondries des cellules vivantes, car son accumulation dépend du potentiel membranaire. De même, la fluorescence de la calcéine est activée par des estérases, et permet de marquer l'ensemble du cytosol et les différents compartiments cellulaires du cardiomyocyte. Les cellules mortes n'ayant pas d'estérases actives, seules les cellules vivantes sont marquées.

Après un bref lavage des cellules avec la solution V, la fluorescence émise par les cellules a été mesurée à l'aide d'un microscope confocal Carl Zeiss LSM-510. Le MTO est excité à la longueur d'onde 568nm et sa fluorescence est récupérée à celle de 570nm, tandis que la calcéine est excitée à 488nm et sa fluorescence émise à 515-530nm.

S'en est suivi alors une acquisition semi-automatisée de différentes cellules avec un grossissement x63 (objectif à huile), en résolution 1480 x 1480. Chaque cellule a été photographiée individuellement à différent niveau axe *z*, pour ainsi couvrir toute l'épaisseur de la cellule, en 60-80 coupes espacées de 0,29µm, et permettre sa reconstruction en 3 dimensions.

1.2.c-Traitement et analyse des données

Après l'acquisition de séries d'images des cellules, chacune des coupes est importée puis déconvoluée en 3D à l'aide du logiciel Autoquant X (MédiaCybernetics, Bethesda, MD). Cette étape permet ainsi d'éliminer les bruits de fond qui peuvent parasiter l'image de l'objet entre différentes coupes. Les images ainsi récupérées bénéficient d'un signal plus propre et fiable. Les images traitées sont ensuite analysées à l'aide d'un second logiciel IMARIS (Bitplane company, Zurich) (**Figure 40**).

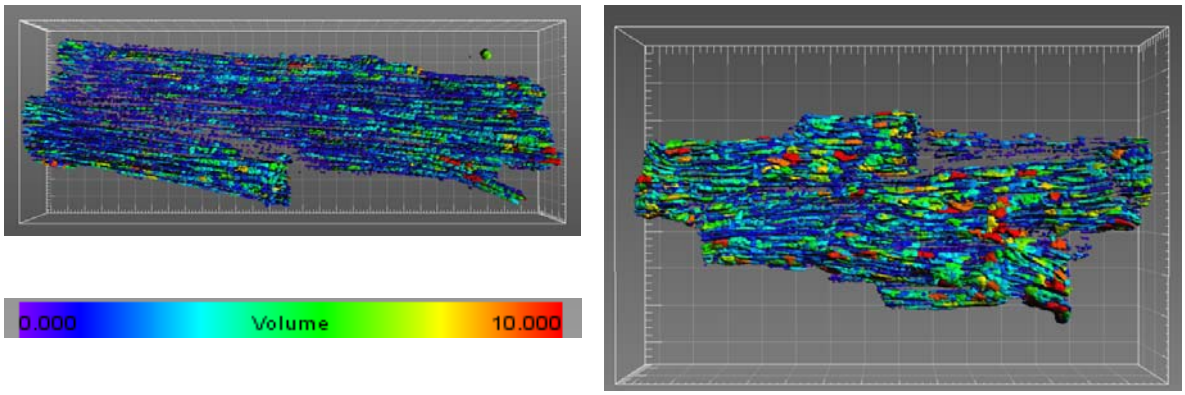


Figure 40 : Mesure des paramètres individuels des mitochondries.
Après l'analyse par le logiciel IMARIS, nous récupérons entre autres une reconstruction 3D qui permet de visualiser la répartition des mitochondries (ci-dessus en fonction du volume). Plus le volume est important, plus le signal est rouge. Donc le cardiomyocyte d'*Opa1*$^{+/-}$ (**droite**) présente une proportion plus importante de mitochondries plus grosses que celui d'*Opa1*$^{+/+}$ (**gauche**). (*Crédit photo : F.Caffin*)

Une fonction de ce logiciel est de pouvoir réaliser une unique reconstruction en 3D à partir des différentes coupes traitées. Mais l'une de ses fonctions la plus intéressante est sa capacité de reconnaissance d'objets. Ainsi, chacune des mitochondries de la cellule est identifiée et analysée, ce qui permet de récupérer différents paramètres tels que le volume individuel de chacune des mitochondries, leur volume moyen, leur sphéricité ainsi que le volume mitochondrial global et le volume cellulaire total. Puis, ces différentes informations sont utilisées pour estimer la distribution morphologique du réseau mitochondrial, aidant ainsi à quantifier l'impact de la mutation OPA1 sur ce réseau mitochondrial.

2. ***Mesure de la fonction mitochondriale in situ sur fibres perméabilisées***

La technique utilisée pour mesurer la respiration mitochondriale est basée sur le principe de la polarographie, technique électrochimique découverte et mise au point par Jaroslav Heyrovsky (1922). Ce qui, par ailleurs, lui a valu le prix Nobel de chimie en 1959. La mesure de respiration mitochondriale *in situ* sur fibres perméabilisées consiste à évaluer la consommation en oxygène dans une chambre de respiration, via une réaction d'oxydoréduction rapide. L'utilisation de fibres perméabilisées apporte de multiples bénéfices par rapport à l'utilisation de mitochondries isolées : 1) l'architecture cellulaire et la disposition des organites entre eux sont préservées ; 2) l'ensemble des mitochondries (subsarcolemmales et intermyofibrillaires) est étudié simultanément ; 3) de part l'étape de perméabilisation, le milieu extramitochondrial est contrôlé précisément ; 4) seule une faible quantité de tissu est nécessaire (10mg) ; 5) les propriétés internes des mitochondries sont conservées (Km ADP, activité enzyme mi-CK) ; 6) cette technique très sensible permet de révéler des altérations dans des pathologies cardiaques ou musculaires.

2.1-Préparation des fibres cardiaques et musculaires perméabilisées

La technique de préparation des fibres cardiaques perméabilisées a été découverte et mise au point par Vladimir Veksler et Valdur Saks en 1987 (Saks *et al.*, 1998; Veksler *et al.*, 1987) et décrite en détail dans (Kuznetsov *et al.*, 2008). Elle permet de mesurer la respiration des mitochondries doublement perméabilisées, d'abord mécaniquement, puis chimiquement.

Pour cela, immédiatement après le sacrifice et le rinçage des tissus dans la solution de Krebs à 4°C, le ventricule gauche ou les muscles sont isolés et transférés dans une solution de dissection (solution S « *skinning* » ; composition en mM : EGTA-CaEGTA 10 ([Ca^{2+}] libre 0,1) ; KOH 70 ; Imidazole 20 ; Mg^{2+} libre 1 ; Taurine 20 ; DTT 0.5 ; MgATP 5,7 ; PCr 15 ; CH_3KO_3S 50 et pH 7,1), permettant de laisser les tissus énergisés et relaxés grâce à l'ATP et la PCr. Les muscles sont alors délicatement disséqués en fins amas de fibres (100-200µm de diamètre) sous loupe binoculaire et avec l'aide de pinces de précision. Cette séparation mécanique des fibres facilite la diffusion de l'oxygène et de la solution au plus près des mitochondries.

La perméabilisation chimique des membranes plasmiques s'effectue par action de la saponine (50µg/ml dans solution S) pendant 30min, à 4°C et sous agitation. La saponine est un détergent doux, qui solubilise les molécules de cholestérol. Or, cette molécule est abondante dans les membranes plasmiques, mais pratiquement absente des autres membranes. Cela provoque la perforation des membranes cellulaires, mais préserve l'intégrité membranaire des autres organites, dont la mitochondrie. Ce détergent est ensuite éliminé par un lavage de 10min à 4°c avec de la solution S, sous agitation. Les fibres sont finalement conservées dans la même solution sans agitation, jusqu'au moment de leur utilisation.

2.2-Mesure de la respiration

Avant les protocoles de mesure de la respiration mitochondriale, les fibres sont lavées 10min dans une solution de respiration (solution R; composition en mM : EGTA 10 ; $CaCO_3$ 2,77 ; KOH 110 ; NaOH 10 ; K_2HPO_4 3 ; Imidazole 20 ; Mg^{2+} libre 1 ; Taurine 20 ; DTT 0,5 ; Glutamate 10 ; Malate 4, CH_3KO_3S 100 ; BSA 2mg/ml et pH 7,1) afin d'éliminer toutes traces d'ADP, ATP et de PCr qui perturberaient l'activité de la chaîne respiratoire. Les fibres sont ensuite placées dans des chambres thermostatées à 22°C contenant 3ml de solution R en agitation continue (**Figure 41**). La consommation en dioxygène des fibres contenues dans les chambres est mesurée à l'aide d'électrodes de Clark reliées à une interface (Oxygen Interface Model 928 Strathkelvin Instruments), qui transmettent les informations générées à un ordinateur. Les données sont enregistrées et analysées par le logiciel Strathkelvin 928 System.

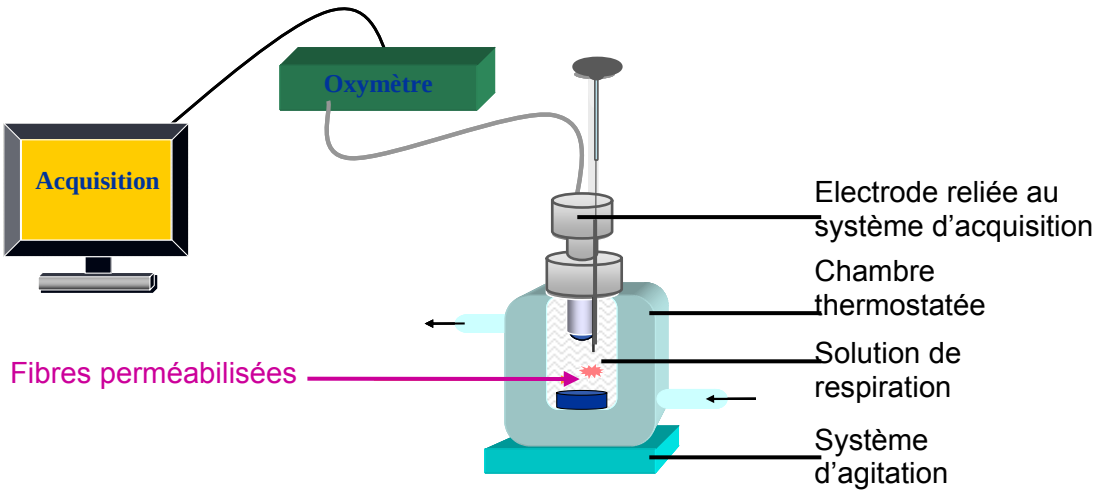


Figure 414 : Système de mesure de respiration des fibres perméabilisées. La mesure de respiration est réalisée grâce à une électrode à oxygène reliée à l'oxygraphe (928 system, Strathkelvin Instruments) et plongée dans une chambre thermostatée où baignent les fibres. (*Modifiée d'après : S. Rimbaud*)

2.2.a-Mesure des capacités oxydatives

Ce premier protocole permet d'évaluer les capacités oxydatives et la régulation de la respiration par les accepteurs de phosphate (ADP & Cr). En absence de fibres, la vitesse initiale (V_i) de la consommation d'oxygène de la membrane en téflon des électrodes est enregistrée. Cette valeur non spécifique sera donc retranchée de chaque valeur de respiration mesurée. Les fibres perméabilisées sont alors ajoutées, et la vitesse de respiration basale (V_o) est mesurée. Elle correspond à la consommation en dioxygène des fibres sans ADP exogène. Ces mesures des paramètres initiaux sont suivies de l'ajout régulier d'ADP (intervalle 2-3min) en concentrations croissantes dans les chambres à l'aide de micro-seringues, jusqu'à atteindre une vitesse de respiration maximale des fibres (V_{max} pour [ADP] = 2mM). Dans ce protocole, le glutamate et malate contenus dans la solution R permettent l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en composés réduits ($NADH,H^+$) et ainsi la mesure de la respiration des complexes I, III et IV. Une variante de ce protocole consiste à le réaliser en présence de Cr saturante (20mM) ajoutée dès le début de l'expérience. Son ajout permet de stimuler la créatine kinase mitochondriale (mi-CK) qui accélère l'approvisionnement en ADP par régénération au niveau local et ainsi augmente l'affinité apparente des mitochondries pour l'ADP. Cette régénération à proximité de l'ANT stimule d'autant plus la respiration mitochondriale. L'intérêt de ce protocole est la possibilité de mesurer l'efficacité du couplage entre

phosphorylation oxydative et fonctionnement de la mi-CK dans les différents modèles étudiés.

2.2.b-Mesure de l'activité des complexes

Le second protocole utilisé a pour but d'étudier l'activité spécifique de chacun des complexes (I, II et IV) de la chaîne respiratoire, à l'aide d'ajouts successifs d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques des différents complexes (**Figure 42**).

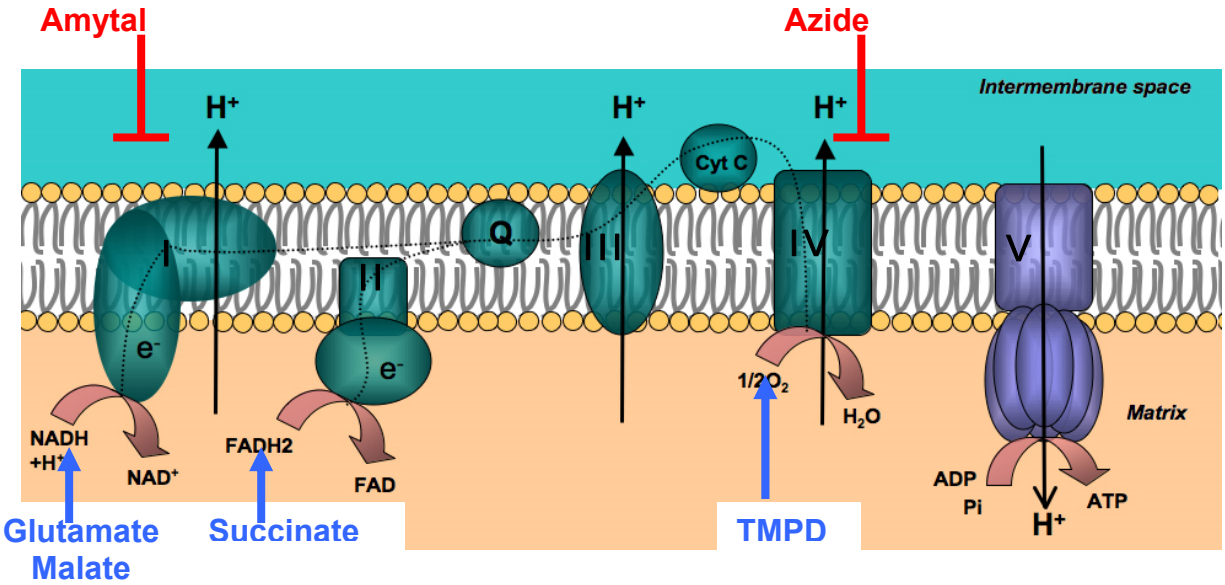


Figure 42 : Détermination de l'activité oxydative des complexes de la chaîne respiratoire. Le complexe I est activé en présence de glutamate et malate et inhibé par l'amytal. L'activité du complexe II est mesurée en présence de succinate. Le complexe IV est activé par du TMPD en présence d'ascorbate et inhibé par l'azide. (*Source : modifiée d'après Bellance, 2009*)

Complexe I : son activité est estimée lors des mesures effectuées en vitesse maximale en présence d'ADP 2mM, de glutamate 10mM et de malate 4mM. Les chaînes de transporteur d'électrons sont initiées par cet apport d'équivalent réduit ($NADH,H^+$).

Complexe II : pour déterminer son activité, il est d'abord nécessaire d'inhiber celle du complexe I par l'addition d'amytal (1mM). L'activité du complexe II est ensuite activée par l'ajout d'une concentration saturante de succinate (10mM) et la présence du malate. L'oxydation de ce substrat fournit du FAD_2, qui est réoxydé uniquement par le complexe II.

Complexe IV : l'accepteur final d'électron ayant une activité largement supérieur à tous les autres complexes, il n'est pas nécessaire d'ajouter une étape d'inhibition du complexe II et III. L'activité maximale du complexe IV est enregistrée suite à l'ajout de TMPD (*tétraméthyl-p-phénylènediamine* ; 0,5mM). L'effet du TMPD est prolongé dans le temps par l'ajout simultané d'acide ascorbique (0,5mM) lui servant d'antioxydants. L'activité réelle du complexe IV est ensuite évaluée en soustrayant la respiration maximale à celle obtenue par ajout d'azide de sodium (4mM), l'inhibiteur spécifique de ce complexe.

2.2.c-Mesure de l'utilisation des acides gras (AG)

Le troisième protocole utilisé repose sur les voies d'utilisation des substrats, et a pour but d'étudier les capacités mitochondriales à utiliser préférentiellement les acides gras (AG) ou les hydrates de carbone (**Figure 43**).

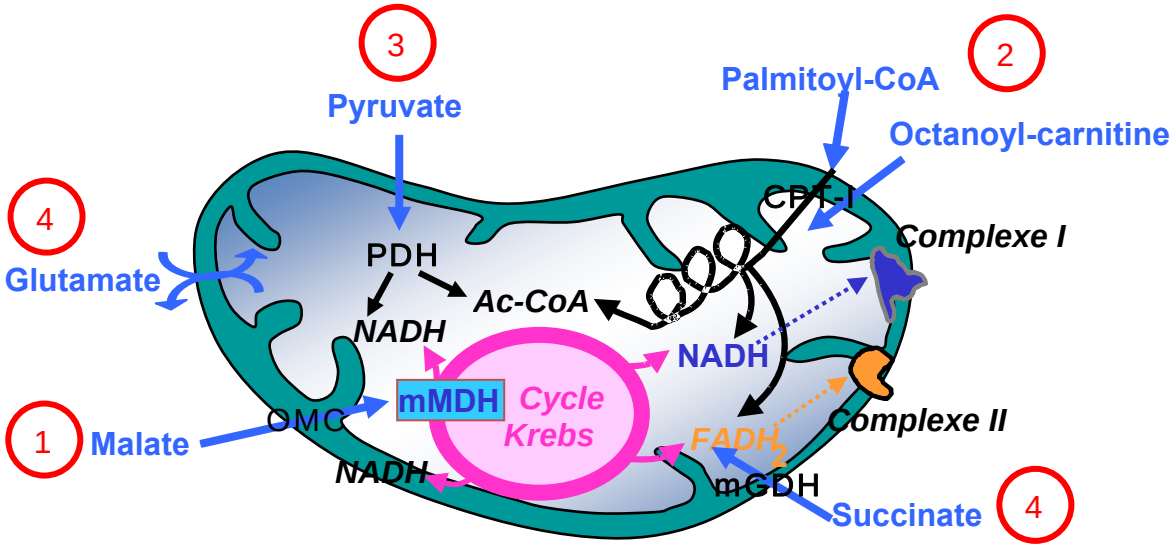


Figure 43 : Etude de l'utilisation des différents substrats par la mitochondrie. Les différents substrats sont ajoutés dans l'ordre indiqué, en présence d'une concentration saturante d'ADP (2mM). 1) Le malate entre dans la mitochondrie via l'OMC et produit du NADH via la mMDH. 2) le palmitoyl-CoA et l'octanoyl-carnitine subissent la β-oxydation et produit de l'acétyl-CoA, du NADH et du $FADH_2$. 3) Le pyruvate entre dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA sous l'action de la PDH. 4) Le glutamate produit du NADH, tandis que l'entrée de succinate produit principalement du $FADH_2$. (*Source : S. Rimbaud, Y Athéa*)

Pour évaluer l'effet des différentes voies d'utilisation des substrats sur la fonction mitochondriale, l'étude a été réalisée dans une solution identique à la solution R, mais ne contenant aucun substrat (solution R_0 ; ni glutamate, ni Malate).

Ainsi les composés réduits alimentant la chaîne respiratoire proviendront uniquement de l'oxydation des substrats fournis. Les substrats suivants ont été ajoutés successivement (2-3min) dans l'ordre suivant : **1)** L'ajout d'ADP (2mM) et de malate (4mM) amorce le cycle de Krebs en l'alimentant en oxaloacetate (OAA) et le transport mitochondrial. Il pénètre dans la mitochondrie via l'OMC (*Oxoglutarate/malate carrier*) et produit principalement du NADH par la mMDH (*Malate déshydrogénase mitochondriale*). **2)** Puis, l'addition de palmitoyl-CoA (0,1mM) et de carnitine (2mM) permet l'étude de l'oxydation des AG. Le palmitoyl-CoA est un AG à chaîne longue, donc son transport nécessite l'action du transporteur CPT1 / Carnitine. En soustrayant cette vitesse de respiration de celle du Malate, on peut donc en déduire la respiration spécifique des mitochondries à partir d'un **AG à chaîne longue**. **3)** L'ajout de pyruvate (1mM) permet l'étude de l'utilisation des hydrates de carbone. Le pyruvate représente au mieux la voie des glucides, car il est le produit final de la glycolyse et est transformé en acétyl-CoA par la PDH, pour rentrer dans le cycle de Krebs. La vitesse maximale de respiration de la voie des hydrates de carbone est déterminée après soustraction de la vitesse mesurée à celle obtenue après l'ajout de palmitoyl-CoA. **4)** Enfin, l'ajout de glutamate (10mM) et succinate (15mM) permet d'atteindre la **respiration maximale** de la chaîne respiratoire mitochondriale (en stimulant Complexe I, II), et en court-circuitant le cycle de Krebs. Il est donc ainsi possible de déterminer le pourcentage d'utilisation des substrats en comparant la respiration obtenue spécifiquement pour chaque substrat par rapport à la respiration maximale.

2.3-Analyse des résultats

La vitesse de consommation de dioxygène est calculée (à l'aide du logiciel Strahtkelvin 928 system) suite à chaque ajout des substances. La vitesse obtenue est alors exprimée en µmol d'O_2.min^{-1}, elle est soit normalisée, soit exprimée en pourcentage de la V_{max} (en présence de tous les substrats). En fin de mesure, les fibres sont récupérées, séchées pendant 1h sous vide à 75°C et pesées. Cette étape permet de normaliser le taux de respiration au poids de tissu sec, d'où l'expression des vitesses en µmol d'O_2.min^{-1}.g^{-1} de poids sec de fibres.

3. Mesure de la sensibilité du pore de transition de perméabilité (PTP)

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (revue Green DR, Reed JC). En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) des mitochondries. Le PTP est une entité localisée dans la membrane interne mitochondriale et régulée par la membrane externe par des interactions protéine/protéine spécifiques. Le PTP dont la composition biochimique est sujette à de nombreuses controverses est un canal à haute conductance dont l'ouverture dépend du potentiel, du calcium et du stress oxydant. Il est possible de bloquer son ouverture par ajout de cyclosporine A qui agit sur la cyclophiline D. Une sensibilité accrue au calcium est un éventuel signe précoce de dysfonctionnement mitochondrial. Dans notre cas, il est intéressant de vérifier si cet index évolue en fonction du génotype de nos souris. Donc, pour évaluer l'impact de l'absence de la protéine OPA1 sur la sensibilité des cellules à l'apoptose, les capacités d'ouverture du PTP ont été vérifiées.

3.1-Préparation des cellules et acquisition des données

Pour étudier le fonctionnement du PTP, les cardiomyocytes des souris *Opa1*$^{+/+}$ et *Opa1*$^{+/-}$ ont été fraichement isolés selon la procédure présentée précédemment. Une fois fixés, les cardiomyocytes ont ensuite été incubés avec 5µM de rhodamine-2 (Rhod-2) et 1µM de calcéine AM (A*cetoxy methyl ester*) pendant 45min. Rhod-2 ne fluoresce qu'en présence de calcium. Afin de mesurer spécifiquement le calcium accumulé uniquement dans les mitochondries, plusieurs conditions sont requises : la première est le contrôle de la composition du milieu intracellulaire par la saponification de la membrane cellulaire et la seconde est le blocage de l'activité de la pompe SERCA via l'absence d'ATP dans le milieu d'étude. La calcéine AM est couramment utilisée pour étudier le PTP, car elle diffuse passivement dans les cellules et s'accumule dans les différents compartiments, dont les mitochondries. Une fois à l'intérieur des cellules, elle est clivée par des estérases intracellulaires, ce qui provoque l'élimination du groupement acetoxy methyl et libère le groupement fluorescent polaire. De part sa polarité, ce groupement fluorescent ne peut traverser les membranes et se retrouve prisonnier des compartiments intègres après saponification qui le contienne, c'est à dire les mitochondries. Sa fuite ne sera

rendue possible que par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial.

La fluorescence émise dans les cellules suite à l'ajout de calcium a été mesurée à l'aide d'un microscope confocal Carl Zeiss LSM-510. La sonde rhod-2 est excitée à la longueur d'onde de 543nm et sa fluorescence est récupérée à celle de 571nm, tandis que la calcéine est excitée à 488nm et sa fluorescence émise à 518nm. Les expériences ont été effectuées en utilisant un grossissement x40 en eau, en résolution 512 x 512. Dans un plan donné, la fluorescence de plusieurs cellules peut être mesurée à la fois.

Pour l'acquisition des données, les cellules étudiées ont été placées sous le flux d'un système de perfusion. Ce système contient différentes solutions libérées manuellement à un temps précis. Dans un premier temps, les cellules étudiées ont été choisies sous un flux de solution R (composition en mM : K_2EGTA-Ca K_2EGTA 100 ([Ca^{2+}] libre 100 nM) ; Mg^{2+} libre 1 ; K_2HPO_4 ($3H_2O$) 3 ; Imidazole 20 ; Taurine 20 ; DTT 0.5 ; CH_3KO_3S 90 ; CH_3SO_3Na 10 ; glutamate 10 ; malate 4 ; BDM 20 et pH 7,1) permettant d'éliminer le calcium contenu dans les cellules et leur environnement proche (**Figure 44**). Puis elles sont perméabilisées pendant environ 3min avec de la saponine (50µg/ml dans la solution R) et lavées avec de la solution R pendant 5min. La création de trous dans la membrane cellulaire permet de contrôler l'environnement mitochondrial, mais aussi d'éliminer la calcéine contenue dans le cytoplasme, seule la calcéine mitochondriale est donc suivie.

L'ouverture du PTP est ensuite stimulée par l'ajout de calcium, à l'aide d'un flux de solution R^+ (composition solution R supplémentée en [Ca^{2+}] libre 0,2mM), et suivi pendant environ 15min. La visualisation de l'entrée de calcium dans les mitochondries s'effectue par le suivi du signal rhod-2. Lorsque le seuil maximum de calcium toléré par la mitochondrie est atteint, le PTP s'ouvre, provoquant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la fuite de ses composants solubles, dont la calcéine qui est suivie en parallèle.

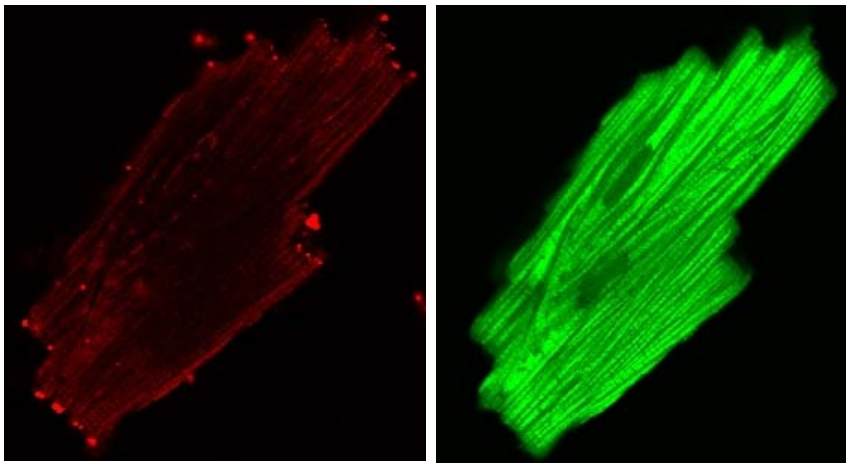


Figure 44 : Marquage d'un cardiomyocyte de souris.
En solution R avant perméabilisation, Rhod-2 (**gauche**) est faiblement activée, et la calcéine (**droite**) est présente dans tous les compartiments.
(*Crédit photo : F.Caffin*)

3.2-Analyse des données

La sensibilité d'ouverture du PTP peut être estimée par différents paramètres : son délai d'ouverture (mesuré par la rhodamine et la calcéine) et la vitesse à laquelle le signal de la calcéine disparait au moment de l'ouverture du PTP. Ces paramètres sont déterminés en estimant le temps où il y a rupture de pente, et par régression linéaire, à partir des courbes de mesure de la fluorescence de rhod-2 et de la calcéine en fonction du temps.

Chapitre IV : ETUDE DU METABOLISME ET DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE

Afin de déterminer si la perte de la protéine OPA1 induisait des effets sur l'adaptation à un exercice physique, des expériences ont été menées sur la biogénèse mitochondriale et le métabolisme énergétique. Les adaptations différentielles à un effort en fonction du génotype ont été examinées par la mesure de l'activité de différentes enzymes participant au métabolisme énergétique, mais également en vérifiant s'il existait des différences d'expression transcriptionnelle ou protéique des acteurs impliqués dans ces deux domaines.

1. *Mesure de l'activité enzymatique des protéines et de leurs isoformes*

Pour caractériser la fonction mitochondriale du ventricule gauche, l'activité totale des enzymes de la citrate synthase (CS), les cytochromes c oxydase I et IV ont été mesurées. L'étude du profil métabolique des muscles squelettiques (gastrocnémien superficiel, plantaire et soléaire) après un entraînement a été estimée par la mesure de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique : la CS, la Cox IV, la créatine kinase (CK), la lactate déshydrogénase (LDH), l'adénylate kinase (AK), la hydroxyacylCoA dehydrogenase (HADHA). Tous ces dosages ont été effectués par spectrophotométrie à des longueurs d'onde spécifiques à chaque réactif. En outre, les différentes isoformes de l'enzyme CK (mi-CK, MM-CK, MB-CK, BB-CK) ont été séparées par électrophorèse sur gel d'agarose.

1.1-Extraction des enzymes

Les différents tissus congelés ont été découpés et pesés (10-15mg), avant d'être homogénéisés à l'aide d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France) dans 200µl de tampon d'homogénéisation à 4°C (mM : HEPES 5, EGTA 1 et DTT 1, Triton X100 0,1% ; à pH 8,7). Cette étape rapide permet l'extraction complète de toutes les enzymes, tout en minimisant la possible intervention de protéases. Les extraits protéiques ainsi obtenus sont ensuite aliquotés et congelés, avant d'être dosés par la méthode BCA (acide bicinchoninique ; voir ci-après).

1.2-Extraction et dosages des protéines

La méthode BCA a été mise au point par Paul Smith en 1985, et est un dérivé de la méthode au Biuret (GORNALL *et al.*, 1949). Il s'agit d'un dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique. En milieu alcalin, les ions cuivre Cu^{2+} se complexent aux liaisons peptidiques des protéines et sont alors réduits en ions cuivreux Cu^{+}. Le BCA est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu^{+}, qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines (utilisable dans une gamme de 0.5µg/ml-2mg/ml). Cette méthode a l'avantage d'être sensible et rapide et de résister aux détergents comme le Triton ou le SDS. La concentration protéique de chaque extrait dilué dans l'eau est déterminée grâce à une gamme étalon de BSA (*Bovin serum albumin*), avec 7 concentrations dosées en parallèle (0 µg/ml-1mg/ml). Dans une plaque de 96 puits à fond plat, les dosages ont été effectués en double, voir quadruple, avec un volume de 20µl/puits, combinés à 200µl/puits d'un mélange de BCA et de sulfate de cuivre 4%. L'ensemble est incubé 15min à 60°C pour accélérer la réaction, puis lu à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN à 562nm.

1.3-Dosage enzymatique des activités totales

Le dosage des activités enzymatiques s'est fait en évaluant les propriétés cinétiques des enzymes, qui sont proportionnelles à leur concentration.

1.3.a-Activité totale de la citrate synthase (CS)

La CS est une enzyme du cycle de Krebs utilisée comme marqueur de l'activité et de la masse mitochondriale. En effet, son activité est corrélée à la quantité de mitochondries contenues dans le tissu analysé. Elle catalyse la formation de citrate à partir d'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA issu du catabolisme glucidique et lipidique.

$$\textbf{Acétyl-CoA + Oxaloacétate + } H_2O \leftrightarrow \textbf{Citrate + CoA-SH}$$

Cependant, la disparation ou l'apparition d'un de ces éléments n'est pas directement mesurable. Il est donc nécessaire d'ajouter une réaction indicatrice pour mesurer l'activité de la CS. A cet effet, du DNTB (*5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoate*) est

ajouté au milieu réactionnel. Ce composé interagit avec le CoASH libéré, et produit des ions mercaptiques possédant une absorption spécifique à 412nm.

$$\mathbf{CoASH + DNTB \rightarrow CoAS + H^+ + C_6O_4S^{2-}}$$

L'activité de la CS est donc dosée en suivant l'augmentation de l'absorbance due à la production d'ions mercaptiques dans le milieu réactionnel (mM : Tris 100 ; DNTB 0,1 ; Acétyl-CoA 0,3 ; OAA 0,5 ; pH 8,0) pendant 3min à 30°C à 412nm.

1.3.b-Activité totale de la COX

La COX, complexe IV de la chaîne respiratoire, se trouve dans la membrane interne des mitochondries. Elle intervient dans le processus de phosphorylation oxydative de l'ATP. Elle est responsable de l'oxydation du cytochrome-c préalablement réduit par le complexe III (cytochrome-c réductase).

$$\mathbf{Cytochrome\ c\ réduit + O_2 \rightarrow Cytochrome\ c\ oxydé + H_2O}$$

Le cytochrome c réduit et le cytochrome c oxydé n'ayant pas le même spectre d'absorption, il est donc possible de les suivre séparément. L'activité de la COX est dosée en suivant spécifiquement la disparition de l'absorbance du cytochrome c réduit, à partir de cytochrome c réduit à 90% (50µM par ajout de dithionite de sodium) dans un tampon phosphate (50mM ; pH 7,4) pendant 3min à 30°C à 550nm.

1.3.c-Activité totale de la CK et de l'AK

Comme nous l'avons présenté auparavant, la CK catalyse le transfert d'énergie à partir de PCr.

$$\mathbf{PCr + ADP + H^+ \leftrightarrow Cr + ATP}$$

Comme pour la CS, aucun des produits participant à la réaction ne sont directement mesurables par spectrophotométrie. Il est donc nécessaire d'effectuer un couplage enzymatique de l'un des éléments réactionnels, pour obtenir un produit ayant une propriété spectrale spécifique. L'ATP formé par la réaction est utilisé comme substrat dans les réactions de couplages suivantes :

$$\mathbf{ATP + Glucose \leftrightarrow Glucose\text{-}6\text{-}Phosphate\ (G6P) + ADP}$$ catalysée par l'HK

$$\mathbf{ADP + NADP^+ \leftrightarrow Gluconate\text{-}6\text{-}Phosphate + NADPH,H^+}$$ catalysée par la G6PDH

(Nomenclature : HK : Hexokinase ; G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase)

Le NADPH,H+ produit possède une absorbance spécifique à 340nm. Toutefois, l'AK présente aussi dans les tissus utilise pareillement l'ADP pour former l'ATP.

2 ADP ↔ AMP +ATP catalysée par l'AK

Il est donc indispensable de mesurer en premier l'activité de l'AK seule, afin d'éliminer son interférence dans la mesure de l'activité de la CK. L'activité de l'AK est dosée en suivant l'apparition de l'absorbance du NADP réduit dans le tampon réactionnel (mM : HEPES 20 ; Mg-acétate 5 ; DTT 0,5 ; glucose 20 ; ADP 1,2 ; $NADP^+$ 0,6 ; pH 7,4 ; HK 5U/ml ; G PDH 3,7 U/ml) pendant 3min à 30°C à 340nm. Puis l'activité de la AK + CK est ensuite mesurée par ajout de 10mM de PCr. L'activité de la CK seule est quantifiée par soustraction de l'activité totale AK +CK à celle de l'AK seule.

1.3.d-Activité totale de la LDH

Comme indiqué précédemment, la LDH intervient dans la catalyse de transformation du pyruvate en lactate.

Pyruvate + $NADH,H^+$ ↔ Lactate +NAD^+

Or, le $NADH,H^+$ absorbe spécifiquement à la longueur d'onde de 340nm. L'activité de la LDH est donc dosée en suivant spécifiquement la disparition de l'absorbance du $NADH,H^+$ réduit dans un tampon réactionnel (mM : K_2HPO_4 34,1 ; KH_2PO_4 7,35 ; Na pyruvate 0,63 ; $NADHNa_2$ 12,4 ; $NAHCO_3$ 0,12 ; pH 7,4) pendant 3min à 30°C à 340nm.

1.3.e-Activité totale de la HADHA

La HADHA est une enzyme du cycle de β-oxydation avec une affinité spécifique pour les substrats à longue chaîne, elle est utilisée comme marqueur de l'activité de la voie d'utilisation des AG. Elle se situe dans la membrane interne des mitochondries, et catalyse l'hydratation de l'énoyl-CoA et aussi la déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA.

AcétoacétylCoa + $NADH,H^+$ ↔ Hydroxy-butyryl-CoA + NAD^+

Le même cofacteur que la LDH étant suivi, l'activité de la HADHA est donc dosée en suivant spécifiquement la disparition de l'absorbance du $NADH,H^+$ réduite

dans un tampon réactionnel (mM : Na2H2P2O7 100 ; EDTA 1 ; NADH 0,15 ; AcétoacétylCoA 0,05 ; pH 7,3) pendant 3min à 30°C à 340nm.

1.3.f-Analyse des données spectrophotométriques

La technique de dosage par spectrophotométrie repose sur la loi de Beer-Lambert (DO = ε x l x C°). Cette relation empirique relie l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse, en établissant une proportionnalité entre la concentration d'une substance en solution homogène, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution. L'évolution de la densité optique (DO) au cours du temps est donc proportionnellement liée à l'apparition ou la disparition de l'absorbance de la molécule étudiée.

D'où le calcul de l'activité enzymatique (AE ; en UI (µmole.min^{-1})), avec la formule suivante : $\mathbf{AE = ((DO_{finale} - DO_{initiale}) \times Fd) / (\varepsilon \times l \times \Delta t)}$ où **Fd** : facteur de dilution de l'échantillon, **ε** :le coefficient d'extinction molaire de la molécule suivie (L.mol^{-1}.cm^{-1} ; εNADH = 6.220 ; ε Cyt-c réduit = 18.500 ; ε C6O4S2-= 13.600), **l** : la longueur de la cuve (1cm) et **Δt** : le temps de mesure (3min).

L'activité enzymatique de chaque enzyme est normalisée en étant ramenée à la concentration protéique des échantillons mesurés (UI/g prot).

1.4-<u>Quantification des isoformes de la CK</u>

Le principe de la mesure de l'activité des isoformes de la CK est le même que pour déterminer l'activité totale des enzymes après séparation sur gel d'agarose. Pour éviter la saturation du signal MM-CK due à sa forte majorité, deux dilutions de chaque échantillon sont effectuées.

1.4.a-Migration et révélation des gels

Les isoformes ayant des tailles diverses, elles sont facilement identifiables de par leur migration à des positions différentes et spécifiques. L'activité des différentes isoenzymes est déterminée après séparation par migration sur gel d'agarose 1% à 250V pendant 1h30. Les gels sont ensuite incubés dans une solution de coloration (mM : MES 22 ;Mg-acétate 50 ; Glucose 70 ; N-acetylcysteine 120 ; ADP 9 ; PCr 120 ; $NADP^+$ 9 ; P^1P^5-diadénosine-5'-pentophosphate 0,3 ;HK 9UI/ml ;G6PDH

6UI/ml) à l'obscurité pendant 50min. La fluorescence émise par le NADPH,H^+ est visible dans les UV.

1.4.b-Quantification des gels

Chacune des bandes obtenues après le couplage enzymatique correspond à une isoenzyme, et émet un signal dont l'intensité est directement proportionnelle à l'activité de l'isoenzyme. Pour traiter les informations quantitativement, les gels sont scannés à l'aide du système Chemidoc XRS (Bio-Rad) et l'intensité relevée pour chaque bande est calculée à l'aide du logiciel Quantity One. Puis, l'activité des isoenzymes est déterminée à l'aide de la proportion qu'elle représente dans l'extrait, en pourcentage de l'activité totale mesurée pour la CK.

2. ***Mesure du niveau d'expression protéique par western-blot (WB)***

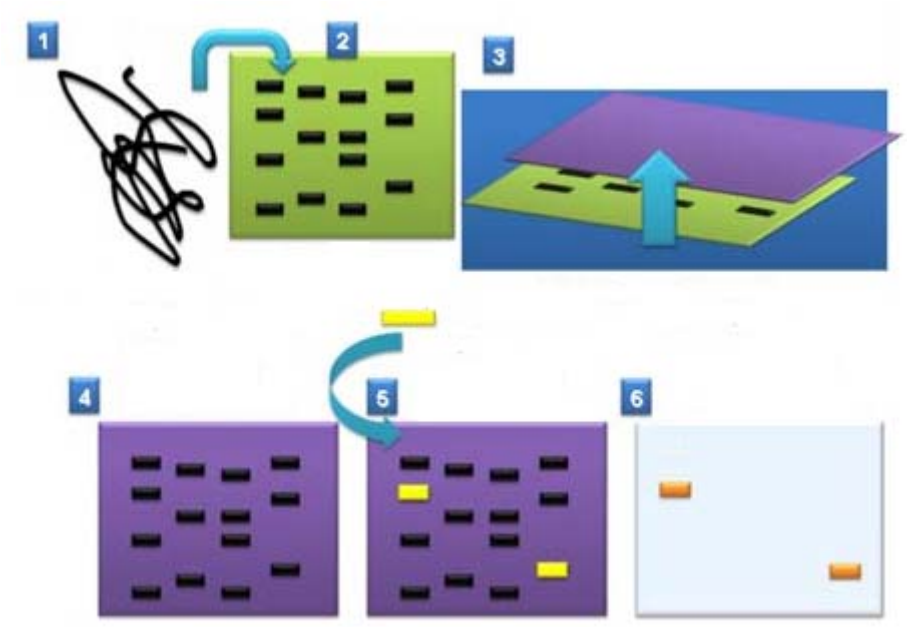


Figure 45 : Mesure du taux d'expression protéique par Western-blot.
Cette technique repose sur 6 étapes principales, **1)** préparation des échantillons, **2)** séparation des protéines sur gel, **3)** transfert des protéines migrées sur une membrane, **4)** saturation de la membrane, **5)** immuno-révélation des protéines à l'aide d'anticorps spécifiques et pour finir **6)** analyse par chimioluminescence. (*Source : Molecular station*)

2.1-Préparation des échantillons

2.1.a-Extraction et dosage des échantillons

Les échantillons analysés du gastrocnémien superficiel ont été le plus souvent préparés en tampon d'homogénéisation avec du DTT, selon le protocole indiqué en (IV.1.2), puis dosés par la technique BCA. Avec ce mode d'extraction, l'inconvénient est que les protéines ne sont pas extraites dans un tampon contenant des anti-phosphatases et anti-protéases pour inhiber ces enzymes susceptibles d'agir sur les protéines d'intérêt. L'absence d'inhibiteurs empêche toute éventuelle révélation-quantification fiable du taux de phosphorylation de ces protéines.

2.1.b-Dénaturation des protéines

Pour séparer les protéines uniquement selon leur masse lors de la migration, il est nécessaire de les dénaturer (seules les liaisons secondaires sont désorganisées) (**Figure 45.1**). Une quantité identique et adaptée de protéines totales (50µg dans 12µl) est mise en contact avec 12µl de tampon de charge 2X (mélange de bleu / SDS / glycérol / DTT). Le SDS est un détergent anionique lipophile qui supprime les liaisons non-covalentes de la protéine, et confère à la protéine une charge globale négative proportionnelle à sa masse, ce qui facilite sa solubilisation. La chaîne polypeptidique est partiellement dépliée par l'action complémentaire du DTT qui réduit aussi les ponts disulfures. Le glycérol facilite le dépôt des échantillons au fond des puits du gel en augmentant la densité de l'échantillon par rapport au tampon.
Les protéines sont ensuite totalement dénaturées par une brève dénaturation thermique (5min à 95°C).

Afin de suivre en temps réel la migration, un marqueur de poids moléculaire (Euromedex) est ajouté également dans un des puits de dépôt.

2.2-<u>Migration des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE</u>

En condition SDS-PAGE, les protéines de l'échantillon sont chargées négativement par la présence de SDS, donc leur migration, au travers d'un gel de polyacrylamide sous l'influence d'un champ électrique, va se faire uniquement en fonction de leur poids moléculaire dans une dimension (**Figure 45.2**).

La migration s'effectue au travers de deux gels de polyacrylamide successifs avec un pourcentage croissant (composition indiquée ci-dessous). Le gel supérieur contenant les puits de dépôt a pour rôle de concentrer les protéines à l'interface entre les deux gels, tandis que le gel inférieur a pour rôle de séparer les protéines en

fonction de leur poids moléculaire. La concentration en polyacrylamide du gel de séparation est fonction du poids de la protéine d'intérêt (6-12%), plus la concentration est élevée, plus les petites protéines sont séparées finement. La migration au travers des gels s'effectue pendant 2h à 150V, en présence de tampon de migration permettant la conduction du courant et de limiter l'échauffement du dispositif.

Composition des gels en %: gel supérieur 5% (Acrylamide 5 ; SDS, AP et TEMED 0,1 ; Tris 125mM ; pH6.8), gel inférieur 8% (Acrylamide 8 ; SDS et AP 0,1 ; TEMED 0,06 ; Tris 380mM ; pH8.8) et du tampon de migration en g/L (Tris 15 ; SDS 5 ; glycine 72).

2.3-Electro-transfert des protéines sur membrane

Afin de rendre les protéines accessibles au protocole de détection, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-P). La fixation des protéines à la membrane se fait par des interactions hydrophobes et ioniques. Après l'électrophorèse, à l'aide d'un système (BioRad) composé de papiers whatman et d'éponges, le gel (borne$^-$) est placé face-à-face avec la membrane activée par du méthanol (borne$^+$), et un courant électrique est appliqué de part et d'autre à travers des électrodes. Les protéines chargées négativement migrent alors depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel (**Figure 45.3**). Le transfert des protéines vers la membrane s'effectue pendant 1h30 à 150V à 4°C dans du tampon de transfert (en mM : Glycine 40 ; Tris 25 ; méthanol 20%).

2.4-Immunodétection des protéines d'intérêt

2.4.a-Saturation de la membrane

La membrane ayant été choisie pour ses propriétés de liaisons non-spécifiques pour fixer les protéines d'intérêt, il est donc nécessaire de minimiser les interactions pouvant se former entre la membrane et les anticorps déposés. La réduction du bruit de fond, due à l'interaction non spécifique de la membrane et des anticorps, est réalisée en recouvrant la membrane de lait, provoquant l'occupation des sites non-occupés par les protéines transférées (**Figure 45.4**).

Après le transfert, la membrane est brièvement rincée (5min) dans une solution PBST (en mM : NaCl 140 ; PO_4HNa_2 ($2H_2O$) 9 ; PO_4H_2Na 1 ; Tween 0,1%), puis saturée pendant 1h à 4°C avec 5% de lait en poudre sans AG.

2.4.b-Anticorps primaire

Après le blocage, la membrane est rincée du lait excédentaire par un lavage de 10min avec PBST sous agitation. La membrane est ensuite incubée sur la nuit à 4°C, sous agitation modérée, avec une solution d'Ac-I (0,5-5µg/ml) diluée en BSA 5% - PBST. L'Ac-I utilisé est dirigé spécifiquement contre un épitope de la forme dénaturée de la protéine d'intérêt (**Figure 45.5**).

2.4.c-Anticorps secondaire

Après 3 rinçages successifs au PBST (10min), afin d'enlever les Ac-I non liés, la membrane est incubée à un Ac-II dilué en lait 5% - PBST, pendant 1h à température ambiante, sous agitation modérée.
Il s'agit d'une étape de révélation et d'amplification du signal. Car cet Ac-II est dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'Ac-I, et il est couplé à une enzyme HRP (*Horseradish peroxidase*), ce qui permet l'identification visuelle de la protéine étudiée sur la membrane. De plus, plusieurs Ac-II peuvent se lier au même Ac-I, ce qui provoque l'amélioration de la puissance du signal localisé.

2.4.d-Révélation par chimioluminescence

La révélation s'effectue par chimioluminescence avec le kit HRP (*Immobilion Western ; Milipore*). Cette méthode de détection est la plus sensible pour l'analyse des WBs. Elle consiste à mettre en contact la peroxydase de l'Ac-II avec le substrat du kit ECL. Lorsque le substrat est oxydé par l'enzyme, cela produit une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. La lumière émise par la réaction est ensuite enregistrée numériquement à l'aide d'une caméra CCD (**Figure 45.6**).

Après 3 rinçages successifs au PBST (10min), afin d'enlever les Ac-II non liés, la membrane est incubée 5min avec le substrat ECL, avant d'être lue à l'aide du système Chemidoc XRS (Bio-Rad).

2.5-Analyse des acquisitions

L'identification de la bande correspondante à notre protéine d'intérêt est réalisée en comparant la taille approximative des bandes marquées à celles du marqueur de poids moléculaire. Puis, la quantification du signal est effectuée par densitométrie à l'aide du logiciel Quantity one (BioRad). Le taux relatif de marquage de la protéine est alors exprimé en densité optique.
Afin de corriger un transfert incomplet ou les éventuelles erreurs expérimentales, le taux de la protéine-cible est normalisé à une protéine de charge (CS) servant de contrôle interne.

3. Mesure du niveau d'expression en ARN_m par RT-PCR

L'analyse de l'expression des ARN_m a permis de mieux comprendre les différences d'adaptation du gastrocnémien superficiel *Opa1*$^{+/+}$ ou *Opa1*$^{+/-}$ à l'entraînement, au niveau de la biogénèse, de la dynamique ou bien du métabolisme mitochondrial. La détermination du taux d'expression des ARNm, nécessite une étape intermédiaire permettant la synthèse de leur l'ADN complémentaire (ADN_c) par transcription inverse. Le taux de cet ADN_c sera ensuite dosé via une RT-PCR quantitative.

3.1-Extraction, dosage et qualité des ARN totaux

3.1.a-Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN a été réalisée par la méthode au trizol (Gibco BRL, USA). Cette technique d'extraction, bien qu'elle puisse laisser des traces de phénol dans les échantillons, bénéficie d'un excellent rendement comparé aux colonnes d'affinité. L'homogénéisation des différents échantillons prélevés lors des sacrifices s'effectue à raison de 10–20mg de tissus stockés à -80°C, directement introduits dans 1ml de trizol à 4°C, puis micro-broyés à l'aide d'un Precellys 24 (Bertin, France). Cette solution de lyse, composée de phénol et de guanidine isothiocyanate, permet la rupture des membranes cellulaires et des organites par son puissant pouvoir d'agent dénaturant des protéines, tout en maintenant l'intégrité des acides nucléiques. Afin de séparer les ARN des protéines et des débris cellulaires,

l'homogénat obtenu est traité par 0,2ml de chloroforme, puis centrifugé à 4°C (10.000G, 15min). Les ARN sont alors contenus dans la phase aqueuse supérieure, tandis que les protéines et les débris restent dans la phase organique inférieure. Les ARN sont ensuite extraits de cette phase par leur précipitation sur la nuit à -20°C, en ajoutant 0,5ml d'alcool ispopropylique à la phase aqueuse (0,45 ml). Ils sont regroupés sous la forme d'un culot par une seconde centrifugation (12.000G, 15min, 4°C). Chaque culot d'ARN est ensuite lavé plusieurs fois à l'éthanol 75% (0,2 ml / centrifugation) pour éliminer toute trace de sels et autres impuretés. Les culots sont ensuite séchés par l'évaporation de l'éthanol, puis remis en solution dans 15-20µl d'eau exempte d'ARNases et ADNases, avant d'être conservés à -80°C.

3.1.b-Etude quantitative et qualitative des ARN totaux extraits

La concentration en ARN totaux obtenus dans chaque extrait a été déterminée par spectrophotomètrie, sachant qu'une unité de densité optique (DO), pour une absorbance à 260 nm, équivaut à une concentration en ARN de 40µg/ml. De plus, la lecture à une absorbance à 280nm, indique la pureté des échantillons via le rapport DO_{260}/DO_{280}. Un ARN pur et intègre dispose d'un ratio entre 1.8 et 2. Si le rapport est inférieur à 1.5, il témoigne d'une contamination par des protéines ou des composés aromatiques, et s'il est de plus de 2, il indique une contamination par des acides nucléiques d'origine génomique ou mitochondriale.

La qualité de la préparation des ARN a également été vérifiée par électrophorèse sur cartes microfluidiques, qui ont ensuite été analysées par un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Après migration, les 2 bandes correspondantes aux ARN_r 28S et 18S sont quantifiées et permettent d'établir le facteur d'intégrité des ARN, le RIN (*RNA integrity number*) des échantillons, qui doit se situer entre 7 et 10 pour permettre l'utilisation des extraits dans les expériences de RT-PCR quantitative.

3.2-<u>RT-PCR quantitative</u>

3.2.a-Transcription reverse

Avant de pouvoir passer à l'étape de quantification des ARN_m extraits, il est nécessaire de les différencier du pool des autres ARN contenus dans le broyat. De

plus, la technique de PCR employée (Taq-polymérase) utilise uniquement de l'ADN comme matrice.

Pour ce faire, cette étape utilise des propriétés des transcriptases inverses virales pour synthétiser de l'ADNc à partir des ARN contenus dans les échantillons. La transcription inverse est réalisée avec le kit iScript™ cDNA Synthesis (Biorad). Le mix réactionnel de ce kit contient tous les composants nécessaires à la synthèse sensible et fiable d'ADNc, notamment : du tampon $MgCl_2$, des dNTP, des amorces, un inhibiteur de RNase, la transcriptase inverse qScript™ et des stabilisants. Les amorces utilisées sont un mélange optimisé d'amorces aléatoires et oligo (poly-dT), ce qui permet la synthèse des ADN_c que des ARN_m, de par leur complémentarité avec leur queue poly-A. La transcriptase inverse qScript™ est un dérivé de transcriptase inverse M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*).
La réaction de transcription est réalisée dans un volume de 20µl dont 1µg de matrice d'ARN (V=15µl) en 3 étapes : 1) initiation de la réaction, le mélange complet de la réaction est incubé 5 min à 25°C, 2) retro-transcription, 30min à 42°C et 3) arrêt de la réaction par dégradation de l'enzyme avec une incubation de 5min à 85°C. Les ADNc produits sont ensuite dilués et stockés à-20°C en attendant l'étape de PCR.

3.2.b-PCR (Polymerase chain reaction) quantitative en temps réel

La PCR en temps réel consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle de la réaction PCR grâce à un marqueur intercalant fluorescent (SYBR Green). Elle repose sur le principe d'une PCR classique, qui est une méthode d'amplification génique *in vitro* créée par K. Mullis (prix Nobel de chimie ; 1993). Elle permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité d'amorces complémentaires (20-25 nucléotides) **(Figure 46).** Cette procédure est constituée de cycles répétés de dénaturation de l'ADN par la chaleur, d'hybridation des amorces à leurs séquences complémentaires, et d'extension de ces amorces hybridées par l'ADN polymérase. Le produit obtenu peut ensuite servir de matrice au cycle suivant. Dans des conditions optimales, le nombre de copies de l'ADN cible est donc doublé à chaque cycle de PCR. L'amplification est alors exponentielle, selon la formule : $N = N_0^{2n}$; N = nombre de molécules amplifiées ; N_0 = nombre initial de molécules ; n = nombre de cycles d'amplification, jusqu'à l'épuisement des réactifs. La détermination du niveau d'expression du gène étudié, correspondant à la quantification des molécules d'ADN dans le milieu, est

rendue possible par le suivi de la fluorescence émise à 530nm par le SYBER Green, lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin.

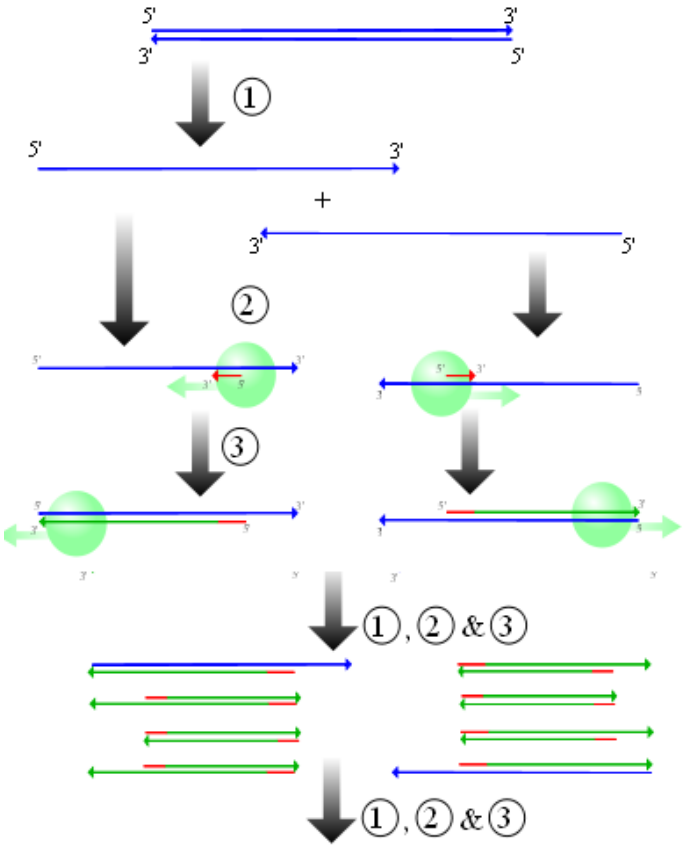


Figure 46 : Mesure du taux d'expression transcriptomique par RT-PCR.
La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. **1) Etape de dénaturation**, permet de déshybrider les ADN, de décrocher les polymérases encore liées et d'homogénéiser le milieu réactionnel. **2) Etape d'hybridation**, permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN_c matrice. **3) Etape d'élongation**, permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur matrice à partir des dNTPs libres dans le milieu. Pour le marquage, le SYBR Green s'intercale entre les ADN double-brins produits au cours des étapes d'amplification. (*Source : GNU Free Documentation License).*

La spécificité de cette réaction est basée essentiellement sur la construction d'amorces spécifiques à la séquence d'intérêt. Les amorces « sens » et « anti-sens » sont localisées dans deux exons différents de la séquence du gène cible pour éviter une éventuelle contamination par l'ADN génomique (taille du produit différent). Les séquences des amorces (voir **tableau 5** ci-après) utilisées au cours de cette étude ont été désignées et vérifiées par 2 logiciels (Primer 3 & BLAST).

Gènes	N° GeneBank	Amorce sens (5'>3') Amorce anti-sens (5'>3')	Produit PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
CD36	NM_007643	CCA CTG TGT ACA GAC AGT TTT GG GCT CAA AGA TGG CTC CAT TG	195	60
CPT1β	NM_009948	TCA CCT GGG CTA CAC GGA GA TCG GGG CTG GTC CTA CAC TT	219	65
CS	NM_130755	CAA GAT TGT GCC CAA TAT CCT C TTC ATC TCC GTC ATG CCA TA	111	60
Drp1	NM_053655	CTG ACG CTT GTG GAT TTA CC CCC TTC CCA TCA ATA CAT CC	277	58
Fis1	NM_025562	GCC TGG TTC GAA GCA AAT AC CAC GGC CAG GTA GAA GAC AT	116	60
GLUT4	NM_009204	CCG TGG CCT CCT ATG AGA TAC T AGG CAC CCC GAA GAT GAG T	122	64
HK2	NM_013820	TTT CAC CTT CTC GTT CCC CT GTC ATT CAC CAC AGC CAC AA	175	60
MCAD	NM_007382	CCG TTC CCT CTC ATC AAA AG ACA CCC ATA CGC CAA CTC TT	129	60
MFN1	NM_024200	TGC CCT CTT GAG AGA TGA CC AGA GCC GCT CAT TCA CCT TA	182	60
MFN2	NM_133201	GGG GCC TAC ATC CAA GAG AG CCT TGG ACA GGT ACC CTT TG	115	60
NRF1	NM_010938	TTA CTC TGC TGT GGC TGA TGG CCT CTG ATG CTT GCG TCG TCT	92	60
OPA1	NM_133752	TCA GCA AAG CTT ACA TGC AGA TGC TTG GAC TGG CTA CAT TTT	180	60
PDK4	NM_013743	CCT TCA CAC CTT CAC CAC AT AAA GAG GCG GTC AGT AAT CC	189	60
PGC1α	NM_008904	CAC CAA ACC CAC AGA GAA CAG GCA GTT CCA GAG AGT TCC ACA	210	58
PPARα	NM_011144	AAG TGC CTG TCT GTC GGG AT GCT TCG TGG ATT CTC TTG CC	161	62
PPARβδ	NM_011145	GCC TCC ATC GTC AAC AAA GA TCT ACC TGG GGC ACA TTC AT	230	60
Tfam	NM_009360	GCT GAT GGG TAT GGA GAA G GAG CCG AAT CAT CCT TTG C	161	56

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées et conditions d'utilisation en PCR. (CD36 : *Cluster of differentiation 36*; **CPT1β:** *muscle isoform of Carnitine palmitoyl transferase I;* **CS:** *Citrate synthase;* **Drp1:** *Dynamin-1-like protein;* **Fis1:** *mitochondrial Fission 1 protein;* **GLUT4:** *Glucose transporter type 4;* **HK:** *Hexokinase;* **MCAD:** *Middle chain acylcoA dehydrogenase;* **MFN**: *Mitofusin;* **NRF:** *Nuclear respiratory factor;* **OPA1:** *Optic atrophy type 1;* **PDK:** *Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase;* **PGC :** *Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator;* **PPAR:** *Peroxisome proliferator activated receptor;* **Tfam:** *mitochondrial Transcription factor A*)

Les réactions de PCR ont été réalisées dans des plaques de 96 puits à fond conique, dans un volume de milieu réactionnel de 15µl, contenant 12,5ng de matrice (ADNc), 0,75µM de chaque amorce (sens et anti-sens) et 3µl de MasterMix (Roche+) composé de Taq polymérase thermo-résistante, dNTP et du SYBR Green I. La plaque est ensuite disposée dans un CFX96 (Bio-Rad), puis soumise à 45 cycles de dénaturation/hybridation/élongation. Après chaque phase d'élongation, la fluorescence émise par le SYBR Green est mesurée. Elle est proportionnelle à la quantité de produit formé. A la fin du protocole, pour confirmer la spécificité de l'amplification, les produits de PCR sont soumis à une analyse par courbe de fusion (65°C -> 95°C à 0,1°C/sec). La fluorescence chute brusquement et uniformément à la température de fusion lorsque le produit est pur et spécifique.

3.2.c-Analyse des résultats

La quantification en ARN_m pour chaque gène cible se fait par comparaison du C_t (*treshold cycle* ou cycle-seuil) obtenu par rapport à une série de 5 dilutions d'un standard (mix des ADN_c d'*Opa1*$^{+/+}$ sédentaire), analysée par PCR en même temps que les autres échantillons. Le calcul du C_t correspond au nombre de cycles nécessaires à la détection de la fluorescence. Il existe une relation linéaire inverse entre le C_t et le log de la quantité de matrice (ADNc). Pour chaque gène, une courbe linéaire standard (C_t = f(log ADNc)) est construite à partir du signal obtenu pour la gamme de dilutions. Les concentrations en ARNm de chaque échantillon sont alors calculées à partir de leur C_t et de cette courbe linéaire standard.

Pour compenser les variations dues à l'efficacité de la transcription inverse ou aux erreurs de manipulation, les résultats sont normalisés à l'expression du gène HK2 dont l'expression n'est pas influencée par les conditions expérimentales.

Chapitre V- : STATISTIQUES

L'ensemble des résultats obtenus est exprimé en moyenne ± SEM (S*tandard error of the mean*). Les différences entre les différents groupes sont considérées comme significative si $p \leq 0,05$.

Pour la première étude menée sur la caractérisation de la souche *Opa1*$^{+/-}$ vs *Opa1*$^{+/+}$*,* les mesures ont été comparées par un test t dit de Student. L'étude s'intéressant aux différences d'adaptation à l'hypertrophie entre les groupes *Opa1*$^{+/-}$-SHA*M*, *Opa1*$^{+/+}$ -SHAM, *Opa1*$^{+/-}$-TAC, *Opa1*$^{+/+}$ -TAC, a nécessité le recours à un test ANOVA à deux voies suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls.

Pour la seconde étude, les données relevées au cours de l'entraînement ou lors des tests de comportement des souris *Opa1*$^{+/-}$ et *Opa1*$^{+/+}$ ont été comparées par le test de Student apparié. L'analyse des différents paramètres d'adaptation à l'entraînement entre les groupes *Opa1*$^{+/-}$-sédentaire, *Opa1*$^{+/+}$ - sédentaire, *Opa1*$^{+/-}$-entrainé, *Opa1*$^{+/+}$ - entrainé, a été réalisée par le test ANOVA à deux voies suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls ou par le test ANOVA à mesure répétée.

Résultats

RESULTATS

Chapitre I : IMPLICATION DE LA PROTEINE OPA1 DANS L'ORGANISATION DU RESEAU MITOCHONDRIAL ET DANS LE FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE CARDIAQUE

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication en co-premier auteur, dans Cardiovascular Research (2012) 94, 408-417, sous le titre « **Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload** »

1. Présentation

Le cœur est l'un des organes les plus consommateurs en énergie. Pour cela, il dispose d'une ultrastructure cellulaire spécifique et organisée. De par cette organisation complexe, le remodelage du réseau mitochondrial du cardiomyocyte en réponse à un stress pathologique est plus que limité. Les mitochondries sont la source majeure d'énergie de ce tissu, la moindre altération de leur architecture peut engendrer des conséquences néfastes pour le fonctionnement correct de l'organe.

La première partie de ce projet de thèse a consisté à étudier l'impact de la délétion de la protéine de la dynamique OPA1 au niveau du cœur. Car bien que cette protéine y soit fortement exprimée, peu d'études ont été menées pour comprendre son importance.

Comme il a été montré par les travaux menés sur des modèles déficients pour des protéines de la dynamique mitochondriale (Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Griparic *et al.*, 2007; Olichon *et al.*, 2003), l'altération de ces protéines engendre des défauts du réseau mitochondrial. Il était intéressant de vérifier si ces observations se confirmaient avec l'altération de la protéine OPA1 dans un tissu disposant de peu de plasticité tel que le cœur. De plus, des études menées au laboratoire avaient permis de montrer que les transferts énergétiques entre les mitochondries et les organites voisins étaient étroitement liés à l'architecture cellulaire et à l'organisation du réseau mitochondrial. Nous nous sommes donc demandés si une modification de la morphologie mitochondriale, via une altération

d'OPA1, pouvait influencer ces transferts énergétiques. Enfin, nous avons voulu savoir si OPA1 pouvait également jouer un rôle dans les capacités métaboliques des mitochondries (capacités oxydatives et utilisation des substrats) et dans la contractilité cardiaque. En effet, des études menées sur la drosophile (Shahrestani *et al.*, 2009) ont montré que la mutation hétérozygote d'OPA1 s'accompagnait d'arythmies et d'une diminution de la fréquence cardiaque. Il nous restait à vérifier si, chez les mammifères, la perte d'OPA1 pouvait également induire des anomalies de la fonction cardiaque, ou si ces anomalies n'apparaissaient qu'en condition de stress pathologique.

Finalement, une perturbation de la balance fusion-fission peut perturber la sensibilité des mitochondries à la mort cellulaire programmée. En général, on considère qu'une forte augmentation de mitochondries fragmentées tend à provoquer la mort de la cellule, tandis qu'une augmentation du volume mitochondrial l'en protège (Cipolat *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2002; Pidoux *et al.*, 2011). Afin de mieux caractériser l'impact de la perte d'OPA1, il nous fallait donc également mesurer son rôle dans la fonction d'un des acteurs de cette mort cellulaire, le pore de transition de perméabilité (PTP).

Pour mener à bien cette étude, nous disposions d'un modèle déficient pour la protéine OPA1. Il a été nécessaire d'employer des techniques permettant d'étudier l'organisation de l'architecture cellulaire et plus précisément du réseau mitochondrial, les fonctions oxydatives mitochondriales ainsi que l'efficacité des transferts énergétiques, et la sensibilité à la mort cellulaire dans notre modèle murin. La fonction cardiaque a également été analysée en conditions physiologiques et pathologiques (sténose chirurgicale de l'aorte).

2. ***Résultats et discussions***

Avant toute première investigation, il nous était nécessaire de vérifier le taux d'expression protéique d'OPA1 dans nos souris transgéniques. Il a ainsi été montré que les animaux de 5 mois présentaient une réduction de 50% d'OPA1 par rapport aux souris contrôles au niveau du cœur, ce qui est cohérent avec les résultats précédents obtenus dans la rétine par l'équipe ayant fourni la souche murine (Alavi

et al., 2007). L'étude préliminaire sur les animaux de 5 mois a également permis de vérifier que la perte d'OPA1 n'induisait pas de phénomènes de compensation au niveau de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle des autres protéines de la dynamique mitochondriale. Les expressions de Drp1, Fis1, Mfn1, Mfn2 ne sont pas modifiées. Cette étude a également révélé qu'aucune différence de développement de masse corporelle (poids du corps, longueur tibia) ou cardiaque n'était visible entre les animaux.

Nous avons ensuite pu déterminer que la perte de la protéine OPA1 avait des conséquences sur l'architecture de la cellule cardiaque, ainsi que sur la morphologie de son réseau mitochondrial, mais pas sur la masse mitochondriale. Deux techniques microscopiques complémentaires (MET et confocale) ont révélé que les fibres papillaires des souris *Opa1*$^{+/-}$ disposaient d'une organisation intracellulaire altérée par la présence de nombreux amas de mitochondries, et que ces mitochondries présentaient une plus grande hétérogénéité dans leur forme et leur taille, ainsi que des crêtes altérées. Les mitochondries sont moins nombreuses mais plus volumineuses, mais le volume mitochondrial et cellulaire sont similaires à celui des cellules contrôles. Ces observations microscopiques ont été confirmées par les mesures de l'expression de la biogénèse mitochondriale (PGC-1α et β, NRF, TFAM, ERRα, PPARα) et par les mesures de l'activité de la CS, complexe I et CK qui sont identiques aux contrôles.

La présence de mitochondries géantes fusionnées par leurs membranes externes uniquement, suggère que le processus fusionnel est initié, mais bloqué ensuite à l'étape de la fusion des membranes internes dû à la perte d'OPA1. Toutefois, ces résultats vont à l'encontre des publications précédentes réalisées sur la perte de protéines de la fusion (Mfn1, Mfn2 et OPA1) qui conduisent invariablement à la fragmentation du réseau mitochondrial (Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Griparic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007). Une hypothèse est que l'impossibilité de dynamisme des mitochondries dans le cardiomyocyte, de par son organisation intracellulaire rigide et dense, est peut-être la source de cette différence d'observation.

La structure des mitochondries étant altérée par la perte de la protéine OPA1, dans un second temps, nous avons voulu vérifier si l'intégrité fonctionnelle et les capacités de transferts énergétiques des mitochondries avec les organites voisins étaient préservées. La perte de la protéine OPA1 a peu de conséquences sur les propriétés oxydatives des mitochondries, que ce soit sur le plan des capacités respiratoires, le couplage entre oxydation et phosphorylation et celui entre la phosphorylation oxydative et la mi-CK qui ne montrent pas de différence notable. Une sensible diminution de l'utilisation des acides gras est mesurée dans le tissu cardiaque. Le niveau de stress oxydatif est aussi similaire. Mais l'étude des transferts énergétiques directs entre les mitochondries et les organites consommateurs (au niveau du SERCA dans le RS ou de l'ATPase dans les myofilaments) s'est révélée très intéressante, car elle a permis de déterminer que l'efficacité des transferts était identique entre les mitochondries et SERCA, mais qu'elle était altérée avec les myofilaments.

De même, nous avons voulu savoir si la perte d'OPA1 modifiait la sensibilité des mitochondries à la mort cellulaire programmée. A l'aide d'expériences de fluorescence, en présence ou non d'un inhibiteur spécifique du PTP (Cyclosporine A), nous avons pu établir la présence d'un lien entre la mutation OPA1 et des modifications des fonctions du PTP, tel que le développement d'une résistance à l'ouverture du PTP et une augmentation des capacités de rétention du calcium par les mitochondries.

Dans un troisième temps, nous avons étudié les conséquences de la perte d'OPA1 sur la fonction cardiaque en condition physiologique ou pathologique. Les études menées sur les souris *Opa1*$^{+/-}$ ont révélé que les animaux possédaient une fonction cardiaque identique et une fréquence cardiaque normale, avec des réserves contractiles identiques lors d'un stress adrénergique avec la dobutamine. Toutefois, lorsque les même souris étaient soumises à un stress pathologique tel que l'induction d'une hypertrophie cardiaque par constriction chirurgicale de l'aorte, alors la perte d'OPA1 était associée à une hypertrophie plus élevée et à des altérations plus sévères de la fonction cardiaque. Ce dernier résultat est compatible avec celui observé dans le modèle drosophile (Shahrestani *et al.*, 2009), bien qu'obtenu uniquement en condition pathologique.

En conclusion (voir Figure 47), la perte d'OPA1 induit un remodelage de la structure interne des mitochondries, qui perturbe l'organisation générale du réseau mitochondrial, ainsi que celle de l'architecture cellulaire. Toutefois, en conditions physiologiques, ces modifications n'impliquent que des altérations mineures des fonctions oxydatives mitochondriales, et ne perturbent pas la fonction cardiaque. Les propriétés du PTP sont cependant modifiées. Ce n'est qu'en cas de stress pathologique que ces perturbations architecturales et du PTP montreraient leur effet, notamment en induisant une augmentation de la sensibilité du cœur au stress mécanique.

Cardiovascular Research (2012) **94**, 408–417
doi:10.1093/cvr/cvs117

Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload

Jerome Piquereau[1,2†], Fanny Caffin[1,2†], Marta Novotova[3], Alexandre Prola[1,2], Anne Garnier[1,2], Philippe Mateo[1,2], Dominique Fortin[1,2], Le Ha Huynh[1,2], Valérie Nicolas[2], Marcel V. Alavi[4], Catherine Brenner[1,2], Renée Ventura-Clapier[1,2], Vladimir Veksler[1,2], and Frédéric Joubert[1,2*]

[1]INSERM, U-769, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J-B Clément, F-92296 Châtenay-Malabry, France; [2]Univ Paris-Sud, IFR141, F-92296 Châtenay-Malabry, France; [3]Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic; and [4]Department of Biologie, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz, Mainz, Germany

Received 20 October 2011; revised 29 February 2012; accepted 6 March 2012; online publish-ahead-of-print 8 March 2012

Time for primary review: 25 days

Aims The optic atrophy 1 (OPA1) protein is an essential protein involved in the fusion of the mitochondrial inner membrane. Despite its high level of expression, the role of OPA1 in the heart is largely unknown. We investigated the role of this protein in $Opa1^{+/-}$ mice, having a 50% reduction in OPA1 protein expression in cardiac tissue.

Methods and results In mutant mice, cardiac function assessed by echocardiography was not significantly different from that of the $Opa1^{+/+}$. Electron and fluorescence microscopy revealed altered morphology of the $Opa1^{+/-}$ mice mitochondrial network; unexpectedly, mitochondria were larger with the presence of clusters of fused mitochondria and altered cristae. In permeabilized mutant ventricular fibres, mitochondrial functional properties were maintained, but direct energy channelling between mitochondria and myofilaments was weakened. Importantly, the mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening in isolated permeabilized cardiomyocytes and in isolated mitochondria was significantly less sensitive to mitochondrial calcium accumulation. Finally, 6 weeks after transversal aortic constriction, $Opa1^{+/-}$ hearts demonstrated hypertrophy almost two-fold higher ($P < 0.01$) than in wild-type mice with altered ejection fraction (decrease in 43 vs. 22% in $Opa1^{+/+}$ mice, $P < 0.05$).

Conclusions These results suggest that, in adult cardiomyocytes, OPA1 plays an important role in mitochondrial morphology and PTP functioning. These properties may be critical for cardiac function under conditions of chronic pressure overload.

Keywords Cardiac energy metabolism • Mitochondria • Mitochondrial dynamics • Permeability transition pore • Hypertrophy

1. Introduction

Changes in mitochondrial morphology appear essential for the function or dysfunction of most tissues. Mitochondrial fusion and fission are highly regulated and tightly balanced processes. In mammalian cells, mitochondrial fission is regulated by dynamin-related protein 1 (DRP1) and its receptor FIS1 (fission-mediator protein 1) (for review, see Liesa *et al.*[1]). In turn, mitochondrial fusion is mediated by two mitofusins (MFN1 and MFN2),[2] which are involved in outer membrane fusion, and OPA1 (optic atrophic type 1 protein), which is closely linked to the inner membrane.[3] Mutations of genes encoding these proteins lead to severe diseases, especially neurological disorders, such as Charcot–Marie–Tooth disease type 2A for *Mfn2* or autosomal dominant inherited optic atrophy (DOA) for *Opa1* mutations.[4–7]

OPA1 is a ubiquitously expressed protein[4,8] and its level is particularly up-regulated in the heart. Because OPA1 is involved in the regulation of the dynamics of mitochondria that occupy ~30% of the

† Both authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +33 1 46 83 52 48; fax: +33 1 46 83 54 75, Email: frederic.joubert@u-psud.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

cardiac cell volume, OPA1 may play a role in cardiac energy metabolism. We have previously shown that the energetic transfer between mitochondria and energy-consumers performed by direct adenylic nucleotide channelling (DANC)[9] is closely related to the cell architecture and mitochondrial network.[10,11] Finally, because decreased mitochondrial content and mitochondrial fragmentation are key features of cardiac diseases,[12,13] alterations of mitochondrial morphology could be of major pathophysiological relevance.[14] Indeed, a heterozygous mutation of *Opa1* in *Drosophila*[15] is associated with decreased heart rate and cardiac arrhythmia, suggesting that a loss of OPA1 could induce cardiac function abnormalities. Heart tube-specific knockdown of Opa1 also induces heart tube dilation with profound contractile impairment.[16] In heart failure, a decrease in OPA1 protein content associated with mitochondrial fragmentation[17] has been shown but the exact role of OPA1 depletion in the adult mammalian heart has not yet been assessed.

Recently, a mouse model carrying a splice mutation in the *Opa1* gene leading to haploinsufficiency was described.[18,19] While homozygous mutants die *in utero*, heterozygous mutants are viable but exhibit an age-dependent loss of retinal ganglion cells (characteristic of DOA) with a disorganization of the mitochondrial cristae. This mouse model thus appears to be of great interest in studying the role of OPA1 in mitochondrial morphology, organization, and function in the heart.

2. Methods

Supplementary methods are available in the Supplementary material online.

2.1 Animals

The B6;C3-*Opa1*$^{329-355del}$ mouse line (herein referred to as *Opa1*$^{+/-}$) has been described in details before.[18–20] Basal cardiac phenotype was determined in 6-month-old male mice, while 10-week-old mice were submitted to transverse aortic constriction (TAC) to estimate the ability of mutated mouse hearts to adapt to pathological stress. Anaesthesia was induced by ip injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). Aortic stenosis was induced by placing a silk suture around the aorta after thoracic incision. Age-matched controls underwent the same procedure without placement of suture. Mice were studied 6 weeks after surgery. All mice were anaesthetized by ip injection of pentobarbital (200 mg/kg). The depth of anaesthesia was checked by toe pinch before the start of surgery. After thoracotomy, the animals' hearts were excised and rinsed in ice-cold calcium-free Krebs solution equilibrated with 95% O_2-5% CO_2.

All experiments were performed in conformity with the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament). Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. 92-284, 27 June 2007).

2.2 Biochemical analysis

Frozen tissues were used to measure activities of total creatine kinase (CK), citrate synthase (CS), and mitochondrial complex I by standard spectrophotometric assays as previously described.[11]

2.3 Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed using a 12 MHz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anaesthesia. Two-dimensional-guided (2D) M-mode echocardiography was used to determine wall thickness and left ventricular (LV) chamber volume at systole and diastole and contractile parameters, such as fractional shortening (FS) or ejection fraction (EF).

2.4 Cardiomyocyte isolation

Retrograde heart perfusion according to the Langendorff method was performed to isolate cardiomyocytes as previously shown.[21] The cells were plated onto dishes coated with laminin and were kept at room temperature for 2 h.

2.5 Morphological description of mitochondrial network by fluorescence microscopy

Freshly isolated cardiomyocytes were incubated for 45 min at room temperature with 500 nM Mito-Tracker Orange dye to label mitochondria and with 1 μM calcein to estimate global cell volume (Invitrogen). Three-dimensional reconstruction was performed using the IMARIS software (Bitplane Company, Zurich, Switzerland).

2.6 Electron microscopy

Samples of LV papillary muscle from 6-month-old mice were prepared for electron microscopy as previously described.[10]

2.7 Analysis of *in situ* mitochondrial function

Mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin-permeabilized fibres, as previously described.[22] Fibres were exposed to increasing (ADP), and the ADP-stimulated respiration above basal oxygen consumption (V_0) was plotted to determine the apparent K_m for ADP and the maximal respiration rate (V_{max}). The acceptor control ratio (ACR), an index of the oxidation–phosphorylation coupling, was calculated as V_{max}/V_0 in the presence of glutamate/malate as substrates.

2.8 Estimation of energy transfer to sarcoplasmic reticulum and myofilaments

For measurements of sarcoplasmic reticulum (SR) and myofibrillar function, papillary muscle fibres were dissected and permeabilized for 30 min in saponin (50 μg/mL), as previously described.[9] The contribution of the energetic transfer system, the CK system, and the DANC to the provision of ATP for SR ATPase (SERCA) function, was estimated by measuring the SR calcium content in saponin-permeabilized fibres after loading under various energetic conditions, as previously described.[10,11] The pMgATP/rigour tension relation was used to studying the ability of the different energetic systems to supply ATP for myosin ATPase.[23]

2.9 Mitochondrial permeability transition pore experiments

For permeability transition pore (PTP) experiments, fresh cardiomyocytes were co-loaded in culture medium with 5 μM Rhod-2 and 1 μM calcein (Invitrogen) for 45 min at room temperature and washed with culture medium solution.

In additional experiments, mitochondria from *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ were isolated according to[24]. Swelling and depolarization of mitochondria were monitored after Ca^{2+} addition as described in[25].

2.10 Quantitative RT–PCR

RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen), and transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, France). Real-time PCR was performed using TaqMan low density array technology (see Supplementary material online).

2.11 Statistical analysis

Values are expressed as means ± SEM. The statistical significance of the difference between the *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ groups was estimated by Student's *t*-test, and when necessary by two-way ANOVA using the Newman–Keuls *post hoc* test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

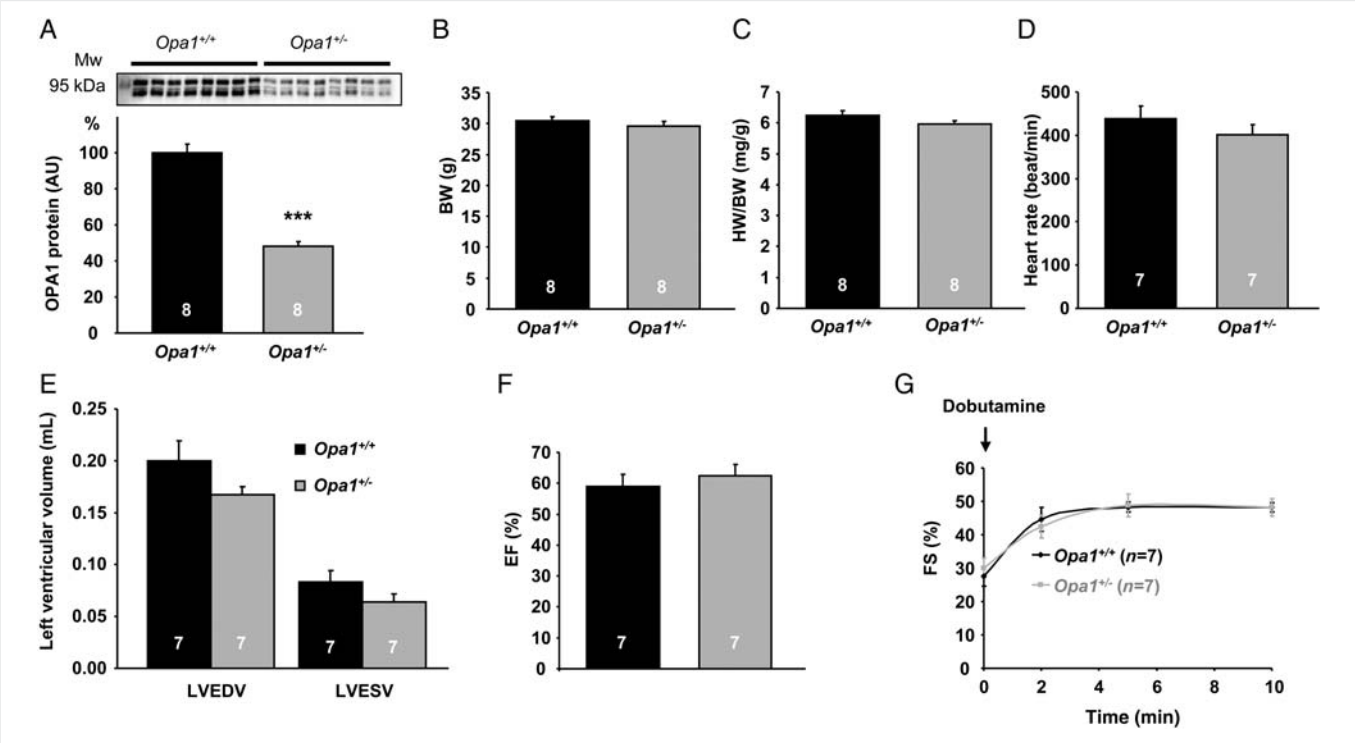


Figure 1 Anatomical characteristics and cardiac function of 6-month-old $Opa1^{+/+}$ and $Opa1^{+/-}$ mice. (*A*) Western blot analysis of OPA1 protein. Upper panel: a representative original recording. Lower panel: mean values of OPA1 protein. ***$P < 0.001$ vs. $Opa1^{+/+}$. (*B*) Body weight (BW). (*C*) Heart weight to body weight (HW/BW) ratio. (*D*) Heart rate. (*E*) LV end-diastolic volume (LVEDV) and LV end-systolic volume (LVESV). (*F*) LV ejection fraction (EF). (*G*) LV fractional shortening (FS) after dobutamine stimulation.

3. Results

3.1 Anatomical characteristics and heart function

The heterozygous mutation in *Opa1* resulted in a ~50% reduction in OPA1 protein (*Figure 1A*) in line with previous results.[18] Six-month-old $Opa1^{+/-}$ mice displayed normal body weight and growth (*Figure 1B*). There was no difference in heart weight between $Opa1^{+/+}$ and $Opa1^{+/-}$ mice (*Figure 1C*). The heart rate, LV end-diastolic and LV end-systolic volumes, as well as EF assessed by echocardiography, were normal in $Opa1^{+/-}$ (*Figure 1D–F*). Similarly, the contractile reserve, revealed by infusion of dobutamine (a β-adrenergic receptor agonist), was not compromised in $Opa1^{+/-}$ mice (*Figure 1G*). Thus, in adult $Opa1^{+/-}$ mice, cardiac function was normal and able to respond normally to an acute stimulation.

3.2 Cardiomyocyte ultrastructure and mitochondrial network organization

Compared with $Opa1^{+/+}$, the mitochondrial network in $Opa1^{+/-}$ cardiomyocytes appeared to be more heterogeneous, with larger mitochondria and/or an increase in the number of mitochondrial clusters and an increase in volume dispersion (*Figure 2A*). IMARIS analysis revealed that $Opa1^{+/-}$ cardiomyocyte and global mitochondrial volumes were identical to control (*Figure 2B* and *C*). However, the distribution of mitochondrial volumes was shifted, with an increase in the percentage of large mitochondria ($P < 0.01$) and a decrease in the proportion of small mitochondria in $Opa1^{+/-}$ cardiomyocytes ($P < 0.05$) (*Figure 2E*). This is consistent with a decreased number of mitochondria per cell (*Figure 2D*). These results show that OPA1 partial deficiency affects the mitochondrial network morphology of adult cardiomyocytes by modifying the distribution and morphology of individual mitochondria rather than the global mitochondrial volume.

To describe more precisely the structure of $Opa1^{+/-}$ mitochondria, we performed detailed electron microscopic analysis of cardiac tissue. Compared with $Opa1^{+/+}$ hearts where mitochondria form regular rows that extended along myofibrils (*Figure 3A* and *B*, upper panel; and *A*, lower panel), the arrangement of mitochondria in $Opa1^{+/-}$ cardiomyocytes was mostly irregular (*Figure 3C*, upper panel), with clusters of mitochondria (*Figure 3C* and *D*, upper panel) and high variability in size and shape (*Figure 3B*, upper panel), which was clearly visible in transverse sections (*Figure 3D*, upper panel). The mitochondrial cristae of $Opa1^{+/-}$ formed semi-circular areas alternating with areas of disintegrated cristae within the same mitochondrion and unusual areas displaying slight spatial deformation of cristae inside mitochondria (*Figure 3B*, lower panel). Other mitochondria displayed fragmented cristae (*Figure 3C*, lower panel) together with foci in the matrix that were devoid of cristae and the formation of free spaces between the outer and inner mitochondrial membranes (*Figure 3C*, lower panel). Typically, the presence of large mitochondria was accompanied by the presence of dark material that coincided with the disappearance of the outer and inner mitochondrial membranes. These defects may represent the sites where abnormal non-completed mitochondrial fusion took place due to the deficiency in OPA1 (*Figure 3D*, lower panel).

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

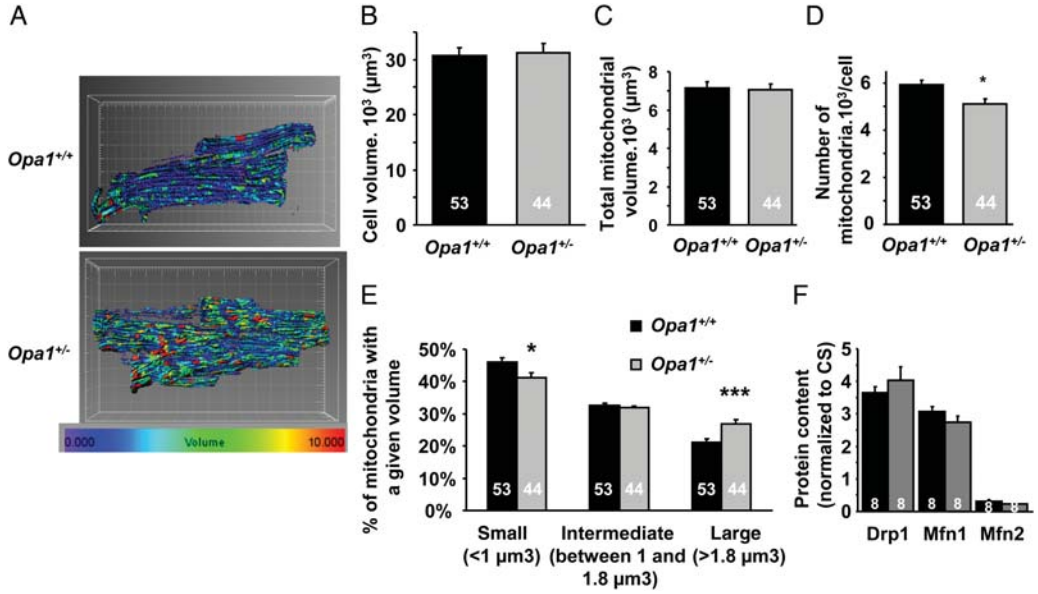


Figure 2 Morphological description of the mitochondrial network. (*A*) Representative pictures obtained with Mito-Tracker orange and IMARIS software. Each mitochondrion is identified by a colour in accordance with its volume (the smallest mitochondria are blue and the largest are red). (*B*) Cell volume measured by calcein loading and IMARIS analysis. (*C*) Total mitochondrial volume quantified by IMARIS. (*D*) The number of mitochondria per cell. (*E*) Percentage of mitochondrial size categories. (*F*) Level of proteins involved in mitochondrial dynamics (Drp1, Mfn1, Mfn2) in $Opa1^{+/+}$ and $Opa1^{+/-}$ cardiac tissue estimated by Western blot analysis (normalized to citrate synthase level). $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$ vs. $Opa1^{+/+}$.

We confirmed by EM analysis an increase in the mean surface of individual mitochondria (Supplementary material online, *Figure S1*), showing that the observed larger mitochondria observed in fluorescence were not clusters of small mitochondria, and that OPA1 partial deletion in the heart results in large mitochondria with incomplete fusion of inner membranes.

We also determined whether partial OPA1 deletion was accompanied by compensatory responses of other proteins involved in mitochondrial dynamics. Gene expression of *Drp1*, *Fis1*, *Mfn1*, and *Mfn2* was similar between control and mutant mice (Supplementary material online, *Figure S2*), showing no modification at the transcription level. Western blot experiments also revealed no compensation at the protein level (*Figure 2F*).

3.3 Oxidative capacity and energy transfer between mitochondria and myofilaments

We investigated whether the decrease of OPA1 expression could alter the intrinsic mitochondrial function. Basal and maximal respirations (when complex I, complex I and II, or complex II alone was activated) were not significantly different between the two groups (*Figure 4A*). Consequently, the coupling between oxidation and phosphorylation did not show any notable difference (*Figure 4B*). The sensitivity of mitochondrial respiration to ADP was estimated with and without creatine to study the coupling of oxidative phosphorylation with mitochondrial creatine kinase (mi-CK). The K_m for ADP without (K_{mADP}) and with creatine ($K_{mADP+Cr}$) was significantly lower in mutant mice (*Figure 4C*). However, the mi-CK functional efficacy assessed by $K_{mADP}/K_{mADP+Cr}$ was not significantly different between the two groups (2.6 ± 0.3 vs. 2.4 ± 0.6). Finally, when respiration was measured with octanoyl carnitine as the substrate, $Opa1^{+/-}$ cardiac mitochondria were less able to oxidize lipids than those of control mice (*Figure 4D*).

We also determined whether factors involved in mitochondrial biogenesis (PGC-1α and β, NRF, TFAM, ERRα, PPARα), glucose transport (GLUT1 and 4), and β-oxidation (CPT1, MCAD, LCAD) were modified. Except for a small decrease in NRF1 and a small increase in TFAM, none of the mRNA levels of these genes was modified (*Figure 4E*). Similarly, activities of CS, complex I, and total CK were not significantly different in $Opa1^{+/-}$ mice compared with $Opa1^{+/+}$ mice (*Figure 4F*). Finally, the level of oxidative stress was similar in $Opa1^{+/-}$ and $Opa1^{+/+}$ mice as estimated by the Oxyblot kit and by measuring aconitase/fumarase activities, Hsp60 protein level, and SOD and GPX1 mRNA levels (Supplementary material online, *Figure S3*). The same result was obtained for markers of autophagy which were not modified (Supplementary material online, *Figure S4*).

All these data demonstrate that down-regulation of OPA1 does not alter the respiratory capacity of mitochondria, oxidative stress status, or mitochondrial mass but may induce metabolic reprogramming at the level of substrate utilization.

Because energetic transfers, especially direct DANC between energy-producers (mitochondria) and energy-consumers (SERCA and ATPase of myofilaments), depend on the specific arrangement of the organelles in the cell, we measured energy transfer to SERCA in saponin-permeabilized ventricular fibres. The efficacy of each system (DANC or CK) was estimated relative to the efficacy of exogenous ATP only. The estimated maximal SR loading capacity under optimal energetic conditions in the presence of exogenous ATP, PCr, and working mitochondria was similar in both groups of mice. CK efficacy as well as DANC efficacy were also similar in $Opa1^{+/-}$ and $Opa1^{+/+}$ mice, suggesting that the adenine nucleotide channelling between mitochondria and SERCA was not altered by OPA1 deficiency (*Figure 4G*). EM images obtained in transversal

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

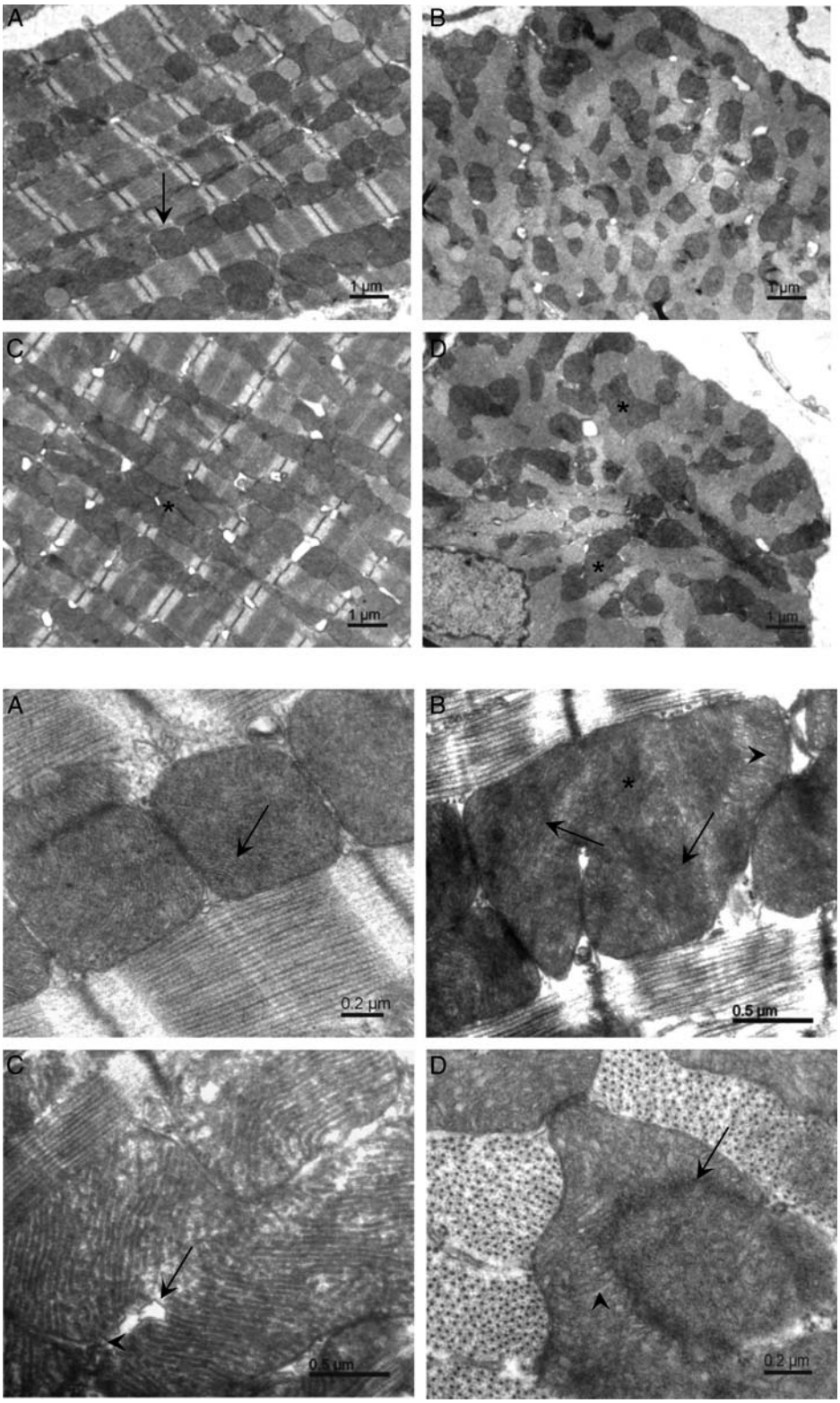


Figure 3 Electron micrographs of mitochondria in cardiomyocytes from *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. Upper panel: longitudinal (*A*) and transverse (*B*) sections of *Opa1*$^{+/+}$ cardiomyocytes show individual mitochondria (arrow). Longitudinal (*C*) and transverse (*D*) sections of *Opa1*$^{+/-}$ cardiomyocytes demonstrate mitochondrial clusters (asterisks). Lower panel: (*A*) *Opa1*$^{+/+}$ cardiomyocytes. Cristae are homogeneously distributed in the mitochondria (arrow). (*B–D*) *Opa1*$^{+/-}$ cardiomyocytes showing enlarged mitochondria and incompletely fused cristae. (*B*) Cristae spreading in different directions (arrows); area of disintegrated cristae (asterisks); area of deformation of cristae (arrowhead). (*C*) Fragmented cristae (arrow); separation between inner and outer mitochondrial membranes (arrowhead). (*D*) Regions of incomplete mitochondrial fusion (arrow). Note that the peripheral part of the mitochondrion contains normal cristae (arrowhead).

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

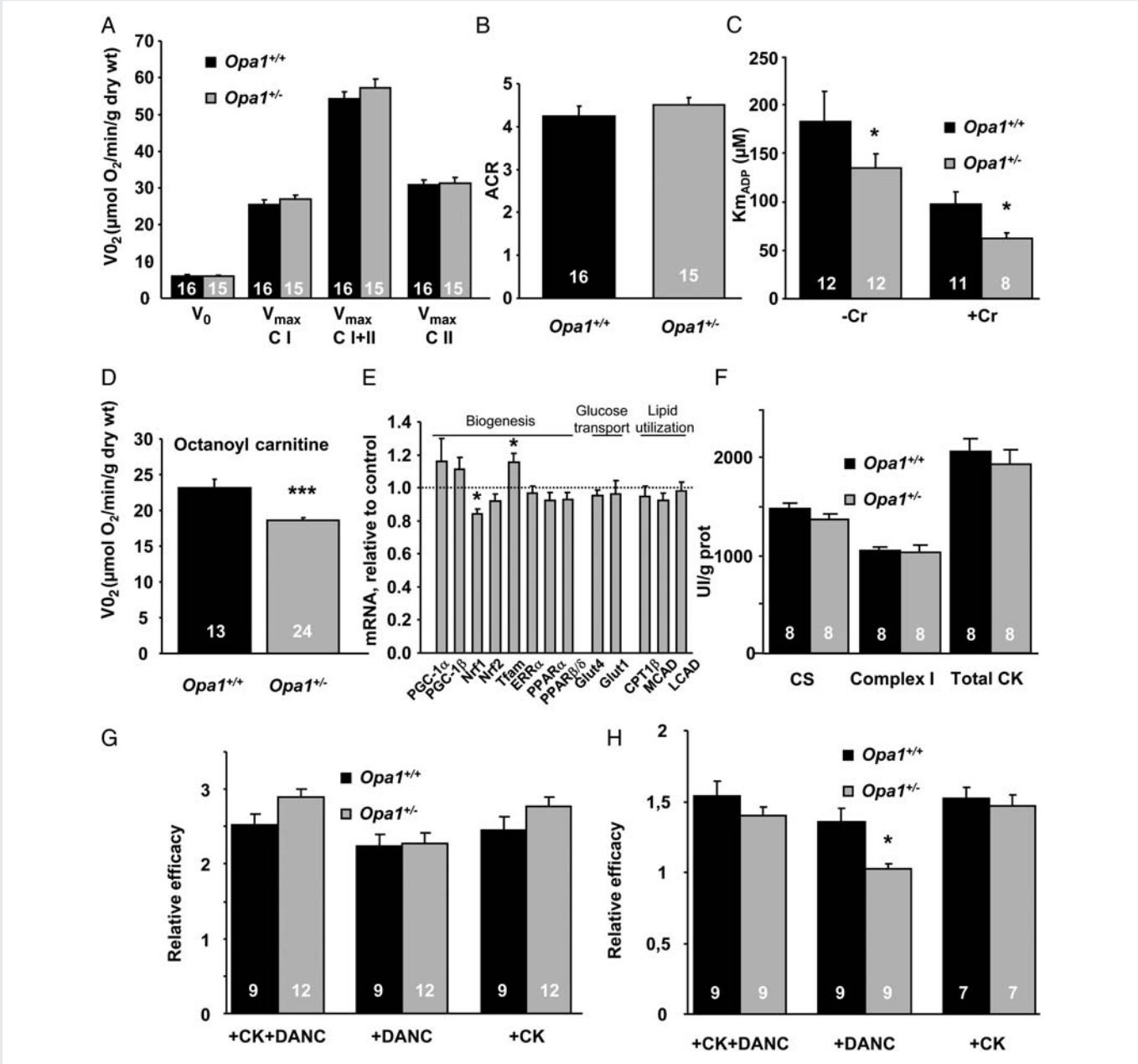


Figure 4 Cardiac energy metabolism of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. (*A*) Oxygen consumption rate of skinned ventricular fibres in the absence (V_0) or presence of 2 mM ADP (V_{max}) with 10 mM glutamate and 4 mM malate (complex I, CI), 15 mM succinate (both CI and complex II CI + II), and after complex I inhibition with 2 mM amytal (CII). (*B*) Acceptor control ratio. (*C*) Apparent K_m of oxygen consumption for ADP with (+Cr) or without (−Cr) 12 mM creatine. (*D*) Oxygen consumption rate with 2 mM ADP and 4 mM malate and 0.1 mM octanoyl carnitine. (*E*) mRNA levels of proteins involved in mitochondrial biogenesis, glucose transport, and lipid utilization. (*F*) Citrate synthase (CS), complex I and total creatine kinase (CK) activities. (*G* and *H*) Efficacy of CK and mitochondria (DANC) to support SERCA (*G*) or myosin ATPase (*H*) in permeabilized fibres. *$P < 0.05$ vs. *OPA1*$^{+/+}$ ***$P < 0.001$ vs. *OPA1*$^{+/+}$.

sections confirmed that there was also no apparent change in SR mitochondrial contacts (Supplementary material online, *Figure S5*).

The ability of these different energetic systems to support myosin-ATPase activity was then assessed by measuring the rigour tension developed by permeabilized fibres when the MgATP concentration was progressively decreased. The ability of DANC plus CK or CK alone to provide a high ATP/ADP ratio in the myofibrillar compartment was similar for the two groups (*Figure 4H*). However, DANC in *Opa1*$^{+/-}$ mice was significantly less efficient than in *Opa1*$^{+/+}$ mice: in *Opa1*$^{+/+}$ fibres, working mitochondria shifted $pMgATP_{50}$ for rigour by 1.36 ± 0.09 units, whereas, in Opa1$^{+/-}$ fibres, this parameter was as low as 1.03 ± 0.04 ($P < 0.01$). This showed that direct adenine nucleotide channelling from mitochondria to myosin ATPase was altered in hearts of *Opa1*$^{+/-}$ mice.

3.4 Mitochondrial Ca^{2+} retention capacity and permeability transition pore properties

The impact of partial Opa1 deficiency on the mitochondrial calcium retention capacity (CRC) and the PTP state was assessed *in situ* in

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

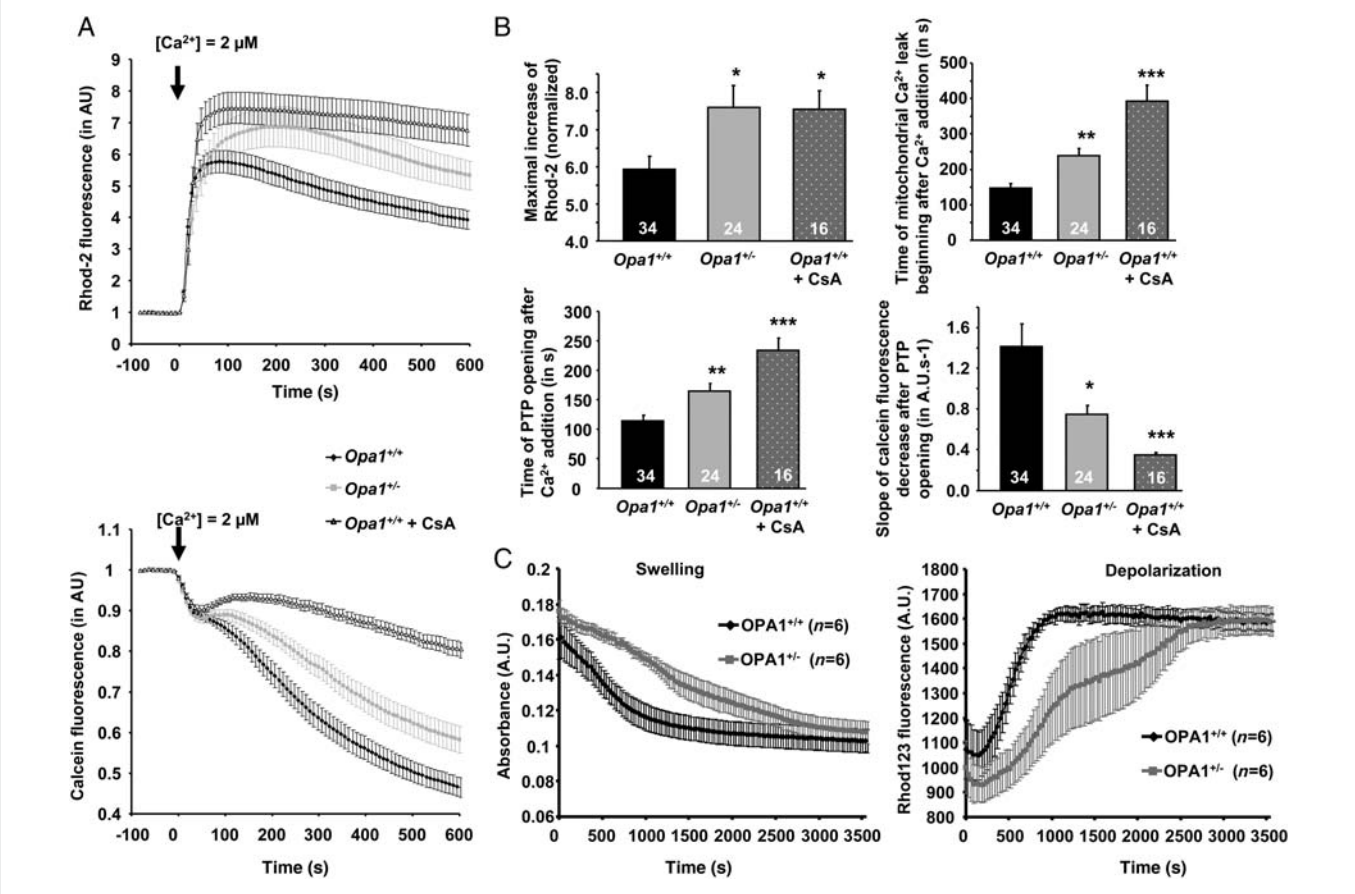


Figure 5 Kinetics of mitochondrial calcium loading and PTP opening in permeabilized cardiomyocytes and isolated mitochondria of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. (*A*) Upper panel: time course of mitochondrial calcium accumulation following Ca^{2+} addition (indicated by arrow) measured by Rhod-2 fluorescence. Lower panel: time course of mitochondrial calcein fluorescence following Ca^{2+} addition (indicated by arrow). (*B*) Mean values of mitochondrial calcium loading capacity and PTP opening properties. Upper panel, maximal increase of Rhod-2 fluorescence (left panel) and time to the beginning of mitochondrial Ca^{2+} leak after Ca^{2+} addition (right panel). Lower panel, time to PTP opening after Ca^{2+} addition (left panel), and slope of calcein fluorescence decrease after PTP opening (right panel). $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ vs. *Opa1*$^{+/+}$. (*C*) Time course of swelling (left) and depolarization (right) of isolated mitochondria after addition of 25 µM Ca^{2+}.

permeabilized cardiomyocytes by fluorescence techniques. Following addition of 2 µM calcium, intra-mitochondrial [Ca^{2+}] progressively increased, as indicated by the rise in Rhod-2 fluorescence, until PTP opening-induced calcium loss from the mitochondrial matrix (*Figure 5A*, upper panel). Similarly, PTP opening provoked the release of intra-mitochondrial calcein, which induced a decrease in calcein fluorescence (*Figure 5A*, lower panel). The addition of cyclosporin A greatly reduced the leakage of calcein and Rhod-2 fluorescence, confirming that the observed phenomenon was indeed PTP opening. In comparison with *Opa1*$^{+/+}$ cardiomyocytes, *Opa1*$^{+/-}$ cells loaded more calcium and PTP opening was delayed (*Figure 5A* and *B*). Statistical analysis demonstrated a significant increase in mitochondrial CRC in *Opa1*$^{+/-}$ cardiomyocytes and, consequently, a shift in the onset of Ca^{2+} leakage from mitochondria (*Figure 5B*, upper panel), suggesting a change in the probability of PTP opening. This finding was confirmed by the analysis of calcein traces, which showed a delay in calcein leak and PTP opening, as well as a decrease in the rate of calcein leak in *Opa1*$^{+/-}$ cardiomyocytes (*Figure 5B*, lower panel). These results demonstrated a link between mutation in *Opa1* and changes in mitochondrial PTP function and mitochondrial CRC.

We confirmed these results using isolated mitochondria (*Figure 5C*). Swelling and depolarization of mitochondria were monitored after addition of 25 µM Ca^{2+}. We observed no difference in the resting membrane potential, as assessed by Rhod123 fluorescence. Furthermore, after Ca^{2+} the addition of, as in isolated permeabilized cardiomyocytes, a delay in the opening of mPTP in *Opa1*$^{+/-}$ *mice* was observed. Indeed, $t_{1/2}$ for depolarization and swelling curves were 8.7 ± 0.7 and 10.4 ± 0.8 min, respectively, in *Opa1*$^{+/+}$, but increased to 22.0 ± 4.7 and 24.0 ± 4.4 min in *Opa1*$^{+/-}$ *mice* ($P < 0.05$). Thus, the modifications of PTP function were intrinsically linked to the lack of OPA1 in mitochondria.

3.5 Myocardial hypertrophy and myocardial dysfunction induced by pressure overload

To estimate the role of OPA1 in cardiac response to mechanical stress and to unmask possible loss in functional reserve, we

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

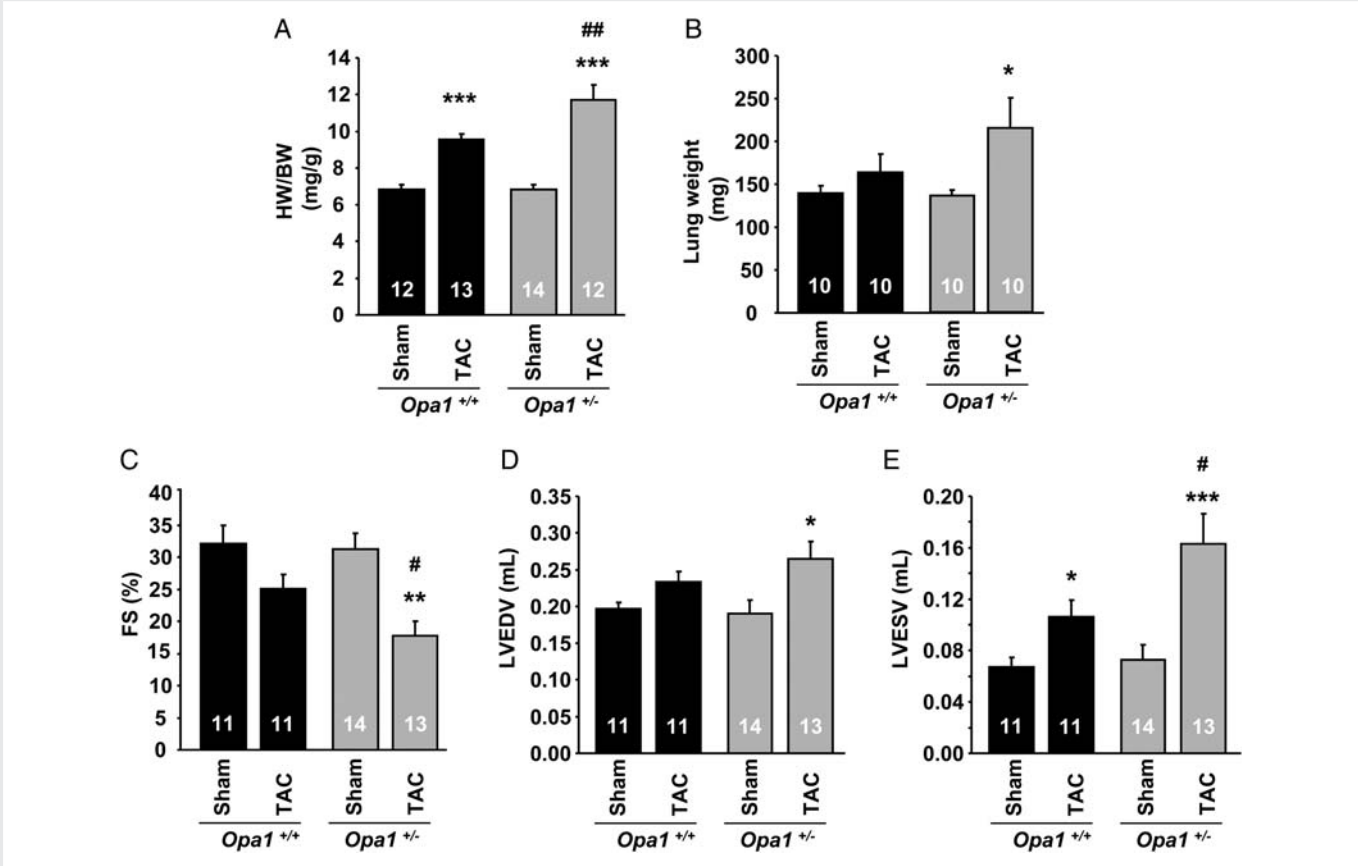


Figure 6 Anatomical characteristics and echocardiographic data of $Opa1^{+/-}$ mice following transverse aortic constriction (TAC). (*A*) Heart weight to body weight ratio. (*B*) Lung weight. (*C*) Fractional shortening. (*D*) Left ventricular end-diastolic diameter. (*E*) Left ventricle end-systolic volume. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ vs. sham. $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$ vs. $Opa1^{+/+}$-TAC.

performed echocardiographic analysis 6 weeks after TAC. In both sham groups ($Opa1^{+/+}$-sham and $Opa1^{+/-}$-sham), the heart weight/body weight ratio (*Figure 6A*) and parameters of the cardiac function (*Figure 6C–E*) were similar. On the other hand, hearts from $Opa1^{+/-}$-TAC mice showed an almost two-fold greater hypertrophy (+72%) than did $Opa1^{+/+}$-TAC (+40%) (*Figure 6A*). The high level of hypertrophy was associated with significant alterations of cardiac function. In contrast to $Opa1^{+/+}$ hearts where TAC did not induce significant changes in the contractile indices (except in LV end-systolic volume), in the $Opa1^{+/-}$ group, TAC led to significant ventricular dilation, as shown by the increase in LV end-diastolic volume and ventricular dysfunction, evidenced by a decrease in end-systolic volume, and a 43% reduction in left ventricle FS (*Figure 6C–E*). The cardiac output index was also calculated, but no significant difference between groups was observed ($Opa1^{+/+}$-sham: 2.18 ± 0.23; $Opa1^{+/+}$-TAC: 2.12 ± 0.18; $Opa1^{+/-}$-sham: 1.99 ± 0.13; $Opa1^{+/-}$-TAC: 1.87 ± 0.17 mL/min/g). Indices of heart failure, such as pulmonary oedema, tended to appear in $Opa1^{+/-}$ mice (*Figure 6B*). As expected, markers of mitochondrial content or biogenesis (Supplementary material online, *Table S2*) were down-regulated, and markers of stress or fibrosis (Supplementary material online, *Figure S6*) were up-regulated by TAC, but no marked difference was observed between $Opa1^{+/-}$ and $Opa1^{+/+}$ mice. Taken together, this suggests that the heart of $Opa1^{+/-}$ mice have an increased sensitivity to mechanical stress.

4. Discussion

The role of OPA1 in the heart has been poorly explored, despite the high expression level of OPA1 and other dynamin-related proteins (DRPs) in this organ.[15–17,26–29] Adult cardiomyocytes are highly oxidative cells and possess a large amount of mitochondria. However, a fast dynamic of these organelles was not clearly demonstrated.[27] Obviously, this does not mean that DRPs are silent in the adult heart and/or have no important physiological roles in this organ. We thus investigated the consequences of the decreased OPA1 expression on the intracellular energetic pathways and mouse heart function. The present results show that, (i) OPA1 depletion induced mitochondrial network remodelling, while (ii) oxidative capacity and respiratory chain function were not altered, but (iii) direct channelling of ATP and ADP between mitochondria and myosin ATPases was reduced in mutant mice, and (iv) mitochondria of $Opa1^{+/-}$ mice accumulated more calcium and presented a delay in calcium-induced PTP opening, and finally (v) despite a normal cardiac function at basal state, the mutant mice were more sensitive to prolonged haemodynamic stress.

OPA1 down-regulation induced clear changes in mitochondrial morphology and cytoarchitecture. Indeed, in accordance with roles already attributed to OPA1,[30] we observed alterations of the mitochondrial cristae. However, unexpectedly, we observed heterogeneity in the mitochondrial size with the appearance of larger mitochondria

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

in *Opa1*$^{+/-}$ cardiomyocytes. Although modifications of the mitochondrial network were expected, these results are surprising because several previous studies had shown that the down-regulation of proteins involved in fusion induces fragmentation of the mitochondria.[31–33] However, our results are consistent with a recent study, showing that while Mfn2 KO mice exhibit mitochondrial fragmentation in neonatal cardiomyocytes, the opposite result, i.e. larger mitochondria, was observed in adult myocardium.[29] Thus, our results can be explained by the specific architectural constraints of the adult cardiomyocyte that limit mitochondrial movements in contrast to neonatal cardiac cells. Indeed, the adult cardiac cell is a paradigm of highly compartmentalized cells possessing a sophisticated subcellular architecture in which repeated arrays of sarcomeres, T-tubules, SR, and mitochondria interact. Therefore, it appears that a deficit in fusion protein may result in incomplete fusion in a complex cell type such as the adult cardiomyocyte, and in fragmentation in a simpler cell model. It can be proposed that, in a constrained environment, a deficit in OPA1, by impairing fusion of inner mitochondrial membranes, would compromise further fission mechanisms.

A primary consequence of mitochondrial morphology alterations was a decrease in the K_m for ADP in *Opa1*$^{+/-}$ mice, which could result from disturbances in the cell architecture,[34] leading to weaker interactions between mitochondria and the surrounding organelles, such that mitochondria are more open to the cytosol.[10] A second consequence is an impairment of energy transfer between mitochondria and myofilaments.[9,11] Indeed, our results show, for the first time, that a mere perturbation of the mitochondrial morphology may impair adenine nucleotide compartmentation, thereby confirming a link between cellular architecture and energy fluxes.[10,11] In the heart, the local energy-providing systems (DANC and CK) are redundant and therefore alterations in DANC have no major impact on basal cardiac function.[9] However, under conditions of chronic stress, deficient energy transfer may have a deleterious impact on cardiac function.[10,23]

In the heart of *Opa1*$^{+/-}$ mice, mitochondrial oxidative capacities and respiratory chain complexes were not changed. Similarly, in leucocytes from ADOA patients, which exhibit only a partial loss of OPA1 expression, no alteration in mitochondrial oxidative capacity was observed.[35] However, almost complete loss of OPA1 resulted in severely altered mitochondrial respiration.[36] The only change in metabolic phenotype found in the present study was an alteration of free fatty acid utilization by mitochondria. The mechanism responsible for this alteration is not clear. β-Oxidation does not seem to be involved because MCAD or LCAD RNAs were not modified. One can hypothesize that lack of OPA1 could disturb the organization of mitochondrial inner membranes and thus affect the transport of free fatty acids in the matrix. Alternatively, mitochondrial Ca^{2+} flux modifications, due to altered PTP properties (see below), can also affect metabolic substrate utilization.[37]

The most unexpected effect of OPA1 deficiency is related to PTP function and the mitochondrial CRC. Using Rhod-2 and calcein, we observed higher CRC and a delayed PTP opening under calcium stimulation. Interestingly, *Mfn2* KO mice presented the same characteristics[29] suggesting a link between PTP function and DRPs. Various hypotheses can be proposed to explain how OPA1 can influence PTP function and enhance the capacity for Ca^{2+} retention. Firstly, because mitochondria from *Opa1*$^{+/-}$ mice are larger, they could, in principle, load more calcium,[28,38,39] but recent results suggest that a direct relationship between mitochondrial volume and the Ca^{2+} uptake capacity is unlikely.[29] Secondly, because OPA1 is located in the inner mitochondrial membrane and participates in the organization of mitochondrial cristae,[30] loss of this protein could disorganize the environment of the inter-membrane space and disturb the downstream signalling events.[3,40] In this regard, the PTP, which needs the proximity of the mitochondrial internal and external membranes to form, could be sensitive to OPA1 deletion and cristae disorganization. Finally, one cannot exclude that, due to its location, OPA1 could be a structural part of the supramolecular complex that forms the PTP.

A higher CRC and delayed PTP opening have been described as a cardioprotective mechanism against ischaemia/reperfusion injury.[28,29] However, we hypothesize that, in our model, these mitochondrial characteristics can be detrimental to the heart. Indeed, the TAC-induced haemodynamic stress resulted in greater cardiac hypertrophy and chamber dilation, and lower FS in *Opa1*$^{+/-}$ mice. In both strains at this stage; however, the cardiac output index was still maintained due to the chamber enlargement. One possible explanation for the increased remodelling in *Opa1*$^{+/-}$ mice is the lower sensitivity of PTP to calcium accumulation in the mitochondrial matrix, which could induce mitochondrial calcium overload. Indeed, it has suggested that higher intra-mitochondrial calcium content would reduce the metabolic reserve capacity of the heart.[37] Another possibility could be the partial loss of DANC efficacy found in our study. Finally, it is reasonable to suggest that the impairment of the mitochondrial dynamics does not allow an appropriate and homogeneous adaptation of the mitochondrial network to the increase in the energetic demand of stress, thereby exacerbating cardiac remodelling.

OPA1 has been proposed to be involved in the organization of cristae, and its deletion could modify the propensity of mitochondria to release cytochrome *c*. However, the correlation between the PTP, the morphology of cristae and the release of cytochrome *c*, is not straightforward.[41] Further experiments are needed to address this important issue.

In conclusion, we have established that the decreased expression of the OPA1 protein in a mouse model mimicking human ADOA disease has consequences for the morphology of mitochondria and for energetic transfers between organelles, as well as for mitochondrial CRC and PTP properties. These alterations could explain the sensitization of the heart to haemodynamic stress and show that OPA1 plays an important role in cardiac physiology.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank Dr R. Fischmeister for continuous support. We thank Eric Jacquet and Romain Barbet for TDLA analysis (IMAGIF qPCR-Platform, UPR-2301 CNRS Gif/Yvette). We also thank Valérie Domergue-Dupont and the animal core facility of IFR141 for efficient handling and preparation of the animals. We are grateful to Bernd Wissinger (Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Germany) for sharing the *Opa1*$^{+/-}$ mouse line.

Conflict of interest: none declared.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

Funding

This work was partly supported by a grant VEGA 2/0116/12. This work was supported by grants from the European Union contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart and a grant from University of Paris Sud (Attractivité). R.V.-C., C.B., and F.J. are scientists at Centre National de la Recherche Scientifique.

References

1. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;**89**:799–845.
2. Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002;**13**:4343–4354.
3. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N *et al*. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 2002;**523**:171–176.
4. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A *et al*. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;**26**:211–215.
5. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P *et al*. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;**26**:207–210.
6. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL *et al*. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004;**36**:449–451.
7. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet* 1998;**35**:793–800.
8. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L *et al*. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001;**109**:584–591.
9. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001;**89**:153–159.
10. Wilding JR, Joubert F, de Araujo C, Fortin D, Novotova M, Veksler V *et al*. Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* 2006;**575**:191–200.
11. Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V *et al*. Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* 2010;**588**:2443–2454.
12. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 2004;**555**:1–13.
13. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1813**:1360–1372.
14. Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2010;**88**:16–29.
15. Shahrestani P, Leung HT, Le PK, Pak WL, Tse S, Ocorr K *et al*. Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* 2009;**4**:e6867.
16. Dorn GW II, Clark CF, Eschenbacher WH, Kang MY, Engelhard JT, Warner SJ *et al*. MARF and Opa1 control mitochondrial and cardiac function in *Drosophila*. *Circ Res* 2011;**108**:12–17.
17. Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 2009;**84**:91–99.
18. Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF *et al*. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 2007;**130**:1029–1042.
19. Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF *et al*. Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* 2009;**220**:404–409.
20. Heiduschka P, Schnichels S, Fuhrmann N, Hofmeister S, Schraermeyer U, Wissinger B *et al*. Electrophysiological and histologic assessment of retinal ganglion cell fate in a mouse model for OPA1-associated autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;**51**:1424–1431.
21. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;**127**:65–74.
22. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;**3**:965–976.
23. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R *et al*. Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 2008;**586**:5181–5192.
24. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 1977;**252**:8731–8739.
25. Belzacq-Casagrande AS, Martel C, Pertuiset C, Borgne-Sanchez A, Jacotot E, Brenner C. Pharmacological screening and enzymatic assays for apoptosis. *Front Biosci* 2009;**14**:3550–3562.
26. Fang L, Moore XL, Gao XM, Dart AM, Lim YL, Du XJ. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci* 2007;**80**:2154–2160.
27. Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y *et al*. Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating Hl-1 cells. *J Bioenerg Biomembr* 2009;**41**:195–214.
28. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010;**121**:2012–2022.
29. Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM *et al*. Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 2011;**31**:1309–1328.
30. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T *et al*. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006;**126**:177–189.
31. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;**160**:189–200.
32. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:15927–15932.
33. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P *et al*. Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;**278**:7743–7746.
34. Saks V, Kuznetsov A, Andrienko T, Usson Y, Appaix F, Guerrero K *et al*. Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophys J* 2003;**84**:3436–3456.
35. Mayorov VI, Lowrey AJ, Biousse V, Newman NJ, Cline SD, Brown MD. Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* 2008;**9**:22.
36. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005;**280**:26185–26192.
37. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthievel B, Goonasekera SA *et al*. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* 2010;**120**:3680–3687.
38. Nogueira V, Devin A, Walter L, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E. Effects of decreasing mitochondrial volume on the regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 2005;**37**:25–33.
39. Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, Suga K *et al*. Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model. *Neurosci Lett* 2008;**448**:268–272.
40. Wasilewski M, Scorrano L. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol Metab* 2009;**20**:287–294.
41. Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH *et al*. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:1057–1065.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at INSERM on August 20, 2012

CVR-2011-1187R1

Supplement Material

Downregulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload

Running title: OPA1 deficit and cardiac mitochondria

Jérôme Piquereau, Fanny Caffin, Marta Novotova, Alexandre Prola, Anne Garnier, Philippe Mateo, Dominique Fortin, Le Ha Huynh, Valérie Nicolas, Marcel Alavi, Catherine Brenner, Renée Ventura-Clapier, Vladimir Veksler and Frédéric Joubert

INSERM, U-769, F-92296 Châtenay-Malabry, France; Univ Paris-Sud, IFR141, F-92296 Châtenay-Malabry, France;

Address for correspondence: Dr Frédéric Joubert
U-769 INSERM
Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud
5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry
France

Tel.: (33-1) 46.83.52.48.
Fax: (33-1) 46.83.54.75.
E-mail: frederic.joubert@u-psud.fr

Supplementary Methods

Animals

The *Opa1*$^{+/-}$ mouse as a model for ADOA has been extensively studied in details elsewhere.[1-3] Briefly, it carries heterozygously a splice site mutation (c.1065+5 G→A) in the murine *Opa1* gene. This mutation is non-permissive; it leads to 100% skipping of the exon 10, which codes for 27 amino acids in frame. This results in a shortened Opa1 protein (p.329-355del) lacking 27 amino acids in the GTPase domain of the protein.[1,2]

Experiments that aimed to determine the basal cardiac phenotype were performed using five- to six-month-old male mice (*Opa1*$^{+/+}$, n=8; *Opa1*$^{+/-}$, n=8).

Experiments using ten-week-old mice that had undergone surgery were carried out to estimate the ability of mutated mouse hearts to adapt to pathological stress (pressure overload). For TAC experiments, younger adult mice were used because the surgery had to be performed very early to avoid a high mortality rate. On these younger mice we observed no difference in most of the parameters (respiration, interaction between organelles, metabolic enzyme activities…) with older mice. We also observed no difference in cardiac function by echocardiography between 2-, 6- and 12 month-old mice.

Surgery procedures: After the induction of anesthesia, aortic stenosis was induced in four-week-old mice by placing a silk suture around the aorta after thoracic incision (TAC, Transversal Aortic Constriction, group) (*Opa1*$^{+/+}$, n=14; *Opa1*$^{+/-}$, n=14). Depth of anesthesia was checked by toe pinch before the start of surgery. Age-matched controls underwent the same procedure without placement of suture (sham group) (*Opa1*$^{+/+}$, n=14; *Opa1*$^{+/-}$, n=14). Mice were studied six weeks after surgery. This procedure was carried out in accordance with the recommendations of the institutional animal care and use committee of INSERM.

Animals were studied six weeks after surgery. At the time of sacrifice, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (200mg.kg^{-1}). After thoracotomy, the hearts were excised and rinsed in ice-cold calcium-free Krebs solution equilibrated with 95% O_2 – 5% CO_2. The hearts were weighed, and a portion of each left ventricle was rapidly frozen in liquid nitrogen for further biochemical measurements, and another part was immediately used to prepare cardiac muscle fibers for mechanical and respiration experiments. Additionally, lungs were weighed, and the right tibia length was measured.

Biochemical analysis

Frozen tissues were homogenized with Precellys 24 Bertin technologies in a buffer (50mg.ml^{-1}) containing (in mM) HEPES 5, EGTA 1, DTT 1 and 0.1% Triton X-100 and were incubated for 1 hour at 0°C for complete enzyme extraction. Activities of total creatine kinase (CK), citrate synthase and mitochondrial complex I were measured using standard spectrophotometric assays.[4] Aconitase and fumarase activity measurement were adapted from[5-7]. Aconitase to fumarase ratio was used as a marker of mitochondrial oxidative stress.

Western Blot

Protein extracts from hearts of five-month-old *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice were separated on 8% SDS-polyacrylamide gels and subsequently transferred to nitrocellulose membranes. After one hour of blocking with milk, the membranes were incubated overnight with primary antibody (OPA1: BD Biosciences 612606). After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody for one hour and visualized using a chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura kit, Thermo Scientific). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (Bio-Rad). The antibodies used were highly specific because characteristic bands of the appropriate size (between 85 and 100 kDa) were obtained each time.

Same procedure was used for the detection of other protein, Mfn1 and Mfn2 (monoclonal Abnova), Drp1 and hsp60 (Becton Dickinson), citrate synthase (Abcam) and Lc3 A/B (polyclonal Abcam). Oxyblot Protein oxidation Detection Kit was obtained from Millipore. Citrate synthase content was not significantly different and content of mitochondrial proteins was normalized to citrate synthase as a marker of mitochondrial content.

Cardiomyocyte isolation

Retrograde cardiac perfusion was performed according to the Langendorff method using solution containing (in mM): NaCl 113, taurine 30, glucose 20, HEPES 10, 2,3-butanedione monoxime 10, KCl 4.7, $NaHCO_3$ 1.6, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 0.6 and NaH_2PO_4 0.6 (pH: 7.4, temperature: 37°C). The addition of liberase ($0.042 mg.ml^{-1}$) to this solution for 8 minutes caused extracellular matrix digestion. The left ventricle of the heart was cut, and the cells were released from the tissue by mechanical agitation using a Pasteur pipette in the perfusion solution. After filtration, the calcium concentration of the solution containing the cells was progressively increased to reach 1 mM. Finally, the cells were plated onto dishes coated with laminin and were kept at room temperature for 2 hours.

Mitochondria isolation procedure

Mitochondria were isolated from the heart of male *Opa1*$^{+/+}$ or *Opa1*$^{+/-}$ mice in an iso-osmotic buffer (0.3 M sucrose, 5 mM TES, 0.2 mM EGTA, 1 % BSA, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, pH 7.2) by differential centrifugation according to[8]. Protein concentration was determined using the micro-BCA assay (Pierce, Illinois).

Morphological description of cardiomyocyte mitochondrial network by confocal fluorescence microscopy.

Fluorescence experiments were performed with a Carl Zeiss LSM-510 confocal microscope using a 63X 1.4 plan Apochromat objective lens. Mito-Tracker Orange was excited with the 568-nm line of an argon/krypton laser, and images were collected through a 570 nm long-pass emission filter. Calcein fluorescence was excited simultaneously with the 488 nm line of the same laser, and images were collected through a 515- to 530 nm band pass filter.

To reconstruct 3D images of the cells, serial images of individual cardiomyocytes were collected in the z-axis. Data were imported and images were deconvoluted using Autoquant X software (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Volumes of cardiomyocytes and individual mitochondrion were obtained with IMARIS software (Bitplane Company, Zurich, Switzerland), using Imaris MeasurementPro module. Fluorescence emitted from mitochondria was analyzed by the software which allows, by surface segmentation methods, to identify individual objects corresponding to individual mitochondrion. Characteristics of individual objects were obtained (surface, volume, etc…). By this approach, it is possible to extract the distribution and average volume of individual mitochondrion, as well as global mitochondrial network and cell volumes.

Electron microscopy

Samples of left ventricular papillary muscles from five-month-old mice (n = 4 for each genotype) were prepared for electron microscopy as previously described.[9] Ultrathin longitudinal sections were dyed with lead citrate and studied using a JEM 1200 (JOEL, Japan) electron microscope. Images were recorded using a Gatan Dual Vision 300W CCD camera (Gatan Inc., Pleasanton, USA). As mitochondrial network is highly anisotropic, it is necessary to have strictly transversal or longitudinal sections of cardiomyocytes to obtain really reliable and good quality read-out and quantification of mitochondrial volume and network morphology. The papillary muscle was chosen because in contrary to ventricular walls, it allows to cut reliable transverse and longitudinal sections and thus to be comparable between control and pathological or genetically-modified animals.

EM quantification of individual mitochondrial surface in *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ cardiac tissue was estimated using Image J software on 15 slices (randomly chosen, magnification 15000) from each of 4 different hearts in each group. Mean value of individual mitochondrial surface was obtained on the whole population of mitochondrial (for each group), and the distribution of these mitochondrial surface calculated for each animals in both groups.

Analysis of in situ mitochondrial function

Mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin-skinned fibers, as previously described.[10,11] Briefly, fibers were separated from the endocardial surface of the left ventricle[12,13] under a binocular microscope in *skinning* (S) solution (see below) at 4°C and permeabilized in the same solution with 50 µg/ml of saponin for 30 min. After being placed in *respiration* (R) solution (see

below) for 10 min to wash out adenine nucleotides and phosphocreatine, permeabilized separated fibers were transferred into a 3-ml water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK) equipped with a Clark electrode, as previously described,[14] under continuous stirring. Solutions R and S contained (in mM): 2.77 CaK_2EGTA, 7.23 K_2EGTA (100 nM free Ca^{2+}), 1 free Mg^{2+}, 20 taurine, 0.5 DTT, and imidazole (pH 7.1). Solution S also contained (in mM) 50 potassium methanesulfonate, (160 mM ionic strength), 5.7 Na_2ATP, 15 phosphocreatine, while solution R contained 10 glutamate, 4 malate, 3 phosphate, 90 potassium methanesulfonate, 10 sodium methanesulfonate (ionic strength 160 mM) and 2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin. Experiments were performed at 22°C.

Different experimental protocols were used based on substrate utilization pathways. One protocol determined mitochondrial respiration using fatty acids in the presence of 2 mM ADP , 4 mM malate and 0.1 mM octanoyl carnitine. Another protocol was intended to determine the dependency of respiration on external [ADP] in the presence or absence of 20 mM creatine with glutamate plus malate as substrates. Fibers were exposed to increasing [ADP], and the ADP-stimulated respiration above basal oxygen consumption (Vo) was plotted to determine the apparent Km for ADP and maximal mitochondrial respiration (Vmax on complex I). The acceptor control ratio (ACR), an index of oxidation phosphorylation coupling, was calculated as V_{max}/V_0. Succinate (20 mM[1]) was then added to measure respiration involving complex I and II and finally amobarbital (2 mM) was added to inhibit complex I and to measure respiration on complex II.

Estimation of energy transfer to sarcoplasmic reticulum and myofilaments.

For measurements of SR and myofibrillar function, papillary muscle fibers were dissected and permeabilized for 30 minutes in saponin (50µg/ml), as previously described.[4,12] The contribution of the energetic transfer system, the CK system, and the direct adenine nucleotide channeling (DANC), to the provision of ATP for sarcoplasmic reticulum ATPase (SERCA) function was estimated by measuring SR calcium content in saponin-permeabilized fibers after calcium loading for 5 minutes under various energetic conditions, and subsequent calcium release with 5 mM caffeine. The calcium-time integral (S_{Ca}) was calculated from the tension-time integral and expressed relative to the load with ATP alone as previously described.[9,15] The pMgATP/rigor tension relation was used for studying the ability of the different energetic systems to supply ATP for myosin ATPase as previously described.[16] Data were fitted using the Hill equation, $T=K/(K+[MgATP]^{n_H})$, where T is the relative rigor tension, K is a constant, and n_H is the Hill coefficient. This fitting procedure was used to calculate $pMgATP_{50}$, which is the negative logarithm of [MgATP] at which half-maximum rigor tension is obtained. The solutions used were the same as the solutions used for the estimation of SR calcium uptake with the exception that the ATP concentration was varied in this experiment from pMgATP 2.5 to 6.

PTP experiments

Rhod-2 was excited with the 568-nm line of an argon/krypton laser, and images were collected through a 570 nm long pass emission filter. Calcein fluorescence was excited simultaneously with the 488 nm line of the same laser, and images were collected through a 515-530 nm band pass filter. Cardiomyocytes were permeabilized with saponin (50µg/ml). Rhod-2 and calcein signals were monitored after the addition of Ca^{2+} (2µM). The increase in Rhod-2 was used to determine the amount of calcium loaded in mitochondria. PTP opening was determined by monitoring the decrease in calcein fluorescence intensity. The time when calcein fluorescence began to decrease and the rate of fluorescence to decrease at this point gave indices of mPTP behavior.

For isolated mitochondria, all assays were performed in 96-well plates (200 µl) at 37°C in a spectrofluorimeter (TECAN infinite M200, TECAN, Austria). Mitochondria (25µg of proteins/200µl) were diluted in a hypo-osmotic buffer (10 mM Tris-MOPS, pH 7.4, 5 mM succinate, 200 mM sucrose, 1 mM Pi, 10 µM EGTA, 2 µM freshly-added rotenone). Experiments were started after addition of 25µM calcium, to induce PTP opening. Simultaneously, the mitochondrial swelling was immediately measured by the decrease in optical density at 540 nm and the depolarization of the mitochondria was measured by the rhodamine 123 (1µM) fluorescence dequenching (λex: 485nm, λem: 535nm, Molecular Probes) as explained in[17]. The $t_{1/2}$ were calculated using Hill fitting in Origin software.

Real-time quantitative PCR

Frozen tissue samples were weighed and homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer. Total ventricular RNA was extracted using a standard procedure with Trizol reagent (Invitrogen). cDNAs were synthesized from 2µg total RNA according to the protocol provided with the High

Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, France). Real-time PCR was performed using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology. Pre-designed TaqMan probe and primer sets for target genes were chosen from an on-line catalog (Applied Biosystems, France). TLDAs were designed to amplify 48 cDNAs for each sample, as follows: 43 target genes involved in energy metabolism and mitochondrial function and 5 housekeeping genes (Table 1S). Each PCR reaction was performed with 4ng of cDNA in a volume of 1 µl. The thermal cycling conditions were 2min at 50°C and 10min at 95°C, followed by 40 cycles of 15s at 95°C and 1min at 60°C. Quantification was achieved using the $\Delta\Delta C_t$ method. The average C_t obtained in the LS group was used as a calibrator, and the geometric mean of 14-3-3 protein zeta/delta (Ywhaz) and ribosomal protein P2 (Rplp2) housekeeping genes was used as the reference for normalization. The amplification efficiency of each probe was estimated maximal, as described by the manufacturer.

Quantification of ANF (5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3', 5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'), BNP (5'-CTGGGAAGTCCTAGCCAGTC-3', 5'-TTTTCTCTTATCAGCTCCAGCA-3'), Col1a1 (5'-CTC AAG ATG TGC CAC TCT GAC T-3', 5'-CTC CAT GTT GCA GTA GAC CTT G-3') and Col3a1 (5'-GAT GGA AAC CCT GGA TCA GA -3', 5'-GCA CCA GGA GAA CCA TTT TC-3') mRNA was assessed using the SYBR®Green method on a LightCycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics) as previously described.[18] For each target gene a standard curve was constructed from the analysis of a fivefold cDNA serial dilution and used for samples concentration calculation. Ywhaz (5'-AGA CGG AAG GTG CTG AGA AA-3', 5'-GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA-3') and Rplp2 (5'-GCT GTG GCT GTT TCT GCT TC-3', 5'-ATG TCG TCA TCC GAC TCC TC-3') were used as housekeeping genes as their expression did not differ between groups. Geometric mean of their expression was used for normalization.

Statistical Analysis

Values are expressed as means±sem. The statistical significance of the difference between the *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ groups was estimated by Student's t-test. In the experiments involving *Opa1*$^{+/+}$-Sham, *Opa1*$^{+/+}$-TAC, *Opa1*$^{+/-}$-Sham and *Opa1*$^{+/-}$-TAC, statistical significance was estimated by two-way ANOVA using Newman-Keuls *post-hoc* test. Values of $p<0.05$ were considered significant.

Table 1S: Design of TaqMan Low Density Arrays

Gene	Nom	Official name	Assay iD
PGC-1α	Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	Mm00447180_m1
PGC-1β	Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	Mm01258518_m1
PRC	Pprc1	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator-related 1	Mm00521078_m1
NRF1	Nrf1	nuclear respiratory factor 1	Mm00447996_m1
NRF2	Gabpa	GA repeat binding protein, alpha	Mm00484598_m1
ERRα	Esrra	estrogen related receptor, alpha	Mm00433143_m1
PPARα	Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	Mm00440939_m1
PPARβ/δ	Pparb/d	peroxisome proliferator activator receptor delta	Mm00803184_m1
mtTFA	Tfam	transcription factor A, mitochondrial	Mm00447485_m1
MCIP1-V1	Rcan1	regulator of calcineurin 1 variant 1	Mm00517094_m1
MCIP1-V2	Rcan1	regulator of calcineurin 1 variant 2	Mm00627762_m1
SIRT1	Sirt1	Sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (S. cerevisiae)	Mm01168521_m1
COXIV	Cox4i1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Mm01250094_m1
UCP3	Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	Mm00494077_m1
UCP2	Ucp2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Mm00627599_m1
miCK	Ckmt2	creatine kinase, mitochondrial 2	Mm01285553_m1
CPT1b	Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	Mm00487200_m1
MCAD	Acadm	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Mm00431611_m1
LCAD	Acadl	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	Mm00599660_m1
DRP1	Dnm1l	dynamin 1-like	Mm01342903_m1
FIS1	Fis1	Fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (yeast)	Mm00481580_m1
MFN1	Mfn1	mitofusin 1	Mm00612599_m1
MFN2	Mfn2	mitofusin 2	Mm00500120_m1
OPA1	Opa1	optic atrophy 1 homolog (human)	Mm00453879_m1
BAX	Bax	BCL2-associated X protein	Mm00432050_m1
BCL-2	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Mm00477631_m1
BCL-XL	Bcl2l1	BCL2-like 1	Mm00437783_m1
BID	Bid	BH3 interacting domain death agonist	Mm00626981_m1
BECLIN1	Becn1	Beclin 1, autophagy related	Mm00517174_m1
SOD2	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Mm00449726_m1
GPX1	Gpx1	glutathione peroxidase 1	Mm00656767_g1
AIF	Aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	Mm01321788_m1
ANT1	Slc25a4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4	Mm01207393_m1
ANT2	Slc25a5	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5	Mm00846873_g1
ANT4	Slc25a31	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 31	Mm00617754_m1
PiC	Slc25a3	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 3	Mm00728482_s1
CYPD	Ppif	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	Mm00506384_m1
CYTC	Cycs	cytochrome c, somatic	Mm01621044_g1
FOF1	Atp5b	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	Mm00443967_g1
HSP70	Hspa1a	heat shock protein 1A	Mm01159846_s1
VDAC1	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	Mm00834272_m1
VDAC2	Vdac2	voltage-dependent anion channel 2	Mm00834279_m1
VDAC3	Vdac3	voltage-dependent anion channel 3	Mm00442091_m1
B2m	B2m	beta-2 microglobulin	Mm00437764_m1
Ywhaz	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Mm01158417_g1
Rplp2	Rplp2	ribosomal protein, large P2	Mm00782638_s1
Hprt	Hprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Mm00446968_m1
18S			

Table 2S: Results of TaqMan Low Density Arrays

	WT-SHAM	WT-TAC	KO-SHAM	KO-TAC
PGC-1α	1.06 (0.14)	**0.52 (0.10) ****	1.13 (0.15)	0.75 (0.08)
PGC-1β	1.02 (0.08)	0.74 (0.11)	1.11 (0.06)	0.88 (0.06)
PRC	1.03 (0.09)	1.13 (0.06)	1.12 (0.06)	1.12 (0.06)
NRF1	1.01 (0.05)	0.84 (0.04)	1.01 (0.07)	**0.86 (0.04) ***
NRF2	1.06 (0.14)	**0.70 (0.06) ***	0.94 (0.07)	0.76 (0.04)
ERRα	1.06 (0.14)	0.75 (0.07)	1.12 (0.12)	**0.79 (0.06) ***
PPARα	1.03 (0.10)	**0.69 (0.13) ***	1.20 (0.08)	**0.82 (0.03) ***
PPARβ/δ	1.02 (0.07)	0.84 (0.05)	1.07 (0.08)	0.88 (0.04)
mtTFA	1.01 (0.06)	**0.72 (0.08) ***	1.06 (0.08)	**0.81 (0.04) ***
MCIP1-V1	1.02 (0.07)	0.99 (0.08)	1.17 (0.17)	0.98 (0.06)
MCIP1-V2	1.23 (0.30)	**4.54 (0.90) ****	0.92 (0.14)	**4.90 (0.91) ****
SIRT1	1.02 (0.07)	0.86 (0.04)	1.03 (0.06)	0.94 (0.04)
COXIV	1.02 (0.09)	**0.69 (0.08) ***	0.88 (0.06)	0.74 (0.06)
UCP3	1.22 (0.38)	0.52 (0.09)	0.98 (0.15)	0.74 (0.06)
UCP2	1.04 (0.13)	1.22 (0.10)	1.25 (0.13)	1.14 (0.07)
miCK	1.01 (0.04)	0.77 (0.13)	1.01 (0.04)	0.91 (0.05)
CPT1b	1.01 (0.05)	0.77 (0.12)	1.01 (0.07)	0.85 (0.03)
MCAD	1.03 (0.09)	**0.56 (0.08) *****	0.88 (0.05)	**0.66 (0.04) ***
LCAD	1.07 (0.15)	0.75 (0.12)	1.03 (0.10)	0.86 (0.05)
DRP1	1.01 (0.06)	**0.75 (0.05) ****	0.93 (0.06)	0.81 (0.03)
FIS1	1.01 (0.05)	0.82 (0.06)	0.86 (0.06)	0.84 (0.04)
MFN1	1.02 (0.07)	**0.65 (0.08) ****	0.99 (0.06)	**0.81 (0.03) ***
MFN2	1.03 (0.10)	0.83 (0.11)	1.00 (0.06)	0.81 (0.04)
OPA1	0.94 (0.10)	**0.61 (0.07) ****	0.79 (0.05)	0.66 (0.04)
BAX	0.91 (0.03)	1.04 (0.09)	0.95 (0.07)	0.94 (0.04)
BCL-2	0.94 (0.11)	0.71 (0.05)	1.23 (0.20)	0.89 (0.10)
BCL-XL	1.01 (0.19)	1.30 (0.14)	0.95 (0.08)	**1.67 (0.17) ***
BID	1.02 (0.07)	**1.87 (0.27) ****	1.13 (0.09)	**1.22 (0.10) ##**
BECLIN1	1.01 (0.05)	1.15 (0.07)	1.09 (0.07)	1.12 (0.05)
SOD2	1.01 (0.05)	**0.65 (0.11) ****	1.03 (0.05)	**0.70 (0.05) ****
GPX1	0.93 (0.08)	**1.49 (0.26) ***	0.91 (0.07)	1.10 (0.08)
AIF	1.00 (0.04)	**0.68 (0.08) *****	0.93 (0.05)	**0.75 (0.03) ***
ANT1	1.01 (0.05)	**0.66 (0.10) ****	0.97 (0.04)	**0.76 (0.05) ***
ANT2	1.03 (0.09)	0.92 (0.09)	1.12 (0.05)	1.01 (0.10)
ANT4	1.01 (0.06)	**0.60 (0.08) *****	0.94 (0.02)	**0.72 (0.06) ***
PiC	1.05 (0.12)	**0.54 (0.11) ***	0.70 (0.10)	0.73 (0.16)
CYPD	1.01 (0.05)	0.82 (0.12)	1.04 (0.05)	0.93 (0.07)
CYTC	1.09 (0.16)	0.80 (0.13)	1.04 (0.08)	0.76 (0.07)
FOF1	1.02 (0.07)	0.74 (0.10) *	1.06 (0.05)	0.84 (0.03)
HSP70	1.82 (0.77)	2.80 (0.95)	1.52 (0.62)	1.84 (0.47)
VDAC1	1.02 (0.08)	**0.68 (0.07) ****	0.96 (0.04)	**0.74 (0.47) ***
VDAC2	1.02 (0.07)	0.82 (0.04)	1.03 (0.07)	0.90 (0.05)
VDAC3	1.01 (0.06)	**0.77 (0.08) ***	1.00 (0.06)	0.89 (0.03)

Among the 48 were genes coding for known factors involved in mitochondrial biogenesis (e.g. Pgc-1α and β, Nrf, Tfam, Errα, Ppar γ), energy metabolism (e.g. CoxIV, Ucp2 and 3), β-oxidation (Cpt1, Mcad, Lcad), mitochondrial fission/fusion (e.g. Drp1, Fis1, Mfn1 and 2), apoptosis (e.g. Bax, Bcl2, Bid, Sod2, Cytc, Vdacs), as well as components of the PTP (Slc25a4, 5 and 31), we found no significant difference between *Opa1*$^{+/-}$ and *Opa1*$^{+/+}$ mice in the sham group, in line with the normal cardiac function in both groups (Table S2). TAC, however, lead to significant changes for Ppar γ, Tfam, Mcad, Mfn1, Sod2, Aif, Ant1 and 4, and Vdac1, which were all down-regulated in both groups. Only one variant of the calcineurin interacting protein MCIP1-2 was up-regulated highly significant by TAC in both groups (Table S2). Of note, the pro-apoptotic Bid was significantly up-regulated only in *Opa1*$^{+/+}$ mice after TAC, while the anti-apoptotic Bcl-XL was up-regulated only in *Opa1*$^{+/-}$ mice after TAC (Table S2). Glutathione peroxidase (Gpx1) involved in the detoxification of hydrogen peroxide was up-regulated in *Opa1*$^{+/+}$ mice only after TAC. TAC led also to a significant down regulation of SOD2 in both *Opa1*$^{+/-}$ and *Opa1*$^{+/+}$ mice (Table S2).

Legends of Supplemental figures

Figure 1S: Quantification of individual mitochondrial surface in *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice by analysis of EM cardiac tissue images. (A) Average of individual mitochondrial surface estimated on 15 slices from each 4 different hearts in each mouse group. (B) Distribution of individual mitochondrial surface. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$ versus *Opa1*$^{+/+}$.

Figure 2S: Real-time RT-PCR analysis of mRNA content of *Drp1*, *Fis1*, *Mfn1* and *Mfn2* of *Opa1*$^{+/-}$ mice, relative to control.

Figure 3S: Status of oxidative stress in *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. (A) Oxyblot showing carbonylation of proteins. (B) Quantification of Oxyblot. (C) Measurement of the ratio between aconitase and fumarase activities. (D) Quantification of Hsp60 level by Western Blot (normalized to citrate synthase level).

Figure 4S: Western Blot analysis of LC3 expression. LC3 ratio between the high and low band was used as an index of autophagy.

Figure 5S: Transversal EM images of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ cardiac tissue showing the interaction between SR and mitochondria.

Figure 6S: Markers of pathological stress and fibrosis in Sham and TAC animals. ANP, BNP, Collagen 1 and 3 expression were estimated by RT-PCr.

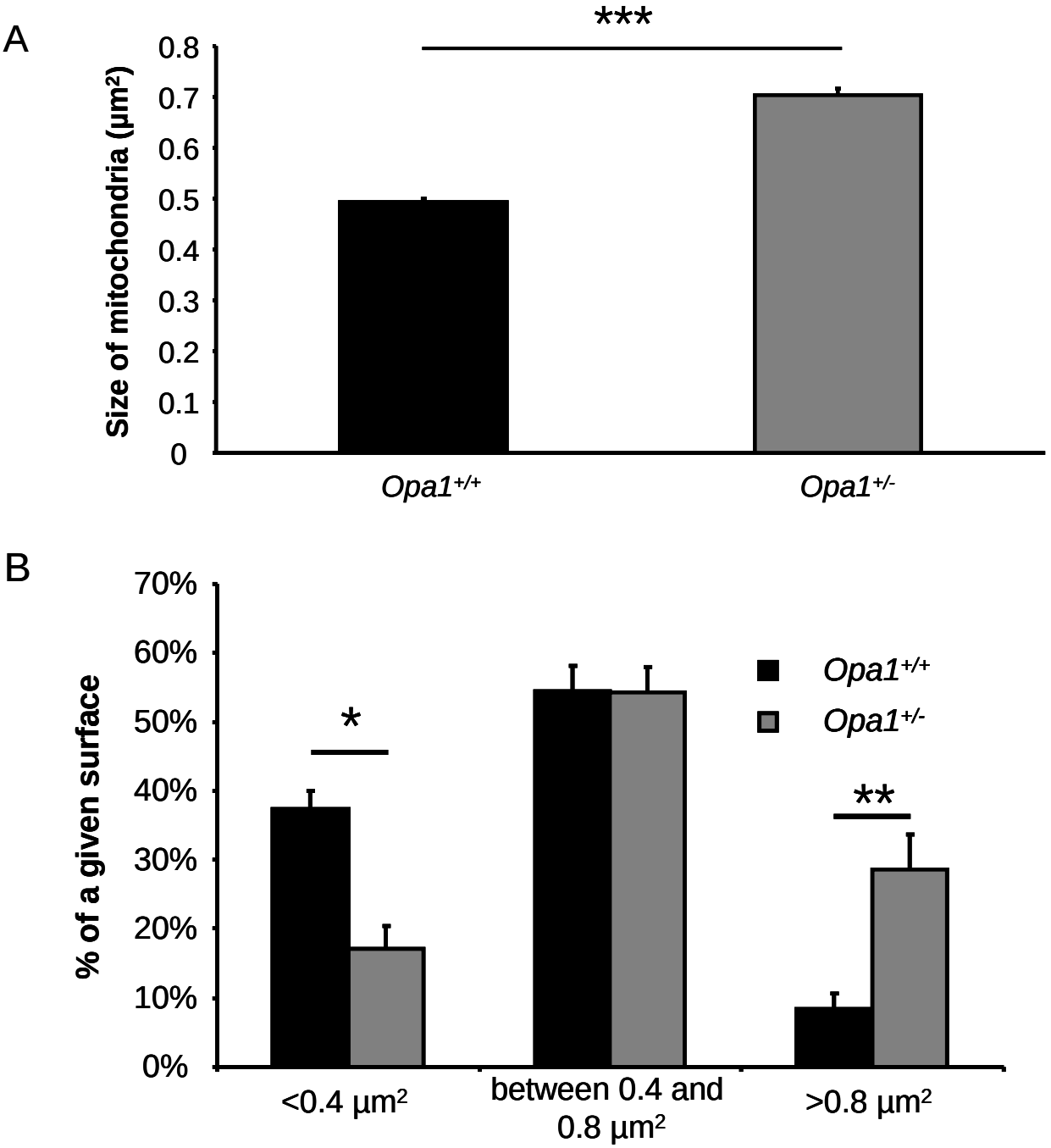

A
***
Size of mitochondria (µm²)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Opa1+/+
Opa1+/-
B
% of a given surface
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
*
**
Opa1+/+
Opa1+/-
<0.4 µm²
between 0.4 and 0.8 µm²
>0.8 µm²

Figure 1S

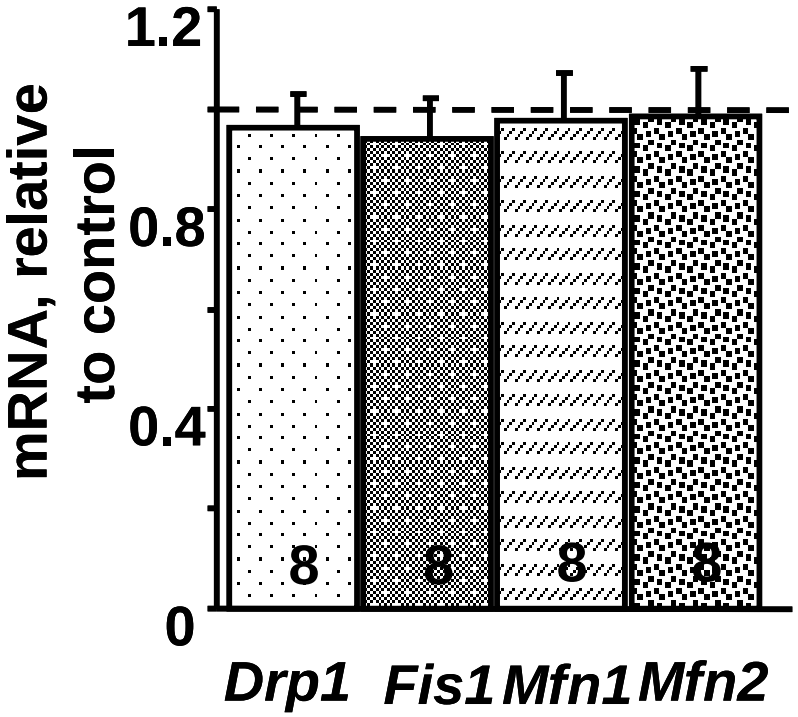


Figure 2S

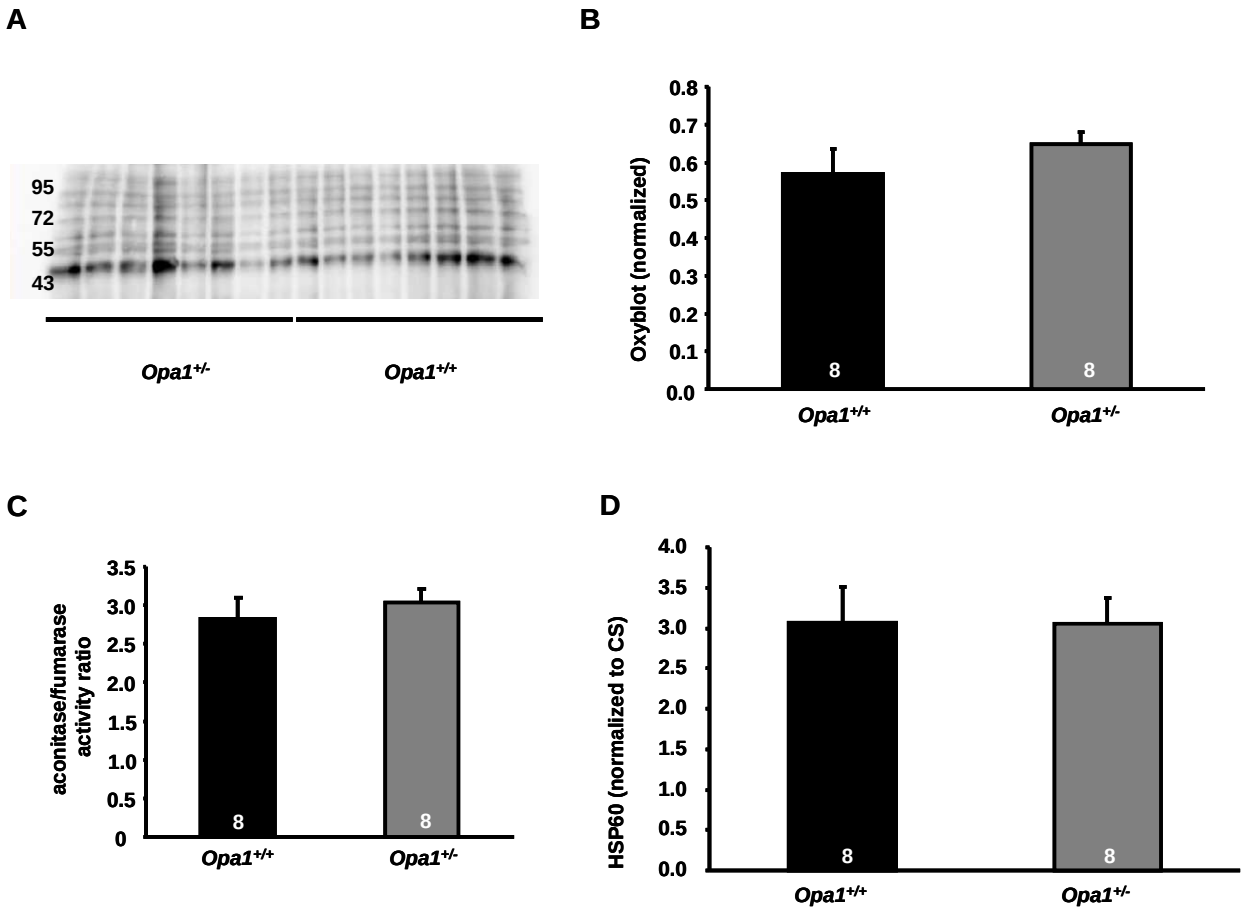

A
95
72
55
43
Opa1+/-
Opa1+/+
B
Oxyblot (normalized)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
8
8
Opa1+/+
Opa1+/-
C
aconitase/fumarase activity ratio
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
8
8
Opa1+/+
Opa1+/-
D
HSP60 (normalized to CS)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
8
8
Opa1+/+
Opa1+/-

Figure 3S

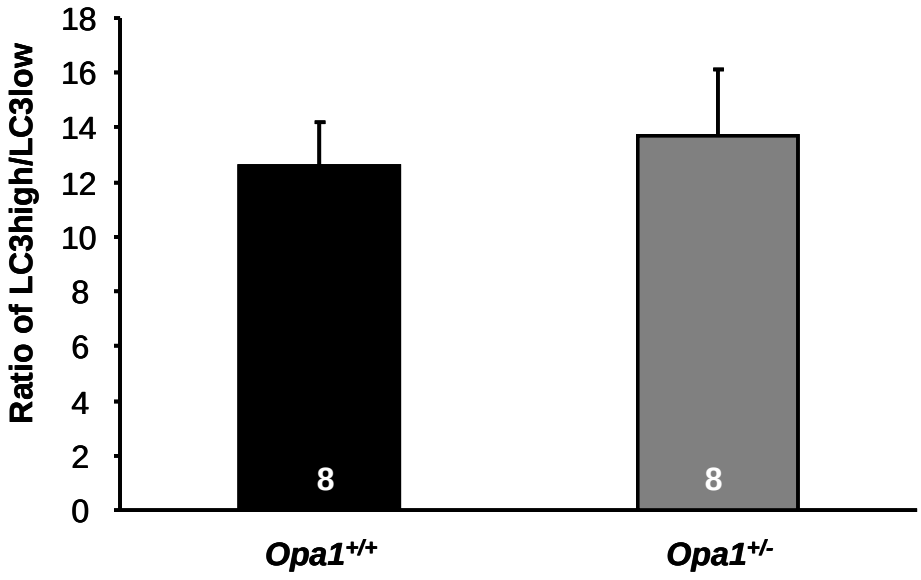


Figure 4S

Opa1$^{+/+}$ *Opa1*$^{+/-}$

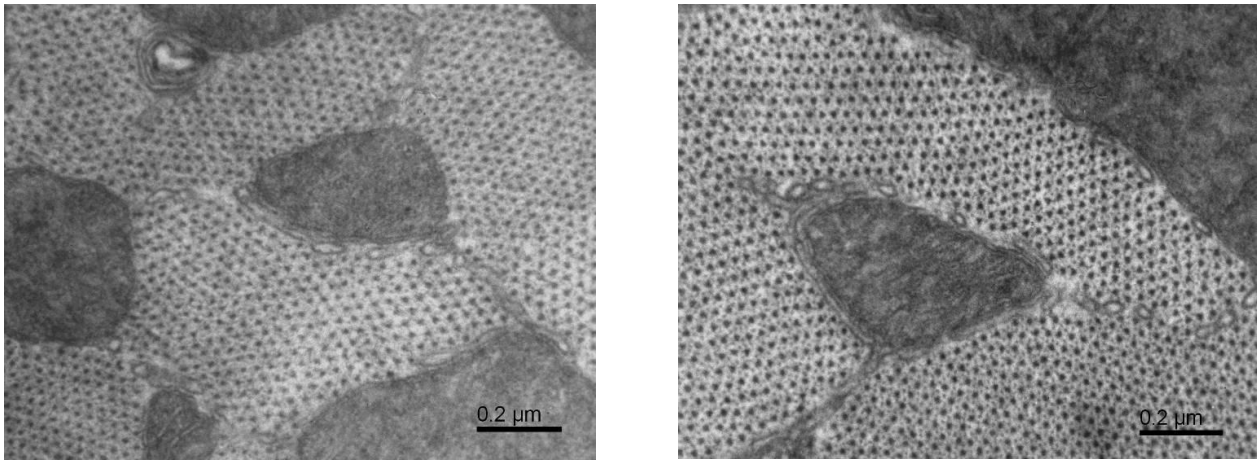


Figure 5S

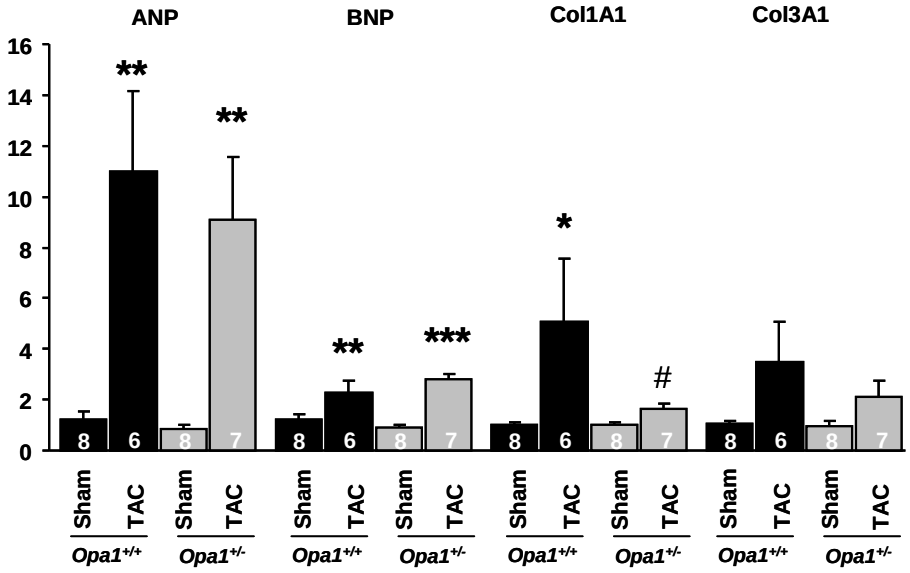

ANP
BNP
Col1A1
Col3A1
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
**
***
*
#
8
6
8
7
Sham
TAC
Opa1+/+
Opa1+/-

Figure 6S

References

[1] Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF *et al.* A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 2007;**130**:1029-1042.

[2] Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF *et al.* Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* 2009; **220**:404-409.

[3] Heiduschka P, Schnichels S, Fuhrmann N, Hofmeister S, Schraermeyer U, Wissinger B *et al.* Electrophysiological and histologic assessment of retinal ganglion cell fate in a mouse model for OPA1-associated autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;**51**:1424-1431.

[4] Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V *et al.* Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* 2010;**588**:2443-2454.

[5] Fansler B, Lowenstein JM. Aconitase from pig heart. *Methods Enzymol* 1969;**13**:26-31.

[6] Hall RE, Henriksson KG, Lewis SF, Haller RG, Kennaway NG. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* 1993; **92**:2660-2666.

[7] Bradshaw RA, Robinson GW, Hass GM, Hill RL. The reaction of fumarase with iodoacetate and 4-bromocrotonate. *J Biol Chem* 1969; **244**:1755-1763.

[8] Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 1977;**252**:8731-8739.

[9] Wilding JR , Joubert F, de Araujo C, Fortin D, Novotova M, Veksler V *et al.* Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* 2006;**575**:191-200.

[10] Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987; **892**:191-196.

[11] Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;**3**:965-976.

[12] Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001;**89**:153-159.

[13] Boustany NN, Drezek R, Thakor NV. Calcium-induced alterations in mitochondrial morphology quantified in situ with optical scatter imaging. *Biophys J* 2002;**83**:1691-1700.

[14] Athea Y, Garnier A, Fortin D, Bahi L, Veksler V, Ventura-Clapier R. Mitochondrial and energetic cardiac phenotype in hypothyroid rat. Relevance to heart failure. *Pflugers*

Arch 2007;**455**:431-442.

[15] Minajeva A, Ventura-Clapier R, Veksler V. Ca2+ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* 1996;**432**:904-912.

[16] Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R *et al.* Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 2008;**586**:5181-5192.

[17] Belzacq-Casagrande AS, Martel C, Pertuiset C, Borgne-Sanchez A, Jacotot E, Brenner C. Pharmacological screening and enzymatic assays for apoptosis. *Front Biosci* 2009;**14**:3550-3562.

[18] Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V *et al.* Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:952-959.

Chapitre II : ROLE D'OPA1 DANS LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE ET DANS LES CAPACITES D'ADAPTATION A UN ENTRAINEMENT PHYSIQUE

Ce chapitre fait l'objet d'un article qui sera soumis très bientôt en premier auteur, sous le titre «**Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice**»

1. *Présentation*

Lors de notre première étude, nous avons observé que des animaux déficients pour la protéine de fusion OPA1 présentaient un défaut d'adaptation cardiaque suite à un stress chronique pathologique, et que les mitochondries étaient moins nombreuses et plus altérées dans cet organe. Sachant que la dynamique mitochondriale ne contrôle pas que la morphologie mitochondriale, mais également la biogénèse des mitochondries (Chan, 2006), nous avons donc fait l'hypothèse, pour cette seconde étude, que le défaut d'adaptation cardiaque observé lors de notre première étude pouvait être dû à un défaut de synthèse de nouvelles mitochondries, ce qui impliquerait donc une altération du processus de biogenèse mitochondriale.

Afin de comprendre les liens reliant la dynamique mitochondriale à la biogenèse mitochondriale, nous avons voulu vérifier dans un premier temps si cette hypertrophie cardiaque était également obtenue lors d'un stress chronique physiologique, l'entraînement physique. Puis, nous avons étudié plus précisément les mécanismes d'adaptation mis en jeu lors de cette stimulation de la biogénèse mitochondriale au niveau des différents muscles.

L'entraînement physique provoque un remodelage du réseau mitochondrial, qui joue un rôle dans la plasticité des muscles. La structure du muscle cardiaque étant très rigide, il dispose d'une très faible capacité d'adaptation à un stimulus, contrairement aux muscles squelettiques qui disposent d'une architecture beaucoup plus flexible. Pour cette raison, dans un second temps, nous avons orienté notre étude sur les muscles squelettiques, pour comprendre les mécanismes en jeu.

Des études précédentes ont montré que l'équilibre de la balance fusion-fission était également important pour le contrôle du métabolisme énergétique et le choix

des substrats lors d'un exercice physique (Bo *et al.*, 2010; Quiros *et al.*, 2012). Comme nous l'avons également montré lors de notre première étude, la désorganisation du réseau mitochondrial par l'invalidation d'OPA1 semble altérer les transferts énergétiques. Nous avons donc souhaité savoir si les mécanismes de production d'énergie lors d'une augmentation des besoins étaient similaires lorsque le niveau d'expression d'OPA1 était diminué.

Pour mener à bien cette seconde étude, nous avons soumis notre modèle déficient pour la protéine OPA1 à des tests d'activité volontaire ou forcée. Pour identifier et comprendre les mécanismes d'adaptation lors d'un entraînement, nous avons utilisé des techniques permettant d'étudier l'organisation de l'architecture cellulaire, l'utilisation des substrats par les mitochondries, l'activité enzymatique et l'expression transcriptomique des différents partenaires intervenant dans la mise en place de la biogenèse mitochondriale ainsi que dans les différentes voies métaboliques (glucidique et lipidique).

2. ***Résultats et discussions***

L'entraînement physique choisi étant basé sur le volontariat, nous avons effectué dans un premier temps quelques vérifications des principaux points pouvant influencer l'activité des animaux. Ainsi, nous avons pu déterminer qu'à l'âge de 6 mois, les animaux disposaient de comportements (anxiété et coordination des mouvements) et de capacités physiques (vitesse de course, endurance) similaires. De plus, à l'aide de dosages sanguins, il a pu être vérifié qu'ils ne souffraient d'aucun désordre métabolique (cholestérol, diabète..).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés d'adaptation des souris en réponse à une activité répétitive spontanée induisant un entraînement d'endurance. Malgré leur déficience en OPA1, les souris réalisent volontairement les mêmes efforts d'entraînement. Aucune différence significative n'a été décelée dans leurs capacités. Enfin, nous avons étudié leurs capacités maximales par un test exhaustif.

Nous avons donc été surpris d'observer que les souris *Opa1*$^{+/-}$ étaient capables d'effectuer le même entraînement, et que de manière encore plus surprenante, leur capacité d'endurance était augmentée par rapport à celle des souris *Opa1*$^{+/+}$ entrainées.

Leur entraînement ayant été similaire, mais leur capacité d'endurance ayant évolué différemment, nous nous sommes donc demandés dans un troisième temps si cette activité avait entrainé ou nécessité une adaptation différentielle. Pour cela, nous avons mesuré l'évolution des paramètres anatomiques et phénotypiques. Nos observations ont permis de conclure qu'à partir de 6 mois, le défaut en OPA1 induisait une légère perte de poids corporel. Mais cette différence de poids restait stable au cours des 8 semaines d'activité, tout comme le poids des souris *Opa1*$^{+/+}$. De même, les effets principaux observés chez les souris *Opa1*$^{+/-}$ suite à un entraînement ont été l'apparition d'une légère hypertrophie cardiaque (uniquement pour les souris *Opa1*$^{+/-}$), et une hypertrophie moindre du muscle soléaire. Au niveau du gastrocnémien superficiel, nous avons observé que l'entraînement induisait une augmentation de l'expression de protéine OPA1 chez les souris *Opa1*$^{+/+}$ mais pas chez les souris *Opa1*$^{+/-}$.

Pour mieux comprendre les mécanismes pouvant expliquer la différence d'adaptation entre les deux souches de souris, nous avons regardé dans un quatrième temps la réponse des mitochondries à l'entraînement. Les deux axes étudiés ont été la biogenèse mitochondriale et le métabolisme mitochondrial.

Au niveau de la biogenèse mitochondriale, nous n'avons pas observé de différences significatives à l'état basal de l'activité de différentes enzymes spécifiques (CS, COX) dans les muscles squelettiques. Toutefois, après entraînement, nous avons observé que pour les muscles à métabolisme glycolytique (plantaire et gastrocnémien), l'activité des enzymes était augmentée dans les souris *Opa1*$^{+/+}$ comme attendu (Momken *et al.*, 2005), mais cette augmentation était fortement réduite chez les souris *Opa1*$^{+/-}$.

Cette différence d'activité enzymatique suggère une altération possible de la biogenèse mitochondriale. Pour comprendre à quel niveau du processus d'expression protéique cette biogénèse est altérée, l'expression d'ARN de plusieurs acteurs a été estimée, et révèle que les cellules des deux souches murines répondent de façon identique à leur entraînement. En complément des observations

faîtes par microscopie électronique qui révèlent des mitochondries altérées dans les muscles des souris *Opa1*$^{+/-}$ entraînées ; cela suggère donc une altération de la biogenèse mitochondriale au niveau de l'import ou de la stabilité des protéines impliquées.

Pour l'étude du métabolisme mitochondrial, les différents résultats suggèrent un remodelage métabolique vers l'utilisation des acides gras, uniquement pour les souris *Opa1*$^{+/-}$ entraînées. Ce changement d'utilisation de substrats peut être à l'origine de la meilleure endurance des souris *Opa1*$^{+/-}$. Nous avons tenté de comprendre quels étaient les acteurs affectés par la perte d'OPA1 pour expliquer cette adaptation différentielle. Pour cela, nous avons concentré notre attention sur l'expression transcriptomique des protéines impliquées dans les voies métaboliques, ainsi que celles impliquées dans le transport des substrats. Aucun effet génotype ou de l'entraînement n'a été observé pour ces deux voies.

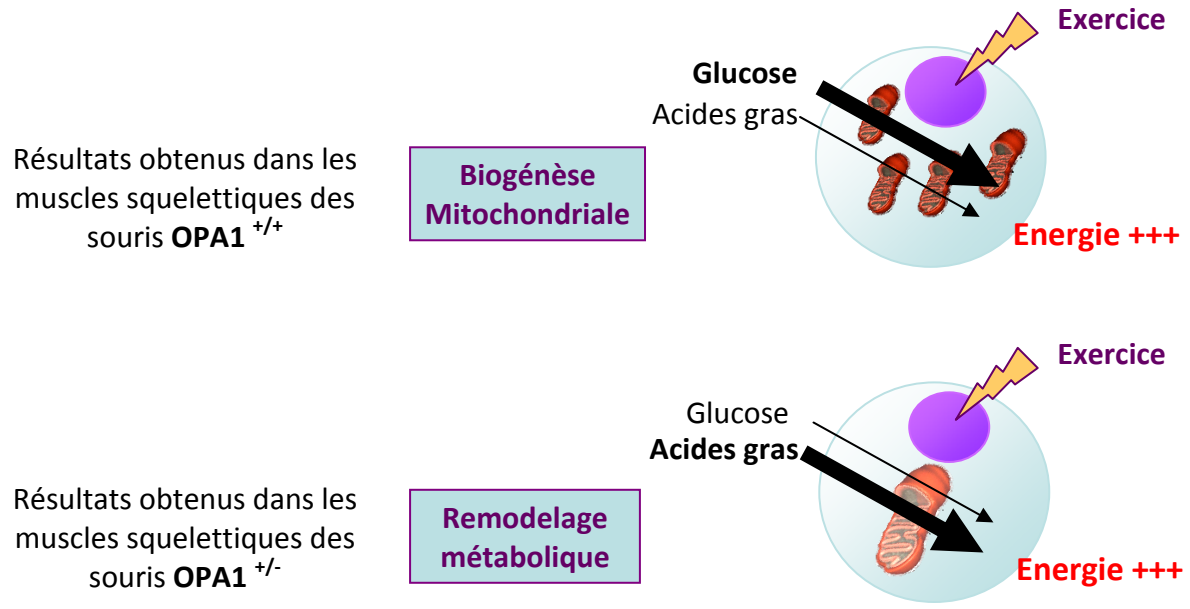


Figure 47 : Schéma bilan des observations faîtes sur les cellules du gastrocnémien suite à un entraînement.
L'adaptation des souris *Opa1*$^{+/-}$ à l'entrainement s'effectuait par un remodelage métabolique, vraisemblablement pour contrer un défaut d'adaptation de la biogénèse mitochondriale.

En conclusion, à l'aide d'un stress physiologique chronique, l'entraînement, nous avons pu observer le développement d'une légère hypertrophie cardiaque uniquement chez les souris Opa1$^{+/-}$ entraînées. Cela suggère que le défaut de remodelage structural provoque également une augmentation de la sensibilité cardiaque, même pour un effort physiologique.

De même (voir Figure 48), nous pouvons conclure que la perte d'OPA1 provoque une adaptation différentielle à un effort physique. En effet, pour un entraînement physique similaire aux souris contrôles, les muscles squelettiques des souris Opa1$^{+/-}$ présentent un remodelage métabolique vers une plus forte utilisation des acides gras, qui se traduit par une meilleure endurance à un effort forcé, plutôt que par une augmentation de la masse mitochondriale fonctionnelle. Cette adaptation différentielle est vraisemblablement mise en place au niveau des mitochondries pour contrer le défaut de mise en place de la biogenèse mitochondriale.

Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice

Caffin F[1,2], Prola A[1,2], Novotova M[4], David DJ[3], Garnier A[1,2], Fortin D[1,2], Alavi M[5], Veksler V[1,2], Ventura-Clapier R[1,2], Joubert F[1,2]

[1]INSERM, U-769, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France;

[2]Univ Paris-Sud, IFR 141, Châtenay-Malabry, France

[3]EA3544 Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France;

[4]Institute of Molecular Physiology & Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

[5]Department of Biology, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz, Mainz, Germany

Address for correspondence: Dr Frédéric Joubert
U-769 INSERM
Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud
5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry
France

Tel.: (33-1) 46.83.52.48. Fax: (33-1) 46.83.54.75. E-mail: frederic.joubert@u-psud.fr

INTRODUCTION

In eukaryotic cells, mitochondria are involved in many essential cellular processes. Changes in their viability and function are the cause of severe multi-syndromic diseases. To fulfill their different roles, mitochondria possess dynamic capabilities, fundamental for their biogenesis. The processes involved in mitochondrial dynamics are fusion and fission. The fusion machinery is composed of three large GTPases, the mitofusins Mfn1 and Mfn2, and the dynamin-related protein OPA1. The fission machinery is composed of the GTPases Drp1 and Fis1. Disruption of the mitochondrial balance of fusion-fission, such as a defect in fusion, leads to developmental neurodegenerative diseases in humans (Olichon *et al.*, 2006; Chan, 2006). *Opa1* gene mutations have been identified to cause Dominant Optic Atrophy (DOA) and are associated with a variety of clinical phenotypes (myopathy, encephalopathy, deafness, etc.) and with mechanisms involving mtDNA maintenance disorders (Hudson *et al.*, 2008; Amati-Bonneau *et al.*, 2008).

OPA1 is found in the mitochondrial inner membrane (IM) and the intermembrane space (Olichon *et al.*, 2002) where it exists in diverse splice– and proteolytic variants Its primary function is the fusion of the inner mitochondrial membranes, but OPA1 is also involved in additional functions, such as protection against apoptosis through mitochondrial cristae remodeling and control of mtDNA stability. Moreover, OPA1 deficiency can be associated with mitochondrial respiratory dysfunction (Olichon *et al.*, 2002; Chen & Chan, 2005; Elachouri *et al.*, 2011; Frezza *et al.*, 2006). OPA1 deletion in mice is lethal showing the importance of these processes during development (Alavi *et al.* 2007).

Understanding of OPA1 function is complicated by the fact that studies on its knockdown or overexpression have led to conflicting results. Mitochondrial fragmentation or elongation has been observed depending on the experimental system (Chen *et al.*, 2005; Olichon *et al.*, 2003; Olichon *et al.*, 2007; Piquereau *et al.*, 2012; Agier *et al.*, 2012). However, OPA1 deletion does not abolish outer membrane (OM) fusion leading to possible accumulation of multi-matrix structures reflecting fusion of OM without that of IM *ex vivo* (Song *et al.*, 2009) and *in vivo* (Piquereau *et al.*, 2012).

Mice with a heterozygous splice site mutation in the *Opa1* gene, leading to an inframe deletion of 26 AA resemble the human DOA phenotype (Alavi *et al.*, 2007; Alavi *et al.*, 2009, Heiduschka *et al.* 2010). We previously showed that cardiac mitochondria of these *Opa1*$^{+/-}$ mice have altered mitochondrial structure, decreased sensitivity to calcium and normal respiratory function (Piquereau *et al.*, 2012). The hearts of *Opa1*$^{+/-}$ mice have normal function but develop more serious cardiac hypertrophy and earlier ventricular dysfunction following

pressure overload (Piquereau *et al.*, 2012). We thus hypothesized that the defect in cardiac adaptation in these animals could be linked to the abnormal or retarded formation of new mitochondria, due to the involvement of OPA1 in mitochondrial biogenesis.

Mitochondrial biogenesis is a complex process that is defined as the growth and division of pre-existing mitochondria. Correct mitochondrial biogenesis relies on the spatiotemporally coordinated synthesis and import of more than 1000 proteins encoded by the nuclear genome, of which some are assembled with proteins encoded by the mitochondrial DNA within newly synthesized phospholipid membranes of the inner and outer mitochondrial membranes, and finally fission of newly formed mitochondria. All these processes have to be tightly regulated in order to meet the tissue requirements (Ventura-Clapier *et al.*, 2008).

To explore in more details the role of OPA1 in mitochondrial biogenesis, we studied the skeletal muscle adaptations of *Opa1*$^{+/-}$ mice to endurance exercise training. Indeed, it is well known that under such physiological stress, mitochondrial biogenesis is activated to meet the increased energetic demands of the muscles (Adhihetty *et al.*, 2003). We hypothesized that OPA1 deficiency may alter the adaptation to exercise endurance training. Our results show that *Opa1*$^{+/-}$ mice have the same exercise and training capacity as control mice. After training, *Opa1*$^{+/-}$ mice exhibited altered mitochondrial ultrastructure and biogenesis. Surprisingly, endurance capacity was increased in *Opa1*$^{+/-}$ trained mice. This correlated with a higher capacity to utilize fatty acid, evidencing a unique and previously unknown adaptive strategy to training.

METHODS

Animals

The heterozygous Opa1$^{329\text{-}355del}$ strain (abbreviated *Opa1*$^{+/-}$) has been initially described in (Alavi *et al.*, 2007). This strain has been crossed out to the C57Bl/6 J background and WT animals of the same background were used as controls. Mice were housed in an environmentally controlled laboratory with a 12 h/12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. Investigations were done according to the European Community for the care and use of animals (Directive 2010/63/EU), and approved by legal authorities (French decree no. 92-284, June 27, 2007). All experiments were conduced on 6/8-month-old male mice. At the end of the experimental period, animals were sacrificed by cervical dislocation. Cardiac, superficial part of gastrocnemius muscles, soleus and plantaris were isolated, washed in ice-cold calcium free Krebs buffer, weighed and rapidly frozen and kept at -80°C.

Behavior testing

Tests were conducted on 6 month-old *Opa1*$^{+/+}$ (n=12) and *Opa1*$^{+/-}$ (n=12) male mice. All animals were exposed to a series of behavioral paradigms designed to assess a range of anxiety-, depression-, and stress-related behaviors, as well as agility capabilities. The tests were administrated in the following order: open field, elevated plus maze, tail suspension test and rotarod test with a minimum of 3 days between each test. All behavioral testing took place between 10:00 AM and 2:00 PM. To eliminate odor cues, all testing equipment was thoroughly cleaned after each animal with benzalkonium chloride diluted 100-fold.

The Open field paradigm

This test has been developed to measure differences in ambulatory activity as a measure of emotional reactivity. In addition to information on motor activity, this test can predict anxiolytic activity due to paradigm "approach-avoidance" created. This test was performed as described previously (Dulawa *et al.*, 2004). Motor activity was quantified in four Plexiglas open field boxes 43 x 43cm² with white background (MED Associates, Georgia, VT). Two sets of 16 pulse-modulated infrared photo beams were placed on opposite walls 2.5cm apart to record x-y ambulatory movements of mouse. The test was performed in the dark over a 30min session; first of all mice were accustomed to dark in 15min, and then placed in a corner of boxes. Activity chambers were computer interfaced for data sampling at 100ms resolution. The computer defined grid lines that divide each open field into center and surround regions, with each of four lines being 11cm from each wall. Dependent measures were the number of entries into the various regions of the boxes, the distance traveled in the center, total time spent in the center, and distance traveled in the center divided by total distance traveled. Overall motor activity was quantified as the total distance traveled (cm).

The Elevated plus maze test

Anxiety behavior was measured by the degree of avoidance of labyrinth's open spaces. The elevated plus maze was performed as previously described (Lira *et al.*, 2003; Ramboz *et al.*, 1998). The elevated plus maze consisted of a plus-shaped apparatus with two open and two closed arms (30 x 6 cm); each with an open roof, elevated about 50cm from the floor. Testing took place in bright ambient light conditions (800–900 lux). Mice were placed into the central area facing one closed arm and allowed to explore the maze for 5min. They were recorded by a video camera positioned above the maze and scored by videotracking (Anymaze software, Bioseb, Vitrolles, France). Parameters recorded are: the time spent in different parts of the

maze and the number of entries in these areas. Also, total number of entries in the all labyrinth areas was an index of animal locomotion.

The Tail suspension test

The tail suspension test is a mouse behavioral test useful in the screening of potential antidepressant drugs, and assessing of other manipulation that is expected to affect depression related behaviors. The test was performed as previously described (Mayorga *et al.*, 2001; David et al., 2009). The device consists of 6 boxes of suspension (Bioseb, Vitrolles, France), connected to a computer to quantify, following parameters: immobility time, energy values in agitation. Duration of their immobility determine their level of resignation. Their tails suspends mice with tape to a hook connected to a vibration sensor; recording duration was 6min.

Rotarod

Mice motor coordination and balance was recorded as previously described (Stemmelin *et al.*, 2008; Minasyan *et al.*, 2009). The rotarod was composed of a plastic rod 3.2cm in diameter, 50cm long, elevated 22.5cm from the floor, and divided in 5 compartments, that allows testing simultaneously 5 mice. The surface of the rod was lightly roughened to minimize missteps (hind leg slips). Mice were placed on the rod for 3min at slow rotational speed (4 rpm). Rotational speed gradually accelerated up to 40rpm. If the mouse fell, it got back to its positions on rod, as many times as necessary until the end of the test. The latency to fall from the bar (in seconds) was measured manually and used as an indicator of motor coordination, and the number of falls as an indicator of their balance. Mice were scored by a highly trained observer blind to the genotype of the mice.

Voluntary wheel running

For voluntary activity, animals were housed in individual plexiglas cages (Bionox, Ancy, France) equipped with running wheel and free access to food and water (Momken *et al.*, 2004; Momken *et al.*, 2005). The running-wheel system consisted of a 31.8cm diameter wheel with a 5-cm wide running surface, connected to a direct current (DC) generator allowing slight loading of the wheel (25×10^{-3} N m) at mean maximal speed and continuous recording of the output voltage of the DC generator on a personal computer during 8-weeks. Instantaneous speed, calculated from the voltage and the resistive load on the DC generator, enabled calculation of the daily running distance. All daily parameters were averaged over each week for each animal.

Forced treadmill activity

Prior to the experiments, all mice were acclimatized to rodent treadmill and running exercise by 12min active in the treadmill apparatus, 4 days before experimental day (D-4) (running for 2min at 10m/min, 4min at 13m/min, 2min at 15m/min, 2min at 16.5m/min and 2min at 18m/min at a 4% slope), and D-3 (running for 2min at 13m/min, 2min at 16m/min, 2min at 18m/min, 4min at 20m/min and 2min at 22m/min at a 4% slope). Compressed air, triggered by a photocell at the end of each lane, was used, if necessary, to maintain the running motivation during acclimatization and experiments.

On the experimental day (D+0), to measure the maximal running speed performance, all animals were briefly warmed up at 10m/min for 6 min. Then animals were exercised until they were no longer able to maintain the increasing speed of the treadmill. Treadmill speed was increased by step of 3.3m/min every 1.5min to reach 30m/min at a 4% slope, and then speed treadmill was increased by step of 3.3m/min every min at a 4% slope. This allowed determining the maximal aerobic speed (MAS) for each animal.

Tested animals stayed 48h at rest before the second test (D+2): exhaustive running exercise. To measure the maximal endurance performance, each animal was briefly warmed up at 10m/min for 6min at a 4% slope. Then, treadmill speed was slowly increased during 6min until reaching the 60% maximal running speed for 4% slope for each animal. After warming up, animals were exercised at 60% of their maximal running speed until exhaustion.

Enzyme assay

Complete enzyme extraction were done on small pieces of frozen tissues in an ice-cold buffer (50 mg/ml; containing (in mM) Hepes 5 (pH 8.7), EGTA 1, DTT 1 and 0.1% Triton X-100) using a Precellys 24 Bertin homogenizer. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay. Total activities of COX, CS, CK, AK and LDH, were assayed (30°C, pH 7.5) using standard spectrophotometric assays (Momken *et al.*, 2005). Activities were given as µmol/min/g protein (µmol/min, international units, IU). Isoenzymes of CK were separated using agarose (1%) gel electrophoresis performed at 250 V for 90min. Individual isoenzymes were resolved by incubation of the gels with a coupled enzyme system.

Western blot experiments

Protein extracts (50µg) from gastrocnemius muscle of eight-month-old *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice were loaded on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, separated for 120min at 150V and subsequently transferred to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham) using a Bio-Rad blot system for 90min at 150V. Thereafter, blots were blocked 60min in 5% milk

in phosphate buffered saline and Tween at room temperature, followed by incubation with a primary antibody (OPA1: BD Biosciences 612606) overnight at 4°C. After washing, the membranes were incubated with horseradish peroxidase secondary antibody for 60min and revealed using a chemiluminescent substrate (Immobilion Western HRP, Milipore). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (ChemiDoc XRS; Bio-Rad) and quantified by image-analysis software (Quantity One. Bio-Rad). The antibodies used were highly specific because characteristic bands of the appropriate size (between 85 and 100 kDa) were obtained each time. OPA1 content was normalized to non specific band as a marker of protein load.

Mitochondrial respiration

Respiratory parameters of total mitochondrial population were studied *in situ* as previously described (Kuznetsov *et al.*, 2008). Fibers of plantaris and gastrocnemius muscles were separated under a binocular microscope in skinning (S) solution (below) at 4°C, and permeabilized into the same solution with 50µg/ml of saponin for 30min. Then, adenine nucleotides and creatine phosphate were eliminated by 10min of washing in respiration (R) solution (below) at 4°C. Experiments were performed on washed fibers under continuous stirring into an oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, UK), equipped with a Clark electrode, containing 3ml of solution R with additional substrates at 22°C. After experiments, fibers were collected and dried. Respiration rates were expressed as µmol O_2/min/g dry weight.

Solutions contained (in mM): EGTA-CaEGTA buffer 10 (free Ca^{2+} concentration 100nM), free Mg^{2+} 1, taurine 20, DTT 0.5, and imidazole 20 (pH 7.1). Ionic strength was adjusted to 160mM by addition of CH_3KO_3S. Solution S also contained MgATP 5 and PCr 15, whereas solution R contained 3mM KH_2PO_4 and 2mg/ml fatty acid free BSA.

Experimental protocol used was based on substrate utilization pathways. Firstly basal mitochondrial respiration rate was determined with 2mM ADP and 5mM malate. Secondly fatty acid oxidation rate was determined with palmitoyl-Coenzyme A + carnitine (100µM + 2mM), followed by the measurement of respiration rate with pyruvate (1mM). Lastly to determine the maximal capacity of the respiratory chain (complexes I, II, III, IV), glutamate (10mM) and succinate (15mM) were added to maximally activate complex I and II (Vmax).

Electron microscopy

Samples of superficial part of gastrocnemius muscles from 8-month-old mice were prepared for electron microscopy as previously described in (Novotova *et al.*, 2006). Isolated muscles

were stretched by 30% of their resting length in nominally calcium-free Krebs solution, and fixed with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer (150mM Na-cacodylate, 2.0mM $CaCl_2$; pH 7.3) for 30min. Four samples of each muscle were dissected from superficial regions around the central part of the muscle and fixed again for 45min with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer, post-fixed for 45min with 1% OsO_4 in cacodylate buffer, and contrasted over-night with saturated solution of uranyl acetate in H_2O. The samples were embedded into Durcupan (Fluka AG, Switzerland). Ultrathin (58 - 60 nm) longitudinal or transversal sections, were cut by Powere-Tome MT - XL ultramicrotome (RMC/Sorvall, Tucson, USA), placed on copper grids covered with formvar, and contrasted by lead citrate. The sections were examined with JEM 1200 electron microscope (Jeol, Japan). Images were recorded using a Gatan Dual Vision 300W CCD camera (Gatan Inc., USA).

Real-Time quantitative RT-PCR analysis

Total muscles RNA were extracted from 10 mg frozen tissue samples using a standard procedure with Bertin Precellys 24 and ice-cold Trizol reagent (Invitrogen) for extraction. Thus, RNA were precipitated by ethanol and resuspended in RNase-free water. RNA were quantified and checked for purity using the ratio of its absorbance at 260/280 nm.

Oligo-dT first strand complementary DNA were synthesized from 1µg total RNA according to the protocol provided with the iScipt cDNA synthesis kit (BIORAD).

Quantification of mRNA via cDNA produced was assessed using the SYBR®Green method as previously described (Piquereau *et al.*, 2010) on a CFX96® (Bio-Rad).

Each PCR amplification was performed with 12.5ng of cDNA in a total reaction volume of 15µl. The reaction mixture consisted of 5µl diluted template, 3µl MasterMix (Roche+) and 0.75µM forward and reverses primers (Table1). After 10min of taq polymerase activation, amplification was allowed to proceed for 45cycles: each cycle consisting of denaturation at 95°C for 10s, annealing at specific temperature (Table1) for 5s and extension at 72°C for 7s. Quantification of test sample concentration was achieved using a linear standard curve constructed from the analysis of a fivefold serial dilution from cDNA of sedentary *Opa1*$^{+/+}$. Primers were designed in a different exon of the target gene sequence, eliminating the possibility of amplifying genomic DNA and are presented in Table 1. A basic local alignment search tool (BLAST) search performed for each set of primers revealed that sequence homology was obtained only for the target gene. HK2 was chosen as housekeeping gene as its expression did not differ between groups.

Statistics analysis

All data are presented as mean ± Standard Error of the Mean (SEM), and significance was set at $p<0.05$. Two-way ANOVA was used to study the global effect of training activity and OPA1 genotype, and followed by Newman-Keuls posthoc test when appropriate to determine individual differences. For voluntary activity measurements, paired Student's T-test was applied.

RESULTS

Characterization of *Opa1*$^{+/-}$ mice at basal state

Opa1$^{+/-}$ mice have been characterized previously (Piquereau *et al.*, 2012; Alavi *et al.*, 2009; Alavi *et al.*, 2007). Sedentary *Opa1*$^{+/-}$ mice evidenced a slightly lower body and heart weight compared to their control littermate (Table 2). Before starting training experiments and especially voluntary test, we first ensure whether ubiquitous mutation of OPA1 had no impact on global mice behavior, which could influence the results of the running wheel experiments. Six-month-old *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ male mice were therefore exposed to a series of behavioral tests, from the less to the most stressful, to estimate their resistance to stress, their degree of anxiety and their agility (Figure 1). No difference was observed on all parameters during the open field test (Figure 1A and B) and in the elevated plus maze test (Figure 1C, D and E). Furthermore, in the tail Suspension test, both mice spend the same time of immobility to endure this uncomfortable position (Figure 1F). Finally, motor coordination and balance capabilities of the mice were estimated using an accelerod. Again, no difference was observed between the two mouse strains (Figure 1G). Thus, we concluded that OPA1 deletion has no major impact on mouse behavior.

Additional experiments were also performed to verify that mutant mice possessed the same capacity to exercise at basal level. Therefore, animals were tested for their maximal running speed and their endurance by a forced treadmill activity (*Opa1*$^{+/+}$, *Opa1*$^{+/-}$ n=16 for each group). Both groups reached the same maximal velocity (2.54±0.04 km/h and 2.49±0.06 km/h respectively), and succeeded to sustain the same endurance time (1.6±0.3 h for *Opa1* $^{+/+}$ mice versus 1.5±0.3 h for *Opa1*$^{+/-}$ mice). No difference was also observed at metabolism level since circulating glucose, cholesterol or triglycerides measured before and after exhaustion with blood samples were identical (data not shown). So we concluded that at basal state, *Opa1*$^{+/-}$ mice had no major behavioral disorder, and possessed the same physical capacity as control mice.

Opa1$^{+/-}$ mice response to training

The impact of OPA1 mutation on mouse voluntary exercise was estimated by monitoring the weekly averaged running distance of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice and the maximal speed reached in the wheel (Figure 2A). In both groups, we observed a progressive increase of these parameters with time, with no significant difference between animals. Only small differences were observed for the maximal speed at week two and three, but globally, OPA1 deletion does not seem to alter the ability of the mice to perform voluntary running activity and to train.

Both groups of animals seemed to be able to perform the same physical activity, but their endurance capacities could be changed after prolonged training. So, we measured the maximal running capacity and running time before exhaustion with the same forced treadmill test at the end of the training period on eight-month-old animals (Figure 2B). As expected, training improved these parameters in both groups due to its beneficial effect on the physical capacities of animals. But surprisingly, the endurance capacity of *Opa1*$^{+/-}$ mice increased ten times after training and much more than that of *Opa1*$^{+/+}$ mice (four-fold increase, $p<0.01$; Figure 2B right panel) with a strong genotype effect ($P<0.001$). Thus, after training, *Opa1*$^{+/-}$ mice became more resistant to forced exercise than control mice.

Data given in Table 2 show the effect of OPA1 mutation and training on anatomical parameters of sedentary and trained mice. Eight-month-old *Opa1*$^{+/-}$ mice were leaner compared to *Opa1*$^{+/+}$ mice, as evidenced by the significant decrease in body weight and body weight to tibia length. When normalized to body weight, no difference was observed in organ weights between sedentary mice. After training, body weight was not changed. Left ventricular weight hypertrophy was only observed in *Opa1*$^{+/-}$ mice, while soleus hypertrophy occurred in both groups of animals (training effect $P<0.001$). No effect of training was observed on plantaris muscle weight. Thus, the main anatomical effect of OPA1 depletion in response to exercise was a cardiac hypertrophy which can reflect an adaptation of *Opa1*$^{+/-}$ mice to support voluntary exercise.

Mitochondrial adaptation of trained *Opa1*$^{+/-}$ skeletal muscle

Exercise training is expected to increase mitochondrial biogenesis. We measured the level of OPA1 protein in the four groups of animals (Figure 3A). Gastrocnemius muscle was used for this purpose. Results showed that *Opa1*$^{+/-}$ mouse skeletal muscle had 50 % reduction of OPA1 protein, as expected with no change in protein variants. After training, OPA1 protein content was significantly increased in *Opa1*$^{+/+}$ mice, but not in *Opa1*$^{+/-}$ mice. This result revealed possible alteration of mitochondrial biogenesis in *Opa1*$^{+/-}$ mice. We thus studied in

more details mitochondrial biogenesis and function to understand how *Opa1*$^{+/-}$ mice adapt to exercise training.

Citrate synthase (CS) and cytochrome oxidase (COX) activities were measured to assess muscle mitochondrial mass before and after training (Figure 3B)**.** OPA1 mutation did not alter these activities in basal state as already observed in the heart (Piquereau *et al.*, 2012). After training, CS and COX activities did not increase in oxidative muscles (ventricle and soleus) of both *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. On the contrary, in fast skeletal muscles (plantaris and gastrocnemius) of both mice strains, training induced an increase in CS and COX activities. This increase was however greatly blunted in *Opa1*$^{+/-}$ mice, suggesting possible alteration of mitochondrial biogenesis in response to training due to the lack of OPA1.

Mitochondrial biogenesis and training

To understand at which step mitochondrial biogenesis in response to training was disturbed due to the lack of OPA1, we next measured expression of genes involved in mitochondrial dynamics and biogenesis in gastrocnemius muscle (Figure 4A). In sedentary animals, none of the mRNA levels of mitochondrial dynamic genes was modified, showing no clear compensation due to OPA1 mutation. Exercise training clearly activated the transcription cascade of mitochondrial biogenesis, including the genes of mitochondrial dynamics among which OPA1 but similarly in both mouse strains. A training effect was observed for all genes except for MCIP1, the marker of calcineurin activation, Tfam and PDK4, while a training effect was observed only for PGC-1α, HADHA, and PDK4. Thus, for the same level of physical activity, and at the transcription level of genes involved in mitochondrial biogenesis, OPA1 mutation had no major impact on the response to exercise training except for PGC-1α that was significantly higher and PDK4 that was not increased in trained *Opa1*$^{+/-}$. Interestingly, in this mouse glycolytic muscle a large induction of genes involved in fatty acid oxidation was observed but again without significant differences between strains. No major global genotype effect was noted except for PDK4, PGC-1α and Mfn2. Thus globally both mouse strains developed the same response to training.

Mitochondrial network organization of skeletal muscle

We analyzed the impact of OPA1 depletion and training on mitochondria network morphology after training (Figure 5). Muscle fibres of control *Opa1*$^{+/+}$ mice displayed typical ultrastructural features of fast glycolytic fibres. Myofibrils were arranged in register, triads were present near the I/A band boundaries. Profiles of mitochondria in longitudinal sections were small, mitochondria were localized at the sides of the I bands near the Z lines.

Ultrastructural analysis of the control fibers revealed the presence of tubular aggregates (TAs) intercalated between myofibrils and under sarcolemma. Mitochondrial ultrastructure was normal with a regular arrangement of cristae and with homogeneous matrix (Fig.5A). In *Opa1*$^{+/-}$ mice, the ultrastructure of muscle fibres was slightly disordered in some regions of the fibres due to irregular arrangement of the sarcomeres. Electron microscopic analysis revealed regions with regularly arranged mitochondria near the Z lines but the size of mitochondria was slightly larger compared to the control. Some mitochondria were devoid of cristae and matrix (Fig. 5B, D), and signs of mitochondrial destruction were often observed (Fig. 5C and D). A specific feature of muscle fibres of *Opa1*$^{+/-}$ mice was the presence of large mitochondria. The ultrastructure of giant mitochondria was modified. Disappearance of cristae in these mitochondria was accompanied by formation of irregular vacuoles (Fig. 5E). In some large mitochondria, remodelled morphology of cristae as well as the absence of outer mitochondrial membrane was found (Fig. 5F).

Effect of training on mitochondrial metabolism in *Opa1*$^{+/-}$ mice

The lack of OPA1 could influence the response to training of enzymes involved in energy transfer, so we measured whether creatine kinase (CK) adenylate kinase (AK) and lactate dehydrogenase (LDH) were modulated in our four groups of animals. Data of CK and AK contents are presented in Table 3. Globally, neither physical activity nor OPA1 deletion induced considerable changes in the activities of these enzymes. Total activities of enzymes were the same in skeletal muscle in the four groups of animals, except for the mi-CK activity of *Opa1*$^{+/-}$ mice plantaris which was increased by training three times less than in *Opa1*$^{+/+}$ trained mice. Lactate dehydrogenase (LDH) activity, a marker of glycolytic chain, was also measured (Table 3). The only statistical difference observed between groups was for the soleus muscle a 21% decrease of LDH activity in *Opa1*$^{+/-}$ trained mice. So, OPA1 mutation does not seem to influence LDH activity in the different muscles. Thus, there were not major effects of genotype on intracellular energy transfer that allowed explaining how animals can perform the same training capacities.

The activity of respiratory chain and the ability of mitochondria to utilize different substrates were finally studied in fast skeletal muscles by oxygen consumption experiments before and after training (Table 4). In control mice, training did not improve maximal respiratory capacities of both plantaris and gastrocnemius muscles (Table 4). *Opa1*$^{+/-}$ trained mice evidenced an increase in V_{max} (+46 %) only in plantaris muscle. Fatty acid (FA) utilization, a good marker of endurance capacity, was also estimated in plantaris and gastrocnemius muscles (Figure 6B). Interestingly, some interactions of global effect between

genotype and training for several parameters of FA utilization were observed. Training had no effect on FA utilization in control mice, but on *Opa1*$^{+/-}$ trained mice, FA utilization was improved by 47% in plantaris muscle and 57% in gastrocnemius muscle. No change of pyruvate utilization was observed in plantaris and gastrocnemius (Table 4). All the results suggest that a training-induced metabolic remodeling occurred in *Opa1*$^{+/-}$ mice towards a better ability to utilize FA, which could explain the better endurance capacity of *Opa1*$^{+/-}$ after training.

DISCUSSION

Mutations in the mitochondrial fusion protein OPA1 are responsible for neurodegeneration of the retinal ganglion cells and induce visual defects. However, it is not yet clear whether and how it also affects skeletal muscle cells and exercise capacity. This study reports the involvement of OPA1 mitochondrial dynamic protein in mitochondrial biogenesis induced by training. We showed that OPA1 reduction did not disrupt running and training capacities, but highly improved endurance capacity after training. This adaptation to exercise did not involve mitochondrial biogenesis and led to a specific response involving a metabolic remodeling towards higher FA utilization.

OPA1 deficiency, exercise capacity and adaptation to exercise training.

OPA1 mutations that are responsible for optic atrophy are present in the whole body and may thus be responsible for cardiac and skeletal muscle alterations. They may also affect exercise capacity. Indeed, heterozygous Opa1 mutations in drosophila cause reduced escape response, suggesting abnormal function of the skeletal muscles under stress conditions (Shahrestani *et al.*, 2009). This also suggests that patients bearing OPA1 mutations may have altered exercise capacity. Indeed, in patients with dominant optic atrophy, a deficit of oxidative phosphorylation was evidenced by a decreased rate of postexercise phosphocreatine resynthesis (Lodi *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2004). However, skeletal muscle mitochondrial mass as well as properties vary greatly with exercise capacity (Garnier *et al.*, 2005) rendering human data sometimes difficult to interpret. We thus estimated the exercise and training capacity of *Opa1*$^{+/-}$ mice by voluntary wheel running and forced exercise on treadmill. Because OPA1 deficiency may induce neurological disorders, we examined the *Opa1*$^{+/-}$ mouse behavior at this age and found no major impact of the mutation on anxiety, emotional reactivity, stress-related behaviors or agility, in line with previous studies (Alavi *et al.*, 2009).

We then examined the exercise capacity of untrained mice and found that work or running distance did not differ between control and deficient mice. Among the factors that can influence exercise capacity, mouse weight can play a role. We found a slightly lower body weight of *Opa1*$^{+/-}$ mice, which hardly explains the improved exercise performance of *Opa1*$^{+/-}$ mice. We then tested the training ability of the mice. The program of 8 weeks running led to a significant improvement in the performance of control and *Opa1*$^{+/-}$ mice. This suggests that exercise and training capacities were not altered by OPA1 deficiency. However, after training, the heart weight in *Opa1*$^{+/-}$ mice was increased compared to controls. This evidences that training induced more severe cardiac stress in *Opa1*$^{+/-}$ mice, which is compensated by an increased cardiac weight, as previously observed in response to pathological stress (Piquereau *et al.*, 2012).

Endurance exercise performances are mainly dependent on energy metabolism and mitochondrial biogenesis. However, voluntary wheel running represents a moderate type of exercise training. To estimate the maximal endurance exercise abilities of the mice, we performed a forced treadmill running test until exhaustion before and after training. To compare the endurance abilities, we carefully matched the maximal running speed at which the animals ran on the treadmill. Again, in sedentary animals, there was no difference in maximal speed or running time. However, surprisingly, while training induced a similar increase in maximal running speed in both strains, a striking difference was observed as the time to exhaustion was more than two-fold higher for *Opa1*$^{+/-}$ mice suggesting a unique adaptive strategy. Thus, OPA1 deficiency by itself does not seem to greatly affect exercise and training capacities, but endurance capacity.

OPA1 deficiency, exercise training and mitochondrial biogenesis

Skeletal muscle is a highly malleable tissue capable of considerable metabolic and morphological adaptations in response to repeated bouts of contractile activity. The remodeling of mitochondrial network plays a central role in the plasticity of skeletal muscle in response to exercise. More specifically, endurance exercise training induces adaptation in the skeletal muscle that requires the coordination of multiple cellular events with the most dramatic changes occurring at the level of mitochondrial biogenesis. Mitochondrial biogenesis is a complex mechanism involving transcription and translation of mitochondrial proteins, synthesis of mitochondrial membranes, but also a morphological remodeling involving the fusion/fission machinery for separation of daughter mitochondria, addressing to the right position between myofilaments, under the sarcolemma or around the nucleus. Thus, proper and complete mitochondrial biogenesis requires the coordination and precise

succession of molecular and morphological processes. Exercise training is one of the main inductor of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle.

Starting from the transcriptional machinery, the peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator-1α (PGC-1α) plays a key role in the control of energy metabolism, angiogenesis and mitochondrial biogenesis. It induces the transcription and co-activates a number of transcription factors involved in mitochondrial biogenesis like the nuclear respiratory factors (NRFs) and the estrogen-related receptors (ERRs) as well as in fatty acid oxidation (PPARs). Mitochondrial biogenesis was similarly induced in gastrocnemius muscle of WT and *Opa1*$^{+/-}$ mice as evidenced by increased mRNA expression of transcriptional regulators, mitochondrial proteins and fatty acid oxidation enzymes in fast skeletal muscles. This was also the case for proteins of the mitochondrial dynamics with no major impact of the genotype. This is in accordance with the proposal that proteins of mitochondrial dynamic are under the control of the mitochondrial biogenesis program mainly controlled by PGC-1α and its transcription cascade and thus similarly respond to exercise training (Garnier *et al.*, 2005). Importantly, this shows that the signaling pathways involved in the up-regulation of metabolic genes in response to exercise training were similarly activated in both strains and that OPA1 deletion does not impact mitochondrial adaptations at the transcription level. This is in accordance with the similar exercise work performed by the mice over the eight weeks (25.0±3.2 kjoules for WT (n=19) versus 30.4±4.0 kjoules (n=17) for *Opa1*$^{+/-}$ mice).

At the level of mitochondrial enzymes, exercise training induced a more than 50% increase in CS and COX activities in fast but not slow muscles, but differently in the two mouse strains. Indeed, CS and COX activities and OPA1 protein content were increased to a lower extent in both fast muscles of *Opa1*$^{+/-}$ mice despite a similar increase in mRNA levels, suggesting a defective mitochondrial biogenesis process a step further of transcription, or an alteration of mitochondrial protein import. Because OPA1 plays an important role in fusion/fission mechanisms that are involved in the morphological remodeling of mitochondria during biogenesis, a defect in this process may lead to altered mitochondrial structure and mitochondrial protein degradation. Electron microscopy examination of the fast skeletal muscle revealed that mitochondria were irregular in size with appearance of giant mitochondria. Interestingly, in highly differentiated and crowded skeletal muscle cells, as in cardiac cells, OPA1 deficiency led to the accumulation of larger mitochondria with multiple inner membranes (Piquereau *et al.*, 2012). Some mitochondria were devoid of cristae and matrix and this was accompanied by formation of irregular vacuoles, suggesting mitochondrial damages. It was already shown that OPA1-null cells have severe ultrastructural defects in the mitochondria, including swollen mitochondria and defects in cristae

organization, such as concentric inner membranes that was attributed to the role of OPA1 in cristae maintenance (Olichon *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2009; Agier *et al.*, 2012). It can be proposed that OPA1 deficiency impairs the normal process of mitochondrial fission during biogenesis and induces defective mitochondria leading to the release of mitochondrial proteins and their degradation.

OPA1 deletion, exercise performances and metabolic remodeling

It was surprising that mice had similar training capacities after increased endurance performances despite defective mitochondrial biogenesis. During exercise, muscle contraction induces an increase in ATP requirement. Carbohydrates and lipid are the primary substrates oxidized to generate ATP required to sustain muscle contraction. Endurance time is dependent on mitochondrial content but also highly dependent on the use of fatty acids. We thus measured oxidative capacity of fast skeletal muscle fibers. While training did not induce an increase in maximal oxidative capacity in the presence of pyruvate and fatty acids in *Opa1*$^{+/+}$, maximal respiration was significantly increased in *Opa1*$^{+/-}$ mice. This was mainly due to an increase in the capacity of fast skeletal muscle to oxidize fatty acids. Fatty acid utilization is a major determinant of endurance capacity. Depending on exercise intensity, the rate of fatty acid oxidation exists in a reciprocal fashion with the rate of carbohydrate oxidation. It was recently shown that alteration of fatty acid transport in CD36 KO mice is sufficient to decrease endurance time of mice independently of mitochondrial biogenesis and mitochondrial content (McFarlan *et al.*, 2012). Conversely, we found an increase in endurance time in *Opa1*$^{+/-}$ mice that coincide with increased mitochondrial fatty acid utilization and increased CD36 expression. A direct role of OPA1 deficiency in this matter is not expected as OPA1 has been proposed to favor fatty acid oxidation (Pidoux *et al.*, 2011; Quiros *et al.*, 2012). It can thus be proposed that the impairment of mitochondrial biogenesis in *Opa1*$^{+/-}$ mice was compensated by the indirect activation of an adaptive pathway leading to a better utilization of fatty acids resulting in an increase in endurance performance.

In conclusion, OPA1 deficiency is not sufficient by itself to alter exercise capacity in mice but it may limit training capacities and is compensated by a unique adaptive program involving increased heart weight and fast skeletal muscle fatty acid utilization capacities. Such remodeling does not appear to be deleterious in physiological situation, but could be detrimental in situation of disease states or increased workload.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. R. Fischmeister for continuous support. We thank Valérie Domergue-Dupont and the animal core facility of IFR141 for efficient handling and preparation of the animals and Ladislav Novota for the help with electron microscopy studies. We are grateful to Bernd Wissinger (Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Germany) for sharing the *Opa1*$^{+/-}$ mouse line. This work was supported by a PhD grant from Region Ile de France to FC, a VEGA project 2/0116/12 and APVV SK-FR-0021-11 to MN, a French/Slovak grant Stefanik 17948XC, and Labex LERMIT. RVC and FJ are scientists at the Centre National de la Recherche Scientifique.

BIBLIOGRAPHY

Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V & Hood DA (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exper Physiol* **88**, 99-107.

Agier V, Oliviero P, Laine J, L'Hermitte-Stead C, Girard S, Fillaut S, Jardel C, Bouillaud F, Bulteau AL & Lombes A (2012). Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1570-1580.

Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC , Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J & Wissinger B (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* **130**, 1029-1042.

Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF & Wissinger B (2009). Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* **220**, 404-409

Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martin MA, Arenas J , Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D & Carelli V (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338-351.

Chan DC (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241-1252.

Chen H & Chan DC (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R283-R289.

Chen H, Chomyn A & Chan DC (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* **280**, 26185-2692.

Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B & Hen R (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1321-30.

Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C, Olichon A, Loiseau D, Reynier P, Chinnery PF, Rotig A, Carelli V, Hamel CP, Rugolo M & Lenaers G (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* **21**, 12-20.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B & Scorrano L (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-89.

Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B, Lampert E, Veksler V & Ventura-Clapier R (2005). Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J* **19**, 43-52.

Heiduschka P, Schnichels S, Fuhrmann N, Hofmeister S, Schraermeyer U, Wissinger B, Alavi MV. Electrophysiological and histologic assessment of retinal ganglion cell fate in a mouse model for OPA1-associated autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:1424-1431.

Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF & Taylor RW (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* **131**, 329-37.

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965-976.

Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R & Gingrich JA (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry* **54**, 960-71.

Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Iotti S, Clementi V , Malucelli E, Barboni P, Longanesi L, Schimpf S, Wissinger B, Baruzzi A, Barbiroli B & Carelli V (2004). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* **56**, 719-723.

Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Manners D, Testa C, Malucelli E, La Morgia C, Barboni P, Carbonelli M, Schimpf S, Wissinger B, Zeviani M, Baruzzi A, Liguori R, Barbiroli B & Carelli V (2011). Defective mitochondrial adenosine triphosphate production in skeletal muscle from patients with dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Arch Neurol* **68**, 67-73.

Mayorga AJ, Dalvi A, Page ME, Zimov-Levinson S, Hen R & Lucki I (2001). Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 1101-7.

McFarlan JT, Yoshida Y, Jain SS, Han XX, Snook LA, Lally J, Smith BK, Glatz JF, Luiken

JJ, Sayer RA , Tupling AR, Chabowski A, Holloway GP & Bonen A (2012). In Vivo, Fatty Acid Translocase (CD36) Critically Regulates Skeletal Muscle Fuel Selection, Exercise Performance, and Training-induced Adaptation of Fatty Acid Oxidation. *J Biol Chem* **287**, 23502-23516.

Minasyan A, Keisala T, Zou J, Zhang Y, Toppila E, Syvala H, Lou YR, Kalueff AV, Pyykko I & Tuohimaa P (2009). Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* **114**, 161-6.

Momken I, Lechene P, Koulmann N, Fortin D, Mateo P, Doan BT, Hoerter J, Bigard X, Veksler V & Ventura-Clapier R (2005). Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice. *J Physiol* **565** , 951-964.

Momken I, Lechene P, Ventura-Clapier R & Veksler V (2004). Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H914-920.

Novotova M, Pavlovicova M, Veksler V, Ventura-Clapier R & Zahradnik I (2006). Ultrastructural remodeling of fast skeletal muscle fibers induced by invalidation of creatine kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1279-C1285.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-6.

Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G & Belenguer P (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* **523**, 171-176.

Olichon A, Guillou E, Delettre C, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Daloyau M, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G & Belenguer P (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 500-509.

Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, Delettre C, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G & Belenguer P (2007). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* **211**, 423-430.

Pidoux G, Witczak O, Jarnaess E, Myrvold L, Urlaub H, Stokka AJ, Kuntziger T & Tasken K (2011). Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J*

Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Prola A, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh le H, Nicolas V, Alavi MV, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V & Joubert F (2012). Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc Res* **94**, 408-417.

Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V & Joubert F (2010). Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* **588**, 2443-54.

Quiros PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernandez-Vizarra E, Rodriguez F, Peinado JR, Fernandez-

Garcia MS, Vega JA, Enriquez JA, Zorzano A & Lopez-Otin C (2012). Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J* **31**, 2117-33.

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D & Hen R (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14476-81.

Shahrestani P, Leung HT, Le PK, Pak WL, Tse S, Ocorr K & Huang T (2009). Heterozygous mutation of Drosophila Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* **4**, e6867.

Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG & Chan DC (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* **20**, 3525-3532.

Stemmelin J, Cohen C, Terranova JP, Lopez-Grancha M, Pichat P, Bergis O, Decobert M, Santucci V, Francon D, Alonso R, Stahl SM, Keane P, Avenet P, Scatton B, le Fur G & Griebel G (2008). Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**, 574-87.

Suen DF, Norris KL & Youle RJ (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**, 1577-1590.

Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis. The central role of PGC-1α. *Cardiovascular Research* **79**, 208-217.

TABLES

Table 1. Primers and conditions for real-time PCR amplification

Genes	N° GeneBank	Forward primers (5'>3') Reverse primers (5'>3')	PCR Product size (pb)	Annealing temperature (°C)
CD36	NM_007643	CCA CTG TGT ACA GAC AGT TTT GG GCT CAA AGA TGG CTC CAT TG	195	60
CPT1β	NM_009948	TCA CCT GGG CTA CAC GGA GA TCG GGG CTG GTC CTA CAC TT	219	65
CS	NM_130755	CAA GAT TGT GCC CAA TAT CCT C TTC ATC TCC GTC ATG CCA TA	111	60
Drp1	NM_053655	CTG ACG CTT GTG GAT TTA CC CCC TTC CCA TCA ATA CAT CC	277	58
Fis1	NM_025562	GCC TGG TTC GAA GCA AAT AC CAC GGC CAG GTA GAA GAC AT	116	60
GLUT4	NM_009204	CCG TGG CCT CCT ATG AGA TAC T AGG CAC CCC GAA GAT GAG T	122	64
HK2	NM_013820	TTT CAC CTT CTC GTT CCC CT GTC ATT CAC CAC AGC CAC AA	175	60
MCAD	NM_007382	CCG TTC CCT CTC ATC AAA AG ACA CCC ATA CGC CAA CTC TT	129	60
MFN1	NM_024200	TGC CCT CTT GAG AGA TGA CC AGA GCC GCT CAT TCA CCT TA	182	60
MFN2	NM_133201	GGG GCC TAC ATC CAA GAG AG CCT TGG ACA GGT ACC CTT TG	115	60
NRF1	NM_010938	TTA CTC TGC TGT GGC TGA TGG CCT CTG ATG CTT GCG TCG TCT	92	60
OPA1	NM_133752	TCA GCA AAG CTT ACA TGC AGA TGC TTG GAC TGG CTA CAT TTT	180	60
PDK4	NM_013743	CCT TCA CAC CTT CAC CAC AT AAA GAG GCG GTC AGT AAT CC	189	60
PGC1α	NM_008904	CAC CAA ACC CAC AGA GAA CAG GCA GTT CCA GAG AGT TCC ACA	210	58
PPARα	NM_011144	AAG TGC CTG TCT GTC GGG AT GCT TCG TGG ATT CTC TTG CC	161	62
PPARβδ	NM_011145	GCC TCC ATC GTC AAC AAA GA TCT ACC TGG GGC ACA TTC AT	230	60
Tfam	NM_009360	GCT GAT GGG TAT GGA GAA G GAG CCG AAT CAT CCT TTG C	161	56

CD36 cluster of differentiation 36; CPT1β muscle isoform of carnitine palmitoyl transferase I; CS citrate synthase; Drp1 dynamin-1-like protein; Fis1 mitochondrial fission 1 protein; GLUT4 glucose transporter type 4; HK2 hexokinase 2; MCAD middle chain acyl-CoA dehydrogenase; MFN mitofusin; NRF1 nuclear respiratory factor 1; OPA1 optic atrophy type 1; PDK Pyruvate dehydrogenase kinase; PGC peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator; PPAR peroxisome proliferator-activated receptor; Tfam mitochondrial transcription factor A.

Table 2. Anatomical data

	Sedentary		Trained				
	Opa1$^{+/+}$	***Opa1***$^{+/-}$	***Opa1***$^{+/+}$	***Opa1***$^{+/-}$	**Genotype**	**Training**	**Interaction**
BW (g)	33.6±0.6	29.7±0.4 ***	32.5±0.9	30.0±0.5 **	$$$	ns	ns
HW (mg)	178.9±7.5	154.1±6.1 *	178.1±5.6	169.9±5.0	$$	ns	ns
LVW (mg)	111.5±4.9	95.4±1.6 **	113.3±3.5	107.2±2.4 #	$$	ns	ns
Soleus W (mg)	9.9±0.3	9.1±0.3	12.2±0.4 ###	10.9±0.5 * ##	$$	$$$	ns
Plantaris W (mg)	21.3±0.9	21.8±1.1	22.1±1.1	19.9±1.2	ns	ns	ns
Tibia Length (cm)	1.80±0.01	1.81±0.01	1.80±0.01	1.79±0.01	ns	ns	ns
BW/TL (g/cm)	18.7±0.2	16.4±0.2 ***	18.0±0.4	16.8±0.2 **	$$$	ns	ns
HW/BW (mg/g)	5.3±0.2	5.2±0.2	5.5±0.2	5.7±0.2	ns	ns	ns
LVW/BW (mg/g)	3.34±0.17	3.18±0.07	3.5±0.09	3.57±0.07 #	ns	$$	ns
SW/BW (mg/g)	0.30±0.01	0.29±0.01	0.38±0.01 ###	0.36±0.02 ###	ns	$$$	ns
PW/BW (mg/g)	0.63±0.03	0.72±0.03	0.68±0.04	0.67±0.04	ns	ns	ns

BW, body weight; HW, heart weight; LVW, left ventricular weight, SW soleus weight, PW plantaris weight. Sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=17), *Opa1*$^{+/-}$ (n=16); Trained *Opa1*$^{+/+}$ (n=19), *Opa1*$^{+/-}$ (n=17) mice of 8 month. Values are means ± S.E.M, Significantly different: *, #, $ P<0.05, **, ##, $$ P<0.01, ***, ###, $$$ P<0.001. * *Opa1*$^{+/-}$ versus *Opa1*$^{+/+}$, # active versus sedentary, $ Global effect of Genotype or training.

Table 3. Biochemical parameters

	Sedentary		Trained				
	Opa1+/+	**Opa1+/-**	**Opa1+/+**	**Opa1+/-**	**Genotype**	**Training**	**Interaction**
Ventricle							
AK	2283±84	2086±75	2489±281	1798±87*	$	ns	ns
CK	2546±163	2434±156	2851±300	2276±101	ns	ns	ns
LDH	1408±40	1408±73	1549±160	1284±49	ns	ns	ns
Soleus							
AK	3269±138	3507±184	3353±156	3074±111	ns	ns	ns
CK	5251±241	5192±301	5275±327	4911±131	ns	ns	ns
LDH	1089±60	1145±49	931±62	902±41 *	ns	$$	ns
Plantaris							
AK	4612±176	4992±298	5149±188	5039±203	ns	ns	ns
CK	11397±639	12741±372	11632±280	11442±629	ns	ns	ns
mi-CK	166±18	255±53	414±34 ##	386±33 #	ns	$$$	ns
MM-CK	11172±636	12402±329	11265±284	10875±705	ns	ns	ns
MB-CK	59±8	84±14	86±9	93±13	ns	ns	ns
LDH	2373±73	2533±173	2379±89	2148±94	ns	ns	ns
Gastrocnemius							
AK	4861±298	5946±389	5682±287	4959±327	ns	ns	$$
CK	15129±653	16055±1016	15961±800	13692±718	ns	ns	ns
mi-CK	118±25	103±33	150±33	146±21	ns	ns	ns
MM-CK	14937±641	15882±1002	15717±775	13455±720	ns	ns	ns
MB-CK	74±12	70±10	95±13	91±8	ns	ns	ns
LDH	2697±123	3219±292	3217±154	2664±175	ns	ns	$

Sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=8), *Opa1*$^{+/-}$ (n=6); Trained *Opa1*$^{+/+}$ (n=9), *Opa1*$^{+/-}$ (n=9). AK, adenylate kinase; CK, creatine kinase; Mi-CK, MM-CK and MB-CK isoforms of CK; LDH, lactate dehydrogenase. Values are means in I.U/ g prot ± S.E.M. Significantly different: *, #, $ P<0.05, $$ P<0.01, ###, $$$ P<0.001. * *Opa1*$^{+/-}$ versus *Opa1*$^{+/+}$, # active versus sedentary.

Table 4. Respiration parameters

	Sedentary		Trained				
	Opa1$^{+/+}$	***Opa1***$^{+/-}$	***Opa1***$^{+/+}$	***Opa1***$^{+/-}$	**Genotype**	**Training**	**Interaction**
Plantaris							
Vo	0.9±0.2	0.5±0.1	1.8±0.3 #	1.1±0.1 *	$	$$	ns
Vmax	22.5±2.2	18.9±1.4	24.8±1.8	27.6±3.2 #	ns	$	ns
V FA	2.2±0.2	1.7±0.1	1.8±0.2	3.7±0.8 **, ##	ns	$	$$
V Pyr	12.9±2.0	8.5±1.5	11.2±1.5	12.7±1.3	ns	ns	$
Gastrocnemius							
Vo	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.5±0.0	ns	ns	ns
Vmax	15.0±0.8	13.7±0.8	15.7±0.6	14.5±0.6	ns	ns	ns
V FA	0.9±0.1	0.9±0.2	1.0±0.1	1.4±0.1 *, ##	ns	$$	ns
V Pyr	8.0±0.9	8.3±0.4	7.3±0.8	6.9±0.6	ns	ns	ns

Plantaris: Sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=7), *Opa1*$^{+/-}$ (n=7); Trained *Opa1*$^{+/+}$ (n=7), *Opa1*$^{+/-}$ (n=6). Gastrocnemius: Sedentary *Opa1*+/+ (n=9), *Opa1*+/- (n=9); Trained *Opa1*+/+ (n=17), *Opa1*+/- (n=13). V Values are means in µmol O2/g dry wt ± S.E.M. Vo, basal respiration rate in malate & ADP. Vmax, maximal respiration rate in FA, pyruvate, glutamate and succinate. V FA, respiration rate in presence of carnitine and palmitoyl-CoA. V Pyr, respiration rate in pyruvate. Significantly different: *, #, $ P<0.05, $$ P<0.01, ###, $$$ P<0.001. * *Opa1*$^{+/-}$ versus *Opa1*$^{+/+}$, # active versus sedentary.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Similar behavior of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice.

(**A–B**) Effects of OPA1 deletion on anxiety behaviors in the Open-Field. Anxiety is measured as mean of the total time spent in the center in seconds (**A**). Locomotor activity is measured as total ambulatory distance traveled (**B**).

(**C-D-E**) Effects of OPA1 deletion on anxiety behaviors in the Elevated plus. Anxiety is expressed as mean total time in the open arms (**C**), as mean total entries in the open arms (**D**) and as mean total entries in all arms as an index of their locomotion (**E**).

(**F**) Effects of OPA1 deletion on behavior in the Tail Suspension test. Results are expressed as mean of immobility duration (in seconds) as their resignation indices.

(**G**) Effects of OPA1 deletion in the rotarod test. The number of falls during accelerating rotarod test as balance capabilities indicator.

Sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=12), *Opa1*$^{+/-}$ (n=12) 6 month-old animals. Values are means ± S.E.M.

Figure 2. Similar training capacity of *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice but increased endurance performance in trained *Opa1*$^{+/-}$ mice.

A. Voluntary wheel running capacity of *Opa1*$^{+/-}$ (n=17) and *Opa1*$^{+/+}$ (n=19) animals expressed as daily running distance (left panel) or maximal running speed (right panel) over a 8 week period. * Significantly different from *Opa1*$^{+/+}$, P<0.05.

B. Forced activity of sedentary or active *Opa1*$^{+/-}$ and *Opa1*$^{+/+}$ animals expressed as means of maximal running speed (left panel) or running time before exhaustion (right panel).

Values are means ± S.E.M. Significantly different: **, P<0.01, ### P<0.001. * *Opa1*$^{+/-}$ versus *Opa1*$^{+/+}$, # active versus sedentary. Sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=3), *Opa1*$^{+/-}$ (n=3), trained *Opa1*$^{+/+}$ (n=7), and *Opa1*$^{+/-}$ (n=4) mice.

Figure 3. Decreased activity and expression of mitochondrial proteins following training in *Opa1*$^{+/-}$ mice

A. OPA1 expression. Each lane was loaded with 50µg of total gastrocnemius muscle extracts of 8-month-old sedentary or active *Opa1*$^{+/+}$ and *Opa1*$^{+/-}$ mice. Upper lane: original recording. Lower lane: means ± S.E.M of OPA1 protein. **B.** Citrate synthase (CS) and cytochrome oxidase (COX) activities. Activities were measured spectrophotometrically. Significantly different: #P<0.05 active versus sedentary, **P<0.01, ***P<0.001 *Opa1*$^{+/-}$ versus *Opa1*$^{+/+}$ for sedentary or active mice. Eight month-old sedentary *Opa1*$^{+/+}$ (n=5), *Opa1*$^{+/-}$ (n=4), trained *Opa1*$^{+/+}$ (n=6), and *Opa1*$^{+/-}$ (n=6) mice.

Figure 4. Increased mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle.

mRNA expression levels of proteins involved in mitochondrial dynamics and biogenesis **(A)** or in glucose and lipid utilisation pathways **(B)**. mRNA levels were normalised to mRNA level of HK2 and compared to the mRNA level of sedentary *Opa1*$^{+/+}$ mice. Values are means ± S.E.M. Significantly different: *, $^{\#}$P<0.05, **, $^{\#\#}$P<0.01, $^{\#\#\#}$P<0.001. *$Opa1^{+/-}$ versus $Opa1^{+/+}$, $^{\#}$active versus sedentary. Sedentary $Opa1^{+/+}$ (n=17), $Opa1^{+/-}$ (n=16), trained $Opa1^{+/+}$ (n=19), and $Opa1^{+/-}$ (n=17).

Figure 5. Altered ultrastructure of trained *Opa1*$^{+/-}$ gastrocnemius muscle.

A. Control mice. Skeletal muscle shows normal mitochondria with abundant cristae, there is absence of ultrastructural changes inside mitochondria. Mitochondria are placed in their para-Z-disc distribution between the myofibrils, small arrow - triad.

B–F. $Opa1^{+/-}$ mice. **B:** The electron micrograph shows slightly dilated mitochondria, some mitochondria deprived of cristae (arrows); small arrow - triad. **C:** A slightly dilated mitochondrion with regression of cristae and signs of mitochondrial destruction (arrow). **D:** A vesicular swollen mitochondrion with remnants of matrix compartment (arrow). **E:** A giant subsarcolemmal mitochondrion showing fragmentation and disappearance of cristae (arrow). The loss of matrix in the mitochondrion is accompanied by the presence of irregular vacuoles (*). **F:** Unusually large mitochondria with remodelled morphology of cristae, outer mitochondrial membrane seems to be ruptured (arrows).

Figure 6. Increased fatty acid oxidation rates in trained fast skeletal muscles of *Opa1*$^{+/-}$ mice.

Respiration rates were measured in saponin permeabilized fibres of gastrocnemius and plantaris muscles. Fatty acid utilization rate with carnitine and palmitoyl-CoA is expressed relative to maximal respiration rate with FA, Pyruvate, Glutamate and Succinate. Significantly different: *, $^{\#}$, $^{\$}$P<0.05, **, $^{\#\#}$, $^{\$\$}$P<0.01. * $Opa1^{+/-}$ versus $Opa1^{+/+}$, $^{\#}$ active versus sedentary.

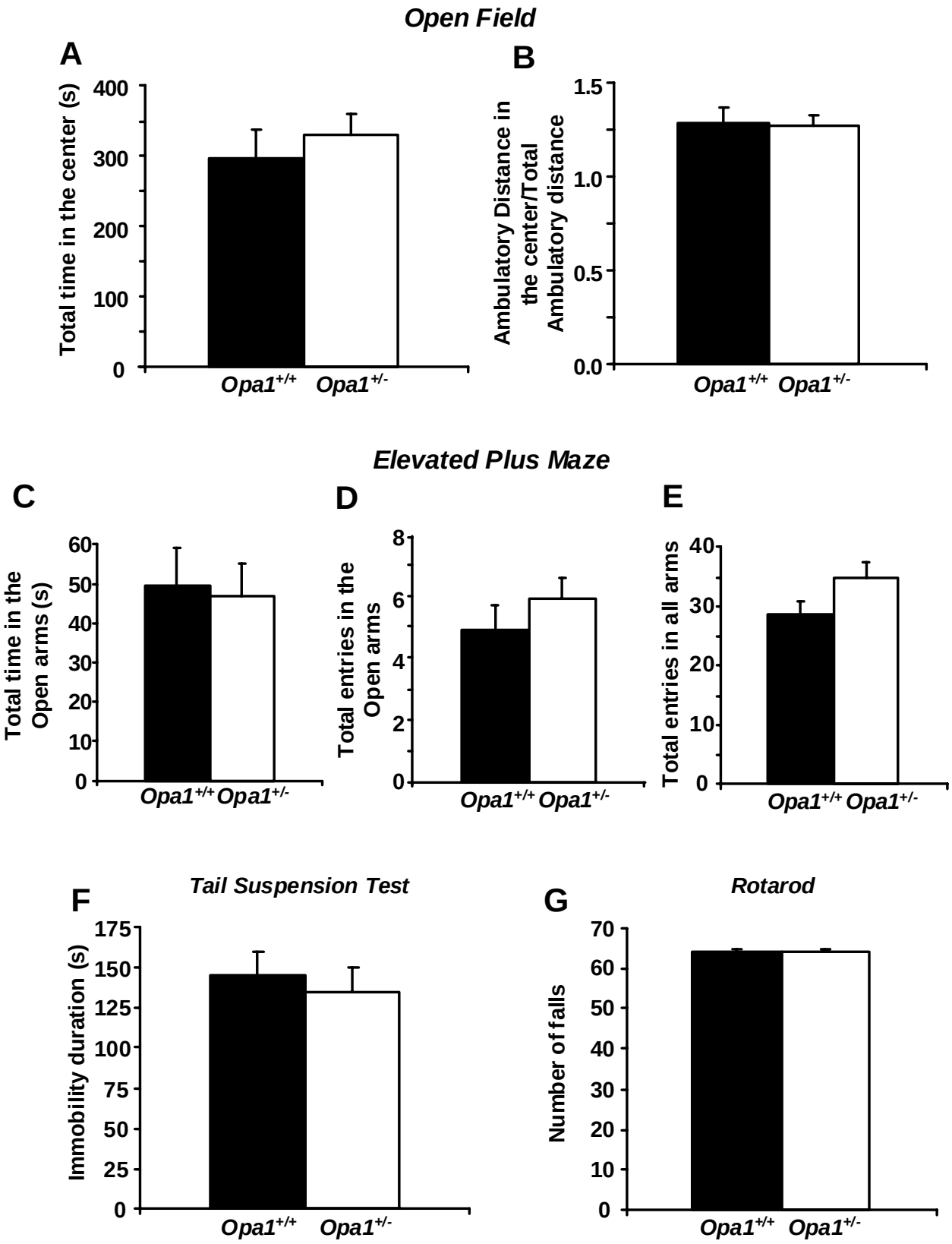

Open Field
A
Total time in the center (s)
400
300
200
100
0
Opa1+/+ Opa1+/-
B
Ambulatory Distance in the center/Total Ambulatory distance
1.5
1.0
0.5
0.0
Opa1+/+ Opa1+/-
Elevated Plus Maze
C
Total time in the Open arms (s)
60
50
40
30
20
10
0
Opa1+/+ Opa1+/-
D
Total entries in the Open arms
8
6
4
2
0
Opa1+/+ Opa1+/-
E
Total entries in all arms
40
30
20
10
0
Opa1+/+ Opa1+/-
Tail Suspension Test
F
Immobility duration (s)
175
150
125
100
75
50
25
0
Opa1+/+ Opa1+/-
Rotarod
G
Number of falls
70
60
50
40
30
20
10
0
Opa1+/+ Opa1+/-

Figure 1

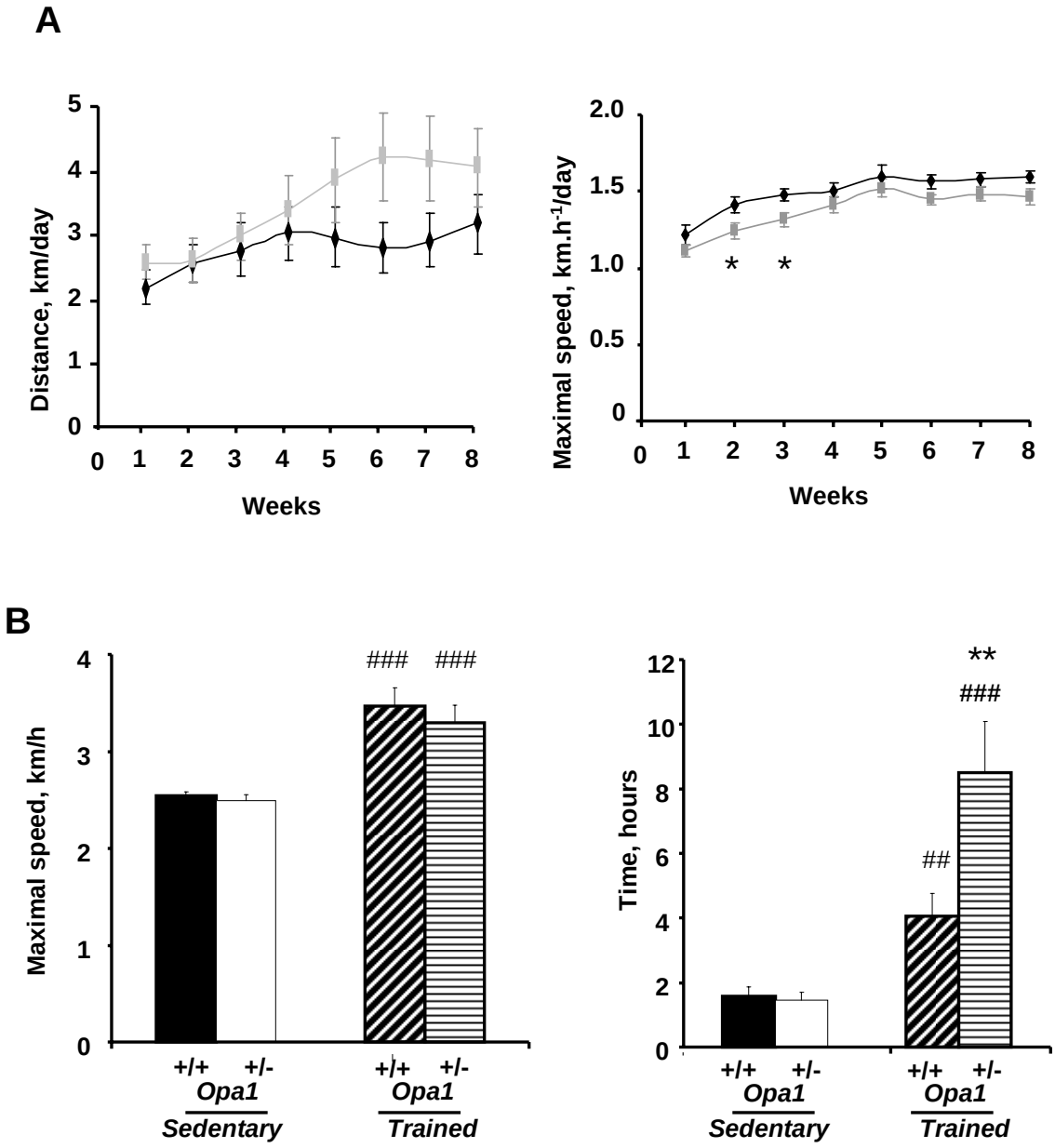

A
Distance, km/day
Weeks
Maximal speed, km.h-1/day
Weeks
B
Maximal speed, km/h
+/+ +/-
Opa1
Sedentary
+/+ +/-
Opa1
Trained
Time, hours
+/+ +/-
Opa1
Sedentary
+/+ +/-
Opa1
Trained

Figure 2

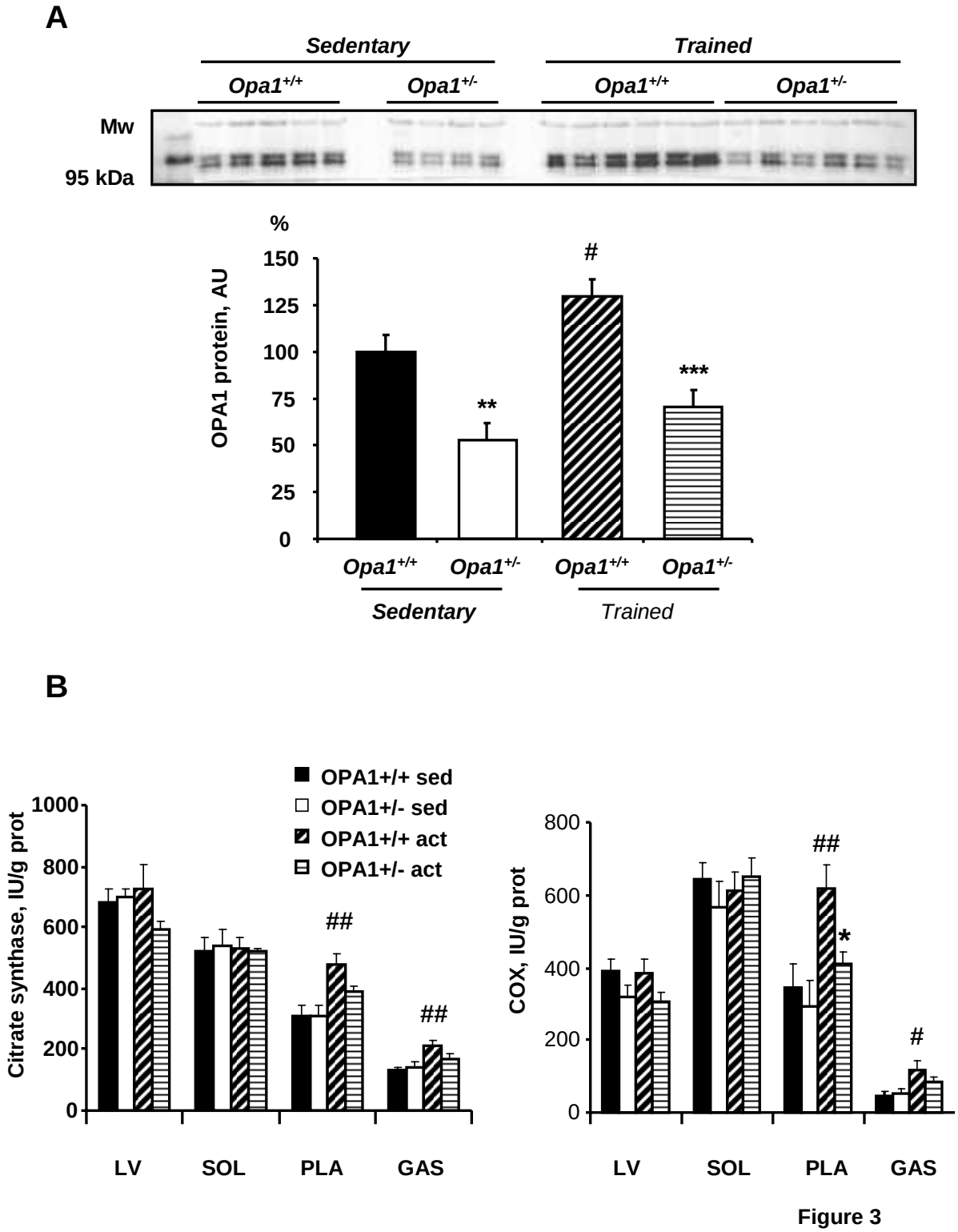

A
Sedentary
Trained
Opa1+/+
Opa1+/-
Opa1+/+
Opa1+/-
Mw
95 kDa
%
OPA1 protein, AU
150
125
100
75
50
25
0
#
**
***
Opa1+/+
Opa1+/-
Opa1+/+
Opa1+/-
Sedentary
Trained
B
OPA1+/+ sed
OPA1+/- sed
OPA1+/+ act
OPA1+/- act
Citrate synthase, IU/g prot
1000
800
600
400
200
0
##
##
LV
SOL
PLA
GAS
COX, IU/g prot
800
600
400
200
0
##
*
#
LV
SOL
PLA
GAS

Figure 3

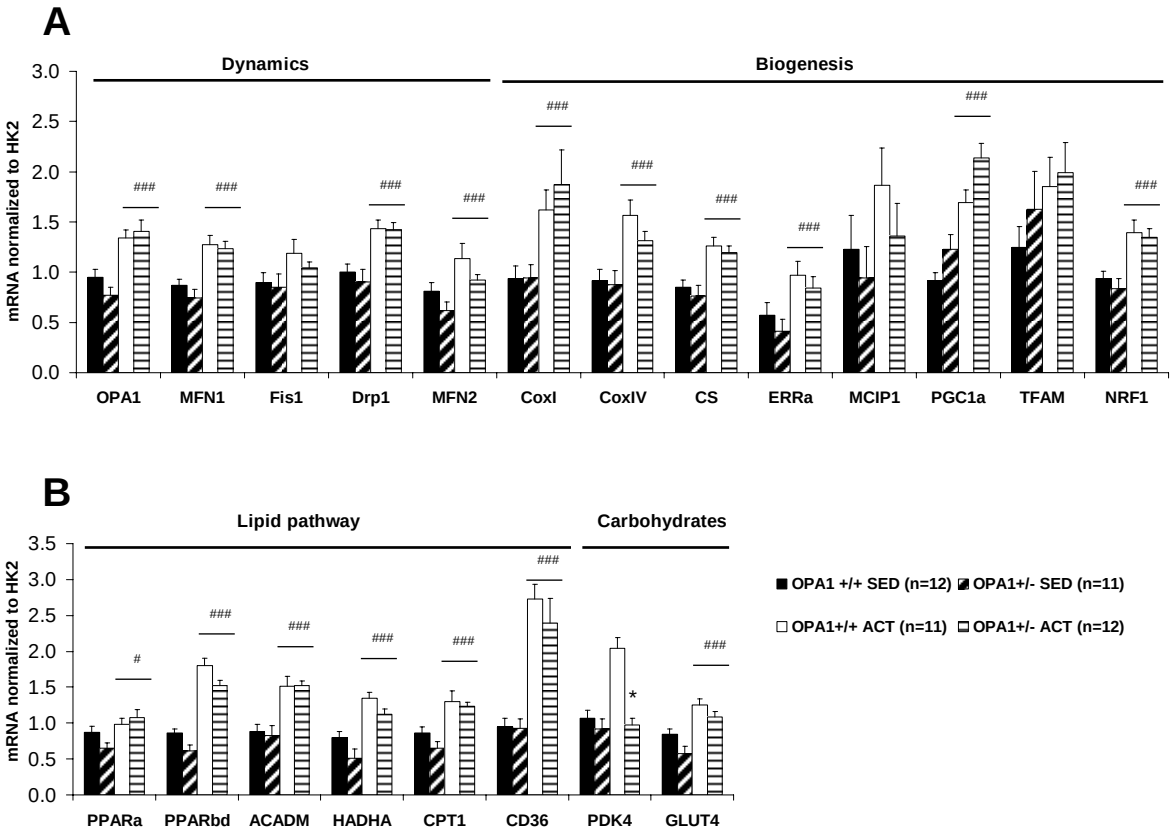

A
Dynamics
Biogenesis
mRNA normalized to HK2
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
###
OPA1
MFN1
Fis1
Drp1
MFN2
CoxI
CoxIV
CS
ERRa
MCIP1
PGC1a
TFAM
NRF1
B
Lipid pathway
Carbohydrates
3.5
#
*
PPARa
PPARbd
ACADM
HADHA
CPT1
CD36
PDK4
GLUT4
OPA1 +/+ SED (n=12)
OPA1+/- SED (n=11)
OPA1+/+ ACT (n=11)
OPA1+/- ACT (n=12)

Figure 4

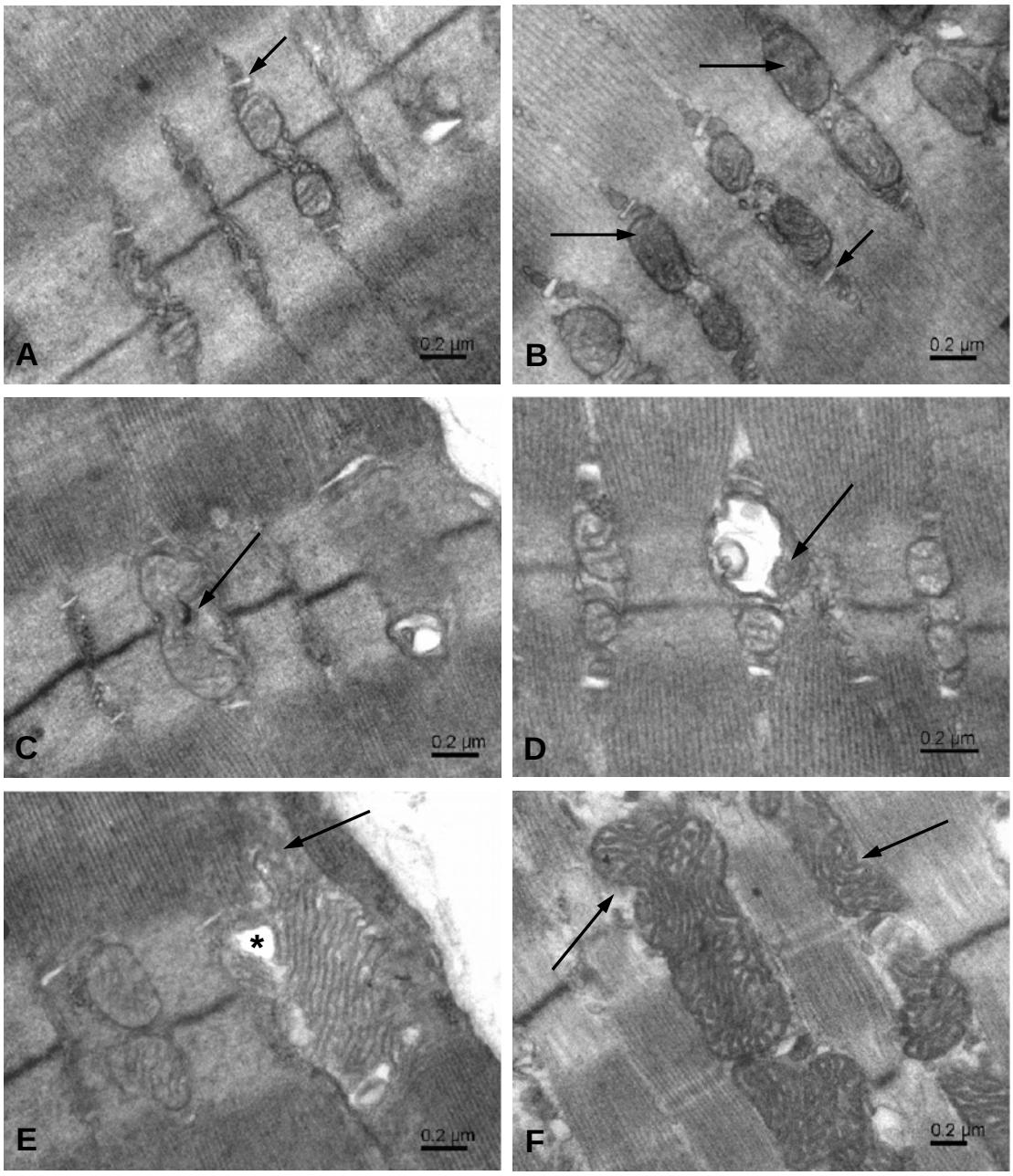


Figure 5

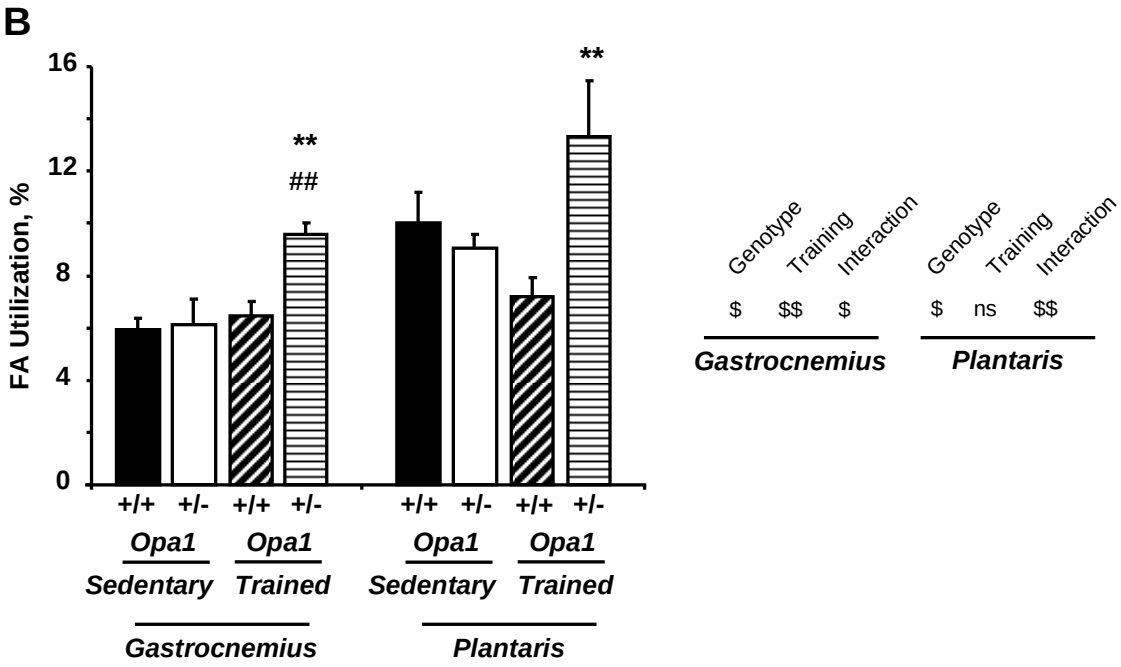

B
FA Utilization, %
16
12
8
4
0
**
##
**
+/+ +/- +/+ +/-
+/+ +/- +/+ +/-
Opa1
Opa1
Opa1
Opa1
Sedentary
Trained
Sedentary
Trained
Gastrocnemius
Plantaris
Genotype
Training
Interaction
$ $$ $
Gastrocnemius
Genotype
Training
Interaction
$ ns $$
Plantaris

Figure 6

Discussion générale & Perspectives

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Le but de ce travail était de déterminer, dans les cellules musculaires striées, l'impact du déficit en expression de la protéine OPA1 sur la morphologie et les fonctions mitochondriales (capacités oxydatives, métabolisme, fonction du pore de transition de perméabilité, …), les transferts énergétiques, ainsi que dans la réponse à un stress physiologique ou pathologique. Pour cela, nous avons étudié deux muscles striés, le myocarde et le muscle squelettique, qui, de par leur fonction respective, disposent d'une organisation différentiée de leur réseau mitochondrial, et de capacités d'adaptation spécifiques, notamment en réponse à un stress chronique, qui sont liées à une induction différente de la biogénèse mitochondriale.

Les résultats obtenus dans nos deux études peuvent donc se résumer en trois grands axes 1) les conséquences, sur la morphologie mitochondriale, de la délétion de la protéine OPA1, 2) l'impact de cette délétion sur la fonction mitochondriale et sur les transferts énergétiques, et 3) les conséquences de ces altérations sur les capacités d'adaptation à un stress chronique et sur la biogénèse mitochondriale.

Chapitre I : CHOIX DU MODELE ANIMAL ET DES STRESS UTILISES

Pour mener à bien les différents objectifs de ce travail, il a été nécessaire de faire certains choix sur le modèle d'étude et sur les stress appliqués à ces animaux.

1. *Modèle d'étude : les souris Opa1$^{+/-}$*

Il a été montré chez l'homme, comme chez la souris, que les mutations d'OPA1 pouvaient affecter d'autres organes en dehors de la rétine (pour revue (Landes *et al.*, 2010b)). Bien qu'aucune atteinte cardiaque n'ait à ce jour été rapportée chez les patients ADOA-1, il n'était pas improbable que le déficit en OPA1 puisse avoir des conséquences sur ce tissu riche en mitochondries et donc en protéines de la dynamique mitochondriale.

L'étude physiologique du rôle d'une protéine, dans notre cas OPA1, condamnait l'utilisation de lignées cellulaires au bénéfice d'un modèle animal (murin).

De plus, l'utilisation du modèle animal offre comme avantage de pouvoir étudier la protéine dans son environnement réel, et permet de faire des études plus poussées sur les mécanismes impliqués. Ce choix du modèle d'étude est important, car des résultats très différents peuvent être obtenus sur des modèles cellulaires trop simples ne possédant pas le phénotype des cellules que nous souhaitons étudier. Les cellules cardiaques et musculaires adultes étant très différentiées et hautement organisées, elles ne peuvent pas être simplement mimées par des cellules en culture. Une illustration de cela est l'apparition de « grandes mitochondries» dans les cellules cardiaques adultes des souris Opa1$^{+/-}$, alors que sur cellules en culture, de nombreux travaux ont montré que la délétion d'*Opa1*$^{+/-}$ induisait plutôt un fractionnement du réseau mitochondrial (Olichon *et al.*, 2003).

Pour étudier le rôle d'OPA1 dans les cellules cardiaques et musculaires, il a donc fallu travailler, comme cela est souvent le cas en physiologie, sur des souris transgéniques.

Actuellement, deux modèles murins ont été utilisés dans la littérature, celui de l'équipe du Dr Davies (Davies *et al.*, 2007), et celui du Dr Alavi (Alavi *et al.*, 2007). Les deux modèles murins disposent d'une altération dans le domaine GTPasique conduisant respectivement à une protéine OPA1 tronquée ou à un déficit en protéine OPA1. Le modèle de l'équipe de Davie dispose d'une mutation non-sens hétérozygote dans l'exon 8 codant pour une transition C-T à la 1051pb, tandis que le modèle de l'équipe d'Alavi présente une mutation non-sens hétérozygote dans l'intron 10 (c.1065+5 G→A). Les deux modèles aboutissent dans les souris *Opa1*$^{+/-}$ à une diminution de 50% de la protéine OPA1 et sont donc tous deux des modèles d'haplo-insuffisance. Ces deux modèles se revendiquent comme mimant les mutations identifiées dans les patients ADOA-1 étudiés par léquipe de Pesch (Pesch *et al.*, 2001).

Le modèle utilisé dans notre cas correspond à la lignée du Dr Alavi qui a l'avantage d'être pertinent pour mimer la pathologie humaine, car à partir de l'âge de 10 mois, les souris développent entre autre une cécité. Afin d'éviter les effets secondaires liés à la perte de vision des animaux *Opa1*$^{+/-}$, nous avons choisi de conduire l'ensemble des tests sur des animaux ayant au maximum 8 mois.

En outre, par soucis d'éthique, nous avons essayé d'avoir recours au plus petit nombre d'individus pour la mise en place des tests, même si pour nos études, nous avons du utiliser un nombre important d'animaux. Se poser ces questions d'éthique est important, mais cela ne doit pas se faire au détriment de la relevance des résultats.

2. Choix des stress chroniques

Pour étudier les capacités d'adaptation des cellules musculaires striées de nos souris, nous avons utilisé différents stress physiologique et pathologique.

2.1-Stress physiologique répété

Pour déterminer le rôle d'OPA1 dans l'activation de la biogénèse mitochondriale, nous avons soumis notre modèle murin à un entraînement physique. On considère en général que quatre semaines d'entraînement au minimum sont nécessaires pour induire efficacement la biogénèse mitochondriale (Hood, 2001). Au laboratoire, nous avions utilisé par le passé des entraînements de huit semaines (Momken *et al.*, 2005; Momken *et al.*, 2004). Nous avons donc décidé de conserver ce type d'entraînement pour notre étude. De plus, de par l'historique du laboratoire, nous avons choisi un entraînement basé sur le volontariat, qui présente l'avantage d'être non stressant pour les animaux et de respecter leur physiologie et leur rythme d'activité. Comparé à un entraînement forcé, l'entraînement volontaire présente cependant comme inconvénient majeur de provoquer une plus grande hétérogénéité de la charge de travail à l'entraînement (vitesse, durée, distance parcourue et fréquence d'activité). Il a d'ailleurs été nécessaire de multiplier le nombre d'animaux de façon importante afin d'affiner les résultats statistiques.

2.2-Stress pathologique chronique

Pour déterminer le rôle de la dynamique mitochondriale dans la plasticité mitochondriale nécessaire à l'adaptation cardiaque, nous avons également soumis notre modèle murin à une constriction de l'aorte. La constriction de l'aorte ascendante chez la souris est une méthode fréquemment utilisée pour induire une

hypertrophie pathologique concentrique par surcharge de pression, elle a pour avantage de permettre d'obtenir une hypertrophie reproductible (Bader, 2010; deAlmeida *et al.*, 2010) qui évolue vers l'insuffisance cardiaque.

L'étude de l'hypertrophie cardiaque pathologique nous a conditionné à porter l'ensemble des analyses uniquement sur des mâles et non sur des femelles, qui sont beaucoup plus résistantes au développement d'une hypertrophie de par leur protection hormonale (elles sont également plus endurantes à un entraînement physique).

Enfin, nous avons regardé le cœur de nos animaux quatre semaines après l'opération, ce qui est suffisant pour induire une hypertrophie sévère, avec des signes précoces d'insuffisance cardiaque.

Chapitre II : OPA1 ET MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES STRIEES

OPA1 ayant été montré comme participant à la fusion des membranes internes des mitochondries, mais aussi à l'organisation des crêtes, nous avons donc regardé dans un premier temps l'impact du déficit en OPA1 sur l'organisation et la morphologie des mitochondries. Ce travail de caractérisation a été effectué en détails sur le cardiomyocyte adulte, et dans une moindre mesure sur le muscle squelettique. Ces observations ont montré qu'une diminution de 50 % de la protéine OPA1 était suffisante pour induire des altérations importantes de la morphologie des mitochondries sur ces cellules. En effet, les fibres papillaires des souris *Opa1*$^{+/-}$ disposent d'une organisation intracellulaire altérée par la présence de nombreux amas mitochondriaux, avec des mitochondries qui sont en moyenne moins nombreuses mais plus volumineuses, même si les volumes mitochondrial et cellulaire totaux ne sont pas modifiés par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat peut sembler paradoxal dans la mesure où on s'attendait à l'apparition d'une fragmentation du réseau mitochondrial du fait de la diminution de la protéine de fusion OPA1. Cela va donc à l'encontre de nombreuses publications réalisées sur cellules en culture sur la perte de protéines de la fusion (MFN1, MFN2 et OPA1) qui conduisent invariablement à la fragmentation du réseau mitochondrial (Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Griparic *et al.*, 2007; Olichon *et al.*, 2003). Cependant la présence de grandes mitochondries avec une fusion des membranes externes et la présence de multiples matrices a été observée (Song *et al.*, 2009).

Lorsque l'on s'intéresse aux données obtenues sur le tissu cardiaque ou sur les fibroblastes de certains patients ADOA, les résultats sont plus contrastés. En effet, le groupe de Walsh a par exemple montré que la délétion conditionnelle de MFN2 dans le cœur provoquait une augmentation de la taille des mitochondries (Papanicolaou *et al.*, 2011), alors que celle de MFN1 induisait leur fragmentation (Papanicolaou *et al.*, 2012). De la même manière, chez les patients ADOA, en fonction du type de mutation, la fragmentation est parfois observée (Landes *et al.*, 2010b), parfois non (Agier *et al.*, 2012). En effet, aucune corrélation évidente n'a pu être établie entre le génotype et le phénotype (pour revue (Olichon *et al.*, 2006)).

Une hypothèse permettant de réconcilier nos données avec celles de la littérature peut donc être liée à la nature et au stade de développement du tissu étudié. La majorité des données antérieures a en effet été obtenue sur des cultures cellulaires, et par ailleurs dans des conditions où l'inhibition de l'expression des protéines ciblées était quasiment complète. Dans notre cas, l'étude a été réalisée sur les cardiomyocytes adultes qui disposent d'une organisation intracellulaire rigide et dense, limitant la mobilité mitochondriale, et dont l'expression de la protéine cible n'est réduite que de moitié. Par ailleurs, le groupe de Walsh a montré que sur des cardiomyocytes de nouveau-nés, la délétion de Mfn2, contrairement à l'adulte, induisait une fragmentation du réseau mitochondrial (Papanicolaou *et al.*, 2011).

L'analyse détaillée de la structure interne des mitochondries, que ce soit sur le cardiomyocyte adulte ou dans les muscles squelettiques, montre que chez les souris *Opa1*$^{+/-}$, les crêtes mitochondriales sont désorganisées comme attendu (Frezza *et al.*, 2006). Nous avons aussi observé la présence de mitochondries géantes fusionnées par leurs membranes externes uniquement, suggérant que le processus fusionnel était initié, mais bloqué ensuite à l'étape de la fusion des membranes internes dû à la perte d'OPA1. Cette hypothèse suggère l'existence d'une interdépendance forte entre les mécanismes de fusion des deux membranes mitochondriales. L'altération d'une des étapes peut donc altérer tout le cycle de fusion et de fission.

Ces différentes observations ont été obtenues par microscopie confocale et électronique, qui permettent d'étudier les mitochondries dans leur individualité, mais qui se trouvent être limitées pour étudier et quantifier leur organisation interne détaillée. Il serait donc intéressant, en perspective, d'utiliser la tomographie pour décrire de manière plus fine le rôle de la protéine OPA1 dans l'organisation des crêtes mitochondriales des cardiomyocytes et des cellules musculaires. En perspective également, et afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dynamique mitochondriale, il serait aussi intéressant d'avoir recours à un modèle inductible. En effet, dans notre cas, il nous est impossible de déterminer si la perturbation de la morphologie des mitochondries observée dans les cellules musculaires striées est la conséquence de la perturbation des phénomènes dynamiques à un stade de développemental précoce, et si les phénomènes

observés sont le résultat d'adaptations et de compensations lors du développement. Cependant, il semblerait que cela ne soit pas complètement le cas, car l'équipe de Dorn a montré que le double KO MFN1/MFN2, qui est létal au stade embryonnaire, induit également à moyen terme une cardiomyopathie létale dans un modèle inductible (Chen *et al.*, 2011).

En conclusion de ce chapitre, nous avons donc bien une altération de la morphologie du réseau mitochondrial chez les muscles cardiaques et squelettiques des souris Opa1$^{+/-}$. Il est difficile pour le moment de savoir si ces altérations sont dues à la fonction de dynamine de la protéine OPA1 ou à d'autres de ses fonctions. Dans tous les cas, ces altérations morphologiques des mitochondries peuvent être la cause de nombreuses autres altérations que nous présentons dans les chapitres suivants, et posent ainsi la question du lien entre morphologie et fonction mitochondriale.

Chapitre III : OPA1, FONCTIONS MITOCHONDRIALES ET TRANSFERTS ENERGETIQUES

Une des questions importantes de mon travail de thèse concernait l'étude de l'impact de la délétion d'OPA1 sur la fonction mitochondriale, et plus généralement sur l'énergétique de la cellule cardiaque et musculaire. Dans un second temps, j'ai donc regardé, sur les souris *Opa1*$^{+/-}$, l'état des capacités oxydatives des mitochondries, du métabolisme et de l'utilisation des acide gras, des transferts énergétiques entre organites, mais également quel pouvait être l'impact de la perte d'OPA1 dans la mort cellulaire via l'étude de la fonction du pore de transition de perméabilité.

1. *Capacités oxydatives*

Dans notre modèle murin, nous avons pu montrer que le déficit d'expression de la protéine OPA1 avait peu de conséquences sur les propriétés oxydatives des mitochondries des cardiomyocytes et des cellules des muscles squelettiques, que ce soit sur le plan des capacités respiratoires, le couplage entre oxydation et phosphorylation et celui entre la phosphorylation oxydative et la mi-CK qui ne montrent pas de différence notable.

De par sa localisation, OPA1 aurait pu en principe influencer le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire. Mais l'ensemble des résultats obtenus sur les capacités oxydatives des cellules de patients sont assez disparates. Il semblerait que cela dépende du type cellulaire analysé et de la mutation rencontrée (Agier *et al.*, 2012; Zanna *et al.*, 2008). Nos résultats se rapprochent des observations faites sur les leucocytes de patients d'ADOA-1, qui, comme les souris *Opa1*$^{+/-}$, ne présentent pas d'altération de la fonction mitochondriale (Mayorov 2008). Par contre, dans le second modèle de souris *Opa1*$^{+/-}$ présentant un autre type de mutation (Davies), les capacités oxydatives des mitochondries de cœur sont relativement préservées à trois mois mais sont altérées à un âge plus tardif (12 mois) suggérant un effet sur le vieillissement (Chen *et al.*, 2012). On ne peut pas exclure qu'en dehors de l'architecture du cardiomyocyte adulte qui joue assurément un rôle, d'autres propriétés liées à la fonction même

d'OPA1 ou de sa structure puissent influencer le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Une autre question concernait le lien qui pourrait exister entre morphologie mitochondriale et fonctionnement de la chaîne respiratoire. Là encore, il est difficile de trancher. Nous avons observé la présence de mitochondries plus grandes, avec des crêtes altérées dans notre modèle animal. Cependant, cela ne modifie pas les capacités oxydatives de ces mitochondries. D'autres études ont aussi montré cette absence de lien entre morphologie et fonctions mitochondriales (Papanicolaou *et al.*, 2011). Cependant, on considère en général que les mitochondries fractionnées ont une fonction altérée (Jheng *et al.*, 2012).

D'après nos résultats, on ne peut donc pas établir l'existence d'un lien clair entre l'architecture des mitochondries et leurs capacités oxydatives.

2. Métabolisme énergétique

Comme il a été introduit précédemment, les causes pathologiques proposées pour l'apparition des symptômes de la maladie ADOA-1 sont les multiples altérations mitochondriales, dont les désordres bioénergétiques.

2.1-Métabolisme de l'organisme

Les animaux *Opa1*$^{+/-}$ présentent une masse corporelle moindre à partir de l'âge de 6 mois (*Opa1*$^{+/+}$ n=24; 30,8±0,5g et *Opa1*$^{+/-}$ n=14 ; 29,2±0,6g). Cette différence de masse corporelle s'accentue avec le temps, alors que les animaux ingèrent la même quantité de nourriture (Alavi *et al.*, 2007). Ces observations se rapprochent de celles effectuées dans un modèle déficient en OMA1, provoquant un défaut de clivage d'OPA1 (Quiros *et al.*, 2012). Les auteurs de cet article ont émis l'hypothèse que la différence de poids pourrait être due au fait que ces animaux développent une hyperthermie nocturne. Pour vérifier si nos animaux souffraient du même problème, des mesures préliminaires ont été effectuées. Malheureusement, pour cause de limitations technique et temporelle, seule la température corporelle en journée (à 12h00) a été relevée sur des animaux de 6 mois (*Opa1*$^{+/+}$ n=15; *Opa1*$^{+/-}$ n=13). Ces animaux présentent respectivement une température de 29,0±0.5°C et

28,9±0.4°C, confirmant l'absence de différence dans la journée entre les deux génotypes comme dans l'article de (Davies *et al.*, 2007), rendant l'absence de résultat nocturne d'autant plus frustrant.

Les autres résultats qui tendent à exclure l'hypothèse de désordres métaboliques majeurs liés à la perte généralisée d'OPA1 dans notre modèle sont ceux obtenus sur une petite dizaine d'animaux de 6 mois. Les dosages sanguins de la glycémie, du cholésterol total et des triglycérides circulants n'ont révélé aucune différence. De même, les tests effectués sur des animaux de 3 mois, en collaboration avec une équipe lyonnaise (équipe de Jeniffer Rieusset), ont révélé que les souris *Opa1*$^{+/-}$ disposaient d'une résistance glycémique et insulinique similaire aux souris contrôles, ne montrant donc pas de lien clair entre métabolisme et OPA1 (résultats non montrés).

Très peu d'études ont été menées sur l'éventuel lien entre OPA1 et le métabolisme cellulaire. La seule étude qui s'y est intéressée est celle menée sur son rôle dans les adipocytes (Pidoux *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs proposent une nouvelle fonction d'OPA1, en tant que protéine d'ancrage de la protéine Kinase A, qui interviendrait dans la régulation adrénergique de la lipolyse, mais pas dans l'accumulation des gouttelettes lipidiques.

2.2-Métabolisme mitochondrial

L'étude menée sur nos souris *Opa1*$^{+/-}$ n'a pas révélé de modification majeure du métabolisme cardiaque et musculaire au niveau transcriptionnel. À l'état basal, le cœur aurait tendance à moins utiliser les acides gras, tandis que les muscles squelettiques ne présentent pas de modification significative de leurs capacités oxydatives. Suite à un entraînement, les différents résultats obtenus dans les muscles squelettiques (gastrocnémien et plantaire) suggèrent un remodelage métabolique vers l'utilisation des acides gras, uniquement dans les souris *Opa1*$^{+/-}$ entraînées. Seuls les muscles disposant d'une plus grande plasticité présentent des modifications apparentes du métabolisme.

En perspective, il serait donc intéressant de valider ou invalider l'hypothèse que le changement de métabolisme ne se développe pas dans les muscles les plus oxydatifs (soléaire et ventricule gauche) suite à un effort modéré. Il serait également intéressant de déterminer si la protéine OPA1 peut moduler d'une manière ou d'une autre l'utilisation des substrats par les mitochondries, soit par une intervention directe avec les protéines intervenant dans le métabolisme des acides gras (transporteurs CPT-I et/ou CPT-II), soit par le remodelage de l'espace intermembranaire de par l'absence d'OPA1. L'identification des éventuels partenaires de la protéine OPA1 permetterait de mieux comprendre si OPA1 intervient directement dans les voies de signalisation du métabolisme.

3. ***Mort cellulaire et déficit d'OPA1***

L'une des autres causes de développement pathogénique des cas d'ADOA-1 est une sensibilité accrue à la voie mitochondriale de l'apoptose. Nous nous sommes donc intéressés en particulier au rôle d'OPA1 dans la fonction du pore de transition de perméabilité (PTP).

3.1-*Fonctions du pore de transition de perméabilité (PTP)*

Nous avons pu établir la présence d'un lien entre le déficit en OPA1 et des modifications de la fonction du PTP, tels que le développement d'une résistance à l'ouverture du PTP et une augmentation des capacités de rétention calcique des mitochondries des souris *Opa1*$^{+/-}$. Pour comprendre ces résultats, deux axes ont été amorcés au laboratoire, visant à déterminer s'ils étaient dus à un effet indirect lié à des modifications architecturales et morphologiques des mitochondries, ou bien à une action directe de la protéine OPA1.

3.1.a-Capacité de rétention calcique et morphologie mitochondriale

La première hypothèse est que la modification des propriétés d'ouverture du PTP soit simplement due à la morphologie particulière des mitochondries. Cela reviendrait à formuler que cette augmentation des capacités de capture du calcium serait due au volume plus grand des mitochondries.

Pour démontrer cette hypothèse, des expériences préliminaires ont été réalisées avec la molécule Mdivi-1 (*Mitochondrial division inhibitor-1*) permettant de recréer artificiellement des mitochondries plus grosses à partir de mitochondries saines. En effet, Mdivi-1 est un inhibiteur sélectif de la division mitochondriale chez la levure et les cellules de mammifères, en inhibant la dynamine DNML1/DRP1. Le volume mitochondrial ainsi altéré et artificiellement rallongé, sans être du à un processus de gonflement, contiendrait une quantité d'OPA1 identique aux cellules contrôles. Cependant, le problème majeur de ce protocole est que Mdivi-1 inhibe également l'apoptose en inhibant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Il nous faut donc trouver un autre inhibiteur de la fission mitochondriale.

Une autre alternative, pour montrer le lien entre la taille des mitochondries et les capacités de rétention de calcium serait de fractionner les grosses mitochondries altérées des cellules *Opa1*$^{+/-}$, et ensuite effectuer le même protocole d'étude sur ces mitochondries disposant d'un volume mitochondrial similaire aux cellules contrôles.

3.1.b-Intervention directe d'OPA1 sur le PTP

La seconde hypothèse est que la protéine OPA1 pourrait, au niveau moléculaire, interagir plus ou moins directement avec les composants ou les régulateurs du PTP pour moduler son activité.

Sachant que l'élaboration du PTP est un phénomène transitoire et dont la nature des composants et des régulateurs est vivement débattue dans la communauté scientifique, ceci complique doublement notre ambition. Cependant, la protéine OPA1 est non seulement enchâssée dans la membrane interne de la mitochondrie, mais peut aussi interagir avec des protéines de la membrane externe (Landes *et al.*, 2010a; Satoh *et al.*, 2003)) offrant l'éventualité de son implication dans le recrutement des composants ou dans l'activité de ce pore.

Des expériences préliminaires afin de déterminer le protéome d'OPA1 ont été initiées afin de déterminer si la protéine OPA1 était capable d'interagir directement avec des composants ou régulateurs du PTP. Dans ce but, des expériences de cross-linking et d'immunoprécipitation (IP) ont été menées au laboratoire.

Afin de s'assurer que les éventuels complexes moléculaires contenant OPA1 ne soient pas déstabilisés au cours des différentes étapes d'extraction des mitochondries, nous avons effectué un blocage de l'ensemble des interactions liant OPA1 à d'autres protéines à l'aide d'une technique de cross-linking (Hansen & Barklis, 1995). Cette technique est basée sur la fixation covalente des cystéines proches physiquement à l'aide de l'agent cross-linkant BMH (*Bis(maleimido)hexane*) qui ne crée de liaisons covalentes qu'entre les cystéines espacées de moins de 13Å, mais pas entre les molécules physiquement éloignées. Les premiers tests ont été encourageants et ont confirmé qu'OPA1 serait présent dans un méga complexe. Lorsque l'on met en contact 0,1 mM de mitochondries isolées et 20mM de BMH, en moins d'1h, la protéine OPA1 se retrouve bloquée dans un complexe de plus de 170kDa. Il pourrait s'agir de protéines OPA1 organisées en homomères, hétéromères ou dans un complexe multi-protéique.

Afin d'identifier les protéines contenues dans ces complexes protéiques, une étape d'IP de la protéine OPA1 à l'aide d'un anticorps spécifique est obligatoire. Malheureusement, les premiers essais d'IP suivi d'analyse par spectrophotométrie de masse n'ont pas abouti à des résultats concluants. Ce travail mériterait d'être poursuivi.

3.2-Implication des EROS

Certains modèles d'invertébrés déficients en OPA1, tel que le nématode, présente une hypersensibilité au stress oxydatif sans une augmentation de la mort cellulaire (Kanazawa *et al.*, 2008). De même, dans la drosophile, cette déficience en OPA1 s'accompagne de nombreuses dysfonctions liées à une augmentation de la production de radicaux libres (EROS, Espèces réactives de l'oxygène) (Shahrestani *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent une possible implication du stress oxydatif dans la pathogénie ADOA-1 Ces drosophiles à la sensibilité exacerbée au stress oxydatif présentent également une espérance de vie limitée. OPA1 pourrait donc jouer un rôle dans les processus de vieillissement et dans l'espérance de vie. En effet dans une étude récente, l'équipe de Knowlton (Chen *et al.*, 2012) montre que leurs souris *Opa1*$^{+/-}$ présentent une augmentation du taux de ROS, et à l'âge de 12 mois une atrophie cardiaque associée à des défaillances hémodynamiques.

Nous ne pouvons confirmer cette hypothèse dans notre modèle. En effet, le stress oxydant estimé par oxyblot, par mesure du rapport aconitase/fumarase ou de l'expression des protéines anti-oxydantes n'est pas modifié dans le cœur. D'autre part, une série d'expériences a été menée pour déterminer si la déficience en OPA1 pouvait induire des effets sur le vieillissement des animaux. Nous avons observé que les souris *Opa1*$^{+/-}$ présentaient une réduction de 17% de la masse cardiaque par rapport aux souris contrôles à l'âge de 15 mois (*Opa1*$^{+/+}$ n=4; 115±10mg/cm et *Opa1*$^{+/-}$ n=8 ; 96±6mg/cm). Cependant, ces mêmes souris présentent également une réduction de 17% de la masse corporelle (*Opa1*$^{+/+}$ n=4; 21,2±1,7g/cm et *Opa1*$^{+/-}$ n=8 ; 17,5±0,4g/cm), ce qui démontre que leur masse cardiaque est proportionnelle à leur masse corporelle. Ces observations ont été confirmées par des échocardiographies (*Opa1*$^{+/+}$ n=8, *Opa1*$^{+/-}$ n=12) qui ont révélé que l'ensemble des paramètres hémodynamiques entre les deux lignées de souris étaient similaires. Ces données, ajoutées à celles des fonctions mitochondriales, sont en accord avec la mesure d'une espérance de vie similaire entre les animaux. Il serait en effet difficilement imaginable que les souris puissent vivre normalement, et avoir une espérance de vie similaire aux souris contrôles avec des altérations majeures.

Une hypothèse pouvant expliquer l'ensemble des différences mesurées au cours du vieillissement entre notre modèle murin et celui de Le chen, résiderait dans la construction des modèles. Il serait intéressant de réaliser de plus amples études sur les mutations du domaine GTPasique et la sensibilité au stress oxydant, et ainsi déterminer si une région spécifique du domaine GTPasique serait porteuse d'une fonction en lien avec les EROS jusqu'alors inconnue. De plus, dans leur modèle le groupe de Knowlton observe une diminution massive du contenu en ADN_{mt}. Des expériences sur la stabilité de l'ADN_{mt} de notre modèle sont en cours, et sont nécessaires afin de mieux comparer les modèles.

3.3-Dynamique mitochondriale et apoptose

Dans nos souris *Opa1*$^{+/-}$*,* nous avons pu établir que les mitochondries de cœur développaient un mécanisme de protection du PTP qui en principe les rendrait moins sensibles à l'apoptose. Cela pourrait être dû à la présence de plus grandes mitochondries qui semblent protéger les cellules de l'apoptose (Frank *et al.*, 2001;

Sugioka *et al.*, 2004). Cette observation est à coréler avec celles de Papanicolaou (Papanicolaou *et al.*, 2011), qui montrent que la déficience en MFN2 conduit à l'apparition de mitochondries plus grosses et avec une ouverture du PTP retardé. Toutefois, il ne peut être établi un lien entre la fonction du PTP et la morphologie mitochondriale, car dans d'autres études, le réseau mitochondrial fragmenté est associé à une protection contre la dépolarisation (Papanicolaou *et al.*, 2012) ou à une hypersensibilité à l'apoptose (Chen *et al.*, 2009).

La présence d'un lien entre le déficit en OPA1 et une résistance à l'apoptose est confortée par des études récentes qui ont montré qu'OPA1 intervenait dans la régulation de l'apoptose par le contrôle du cytochrome c via la modulation des crêtes mitochondriales (Frezza *et al.*, 2006).

En conditions physiologiques, les phénomènes d'apoptose dans le cœur adulte sont très peu nombreux (1 à 2 noyaux apoptotiques pour 10^5 noyaux analysés (Wencker *et al.*, 2003). On peut se demander dans ces conditions comment une altération des capacités de rétention de calcium des mitochondries et/ou du PTP pourrait altérer la fonction du cœur. Le groupe de Molkentin a montré, en utilisant un modèle Ppif$^{-/-}$, que l'ouverture transistoire du PTP pourrait avoir un rôle physiologique en conditions normales, et qu'en son absence, l'accumation de calcium pourrait mener à un remodelage métabolique délétère lorsque le cœur est soumis à une surchage de travail (Elrod *et al.*, 2010). L'altération du PTP dans notre modèle de souris pourrait donc en partie expliquer les résultats des TACs. D'autant qu'une simple augmentation du taux apoptotique à 23 noyaux pour 10^5 est suffisante pour induire une cardiomyopathie dilatée létale (Wencker *et al.*, 2003).

Pour compléter ce travail, il serait nécessaire de faire une étude plus complète de la sensibilité du PTP au calcium, mais aussi aux EROs, et de mesurer différents signaux liés à l'apoptose. Des limitations techniques ont ralenti la mise en place du protocole de mesure du taux de cellules apoptotiques des cardiomyocytes de nos souris *Opa1*$^{+/-}$. L'une des limitations majeures résidait dans l'accès à un système de cytométrie en flux disposant d'une canule suffisamment large pour laisser passer les cardiomyocytes sans provoquer une obstruction. Ce point ayant été résolu par une autre étudiante du laboratoire, il ne resterait plus qu'à appliquer ce nouveau protocole à notre projet.

4. Transferts énergétiques

Une autre question était de savoir quel pouvait être le rôle de l'architecture cellulaire, et en particulier de la morphologie mitochondriale, dans le maintien de l'efficacité des capacités de transferts énergétiques

L'étude des transferts énergétiques entre les mitochondries et les organites consommateurs d'énergie (au niveau du SERCA dans le réticulum sarcoplasmique ou de l'ATPase dans les myofilaments) a mis en évidence une diminution de l'efficacité de la canalisation directe vers les myofilaments chez les souris *Opa1*$^{+/-}$. Ceci est cohérent avec l'idée que ces transferts dépendent de l'architecture cellulaire (Kaasik *et al.*, 2001, Wilding *et al.,* 2006), et mitochondriale en particulier qui est altérée dans notre modèle animal. Dans le cas des interactions avec le RS, nous n'avons pas observé de différence d'efficacité des transferts énergétiques. Cela peut s'expliquer peut-être par le fait que l'interaction RS-mitochondrie est plus étroite et solide, et est donc moins sensible à des perturbations de l'architecture cellullaire. Cette hypothèse est soutenue par des observations faîtes par notre laboratoire dans le passé qui ont montré que les régulations locales des ATPases au voisinage des myofilaments étaient affectées plus sévèrement qu'au niveau du RS dans un modèle de perturbations de l'architecture comme l'insuffisance cardiaque (Joubert *et al.*, 2008). En outre, sachant que le RS se différencie à partir du réticulum endoplasmique (RE), il se pourrait également que l'interaction entre le RS et les mitochondries soit plus forte en raison d'un lien physique entre eux. Même si une telle relation n'a pas encore été établie, elle reste parfaitement plausible puisqu'il a été montré que les mitochondries pouvaient être liées au RE/RS par l'intermédiaire de MFN2 (de Brito & Scorrano, 2008).

On le voit, l'architecture cellulaire, et en particulier la morphologie des mitochondries, peut influencer l'énergétique cardiaque. Cependant, comme il a été proposé par A. Kaasik (Kaasik *et al.*, 2001), il existe une redondance entre le système CK et la canalisation directe. Le système CK n'étant pas altéré chez les souris *Opa1*$^{+/-}$, il permet d'assurer l'approvisionnement énergétique des ATPases des myofilaments, et donc de compenser les altérations de la canalisation directe. Cela explique probablement pourquoi peu d'altérations de la fonction basale sont observées chez nos souris. Par contre, lors d'une augmentation de travail, où quand

le cœur est soumis à un stress pathologique chronique, cette compensation peut ne plus être suffisante. L'altération de la canalisation directe peut alors mener à un déficit de l'apport d'énergie qui aboutirait à une pathologie plus sévère du tissu cardiaque.

En perspective, il serait intéressant de s'intéresser aux mécanismes de transferts énergétiques dans un autre type de cellule musculaire striée, tel que le muscle squelettique des souris *Opa1*$^{+/-}$. Tout comme le muscle cardiaque, ce muscle dispose d'une architecture cellulaire organisée et des systèmes énergétiques capables de s'adapter aux conditions énergétiques (Kaasik *et al.*, 2004). Cette étude permettrait ainsi de déterminer si ces cellules souffrent également ou non d'un défaut de canalisation directe entre les mitochondries et les myofilaments, et si oui, quel est l'impact de cette altération sur les capacités à l'exercice par exemple.

Chapitre IV : OPA1 ET REPONSE A UN STRESS CHRONIQUE

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'impact du déficit en OPA1 sur les capacités d'adaptation à un stimulus chronique physiologique ou pathologique. En particulier, nous nous sommes intéressés au lien pouvant exister entre la dynamique mitochondriale et le processus de biogénèse mitochondriale.

1. *Adaptation lors d'un entraînement en endurance*

1.1-OPA1 et capacité à l'entraînement

Comme introduit précédemment, le stimulus physiologique choisi pour étudier les capacités d'adaptation impliquant un remodelage métabolique fut l'entraînement d'endurance. Notre modèle murin présentant une mutation générale d'*Opa1*, il n'était pas impossible que son déficit induise des altérations des muscles squelettiques pouvant affecter les capacités à l'exercice et à l'entraînement des animaux *Opa1*$^{+/-}$. En effet, l'hypothèse d'une altération possible des muscles squelettiques en condition de stress est soutenue par des résultats observés chez les patients ADOA-1 tel qu'un défaut de resynthèse de la PCr après l'exercice (Lodi *et al.*, 2004; Lodi *et al.*, 2011), ainsi que les observations faites sur la drosophile *Opa1*$^{+/-}$ (Shahrestani *et al.*, 2009) présentant une réduction de ses capacités de fuite.

Nous n'avions aucun à priori sur les capacités à l'entraînement de nos souris. Seule une étude portant sur les capacités à l'exercice des souris *Opa1*$^{+/-}$ dans une roue avait été réalisée par l'équipe de VJ Davies sur des animaux de 6 et 12 mois (Davies *et al.*, 2007), et avait montré que l'activité volontaire des animaux *Opa1*$^{+/-}$, à partir de 12 mois, n'était plus dépendante du rythme circadien de par leur cécité. Dans notre modèle, sur des souris de 6-8 mois, nous avons observé qu'au cours de la 8ème semaine d'entraînement, les animaux *Opa1*$^{+/+}$ et *Opa1*$^{+/-}$ répartissaient leur activité spontanée quotidienne de la même manière au cours de la journée (*Opa1*$^{+/+}$ n=6; 100,0±0,02% de leur activité la nuit et *Opa1*$^{+/-}$ n=6 ; 99,7±0,16% de leur activité la nuit), confirmant que les souris *Opa1*$^{+/-}$ étaient dépendantes du rythme circadien, et donc ne semblaient pas être atteintes de troubles visuels au stade étudié.

En suivant les capacités à l'exercice de nos souris *Opa1*$^{+/-}$, nous avons montré, à notre grande surprise, que la réduction d'OPA1 n'influençait ni la capacité à l'exercice, ni à l'entraînement (distance totale parcourue), et qu'elle pouvait même légèrement améliorer ces paramètres. Parmi les facteurs pouvant influencer la capacité à l'exercice, le poids de l'animal et la lignée de son fond génétique peuvent jouer un rôle. Au bout des huit semaines d'entraînement, nous avons trouvé un poids corporel légèrement inférieur pour les souris *Opa1*$^{+/-}$ (*Opa1*$^{+/+}$ n=19; 32,5±0,9g et *Opa1*$^{+/-}$ n=17 ; 30,0±0,5g), ce qui pourrait expliquer la légère amélioration de leur performance à l'entraînement (*Opa1*$^{+/+}$ n=19; 3,2±0,5Km/jour et *Opa1*$^{+/-}$ n=17 ; 4,1±0,6Km/jour). Toutefois, si l'on compare cette performance physique à d'autres données de souris C57/Bl6 entraînées, on se rend compte que nos animaux contrôles ont des performances faibles. En effet, dans d'autres modèles murins entraînés volontairement en roue (Allen *et al.*, 2001; Danson *et al.*, 2004; Momken *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2004), la distance journalière moyenne effectuée se trouve entre 6,8 - 10,2km. Cette différence pourrait être expliquée par la différence d'âge, les trois premiers modèles ayant seulement quelques semaines (8-10) au début de l'entraînement. Mais cette supposition est mise à mal par les capacités d'entraînement du dernier modèle, les animaux entraînés ayant 9 mois. Malgré la faiblesse de l'entraînement comparé à d'autres modèles murins C57/Bl6, seul compte pour notre étude que les deux groupes d'animaux aient réalisé le même entrainement.

De même, nous avons pu confirmer que le type d'entraînement effectué n'influençait pas la masse corporelle des souris *Opa1*$^{+/+}$ (et *Opa1*$^{+/-}$) comme dans d'autres études (Allen *et al.*, 2001; Momken *et al.*, 2005). Par contre, nous avons observé, chez les souris *Opa1*$^{+/-}$ entraînées, une petite hypertrophie cardiaque, qui n'est pas présente chez les souris contrôles. Cette compensation cardiaque lors d'une déficience en OPA1 atteste qu'un entraînement, même modéré, est suffisant pour provoquer une adaptation hypertrophique plus sévère, comme nous l'avons observé suite à un stimulus pathologique. On peut expliquer cette différence de sensibilité du muscle cardiaque à l'effort par la présence du défaut de transfert énergétique entre mitochondries et myofilaments, ou par l'altération des propriétés d'ouverture du PTP, car comme nous l'avons indiquait dans notre premier article (Piquereau *et al.*, 2012). Une augmentation de la résistance des propriétés

d'ouverture du PTP peut être délétère sur le long terme. Enfin, un défaut de biogénèse mitochondriale lors de l'adaptation pourrait être aussi une explication (voir plus loin).

Nous avons également testé les capacités d'endurance des souris entraînées. De manière inattendue, ces tests ont révélé qu'après l'entraînement, les souris contrôles et les souris *Opa1*$^{+/-}$ pouvaient atteindre une vitesse maximale similaire, mais que le temps d'épuisement était deux fois plus élevé pour les souris *Opa1*$^{+/-}$, suggérant une stratégie d'adaptation différente. Les capacités à l'endurance dépendant principalement du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale, nous avons donc exploré ces éléments par la suite.

1.2-OPA1 et induction de la biogénèse mitochondriale

L'entraînement en endurance est l'un des inducteurs principaux de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique, tissu doué d'une haute plasticité. Le processus de biogenèse mitochondriale implique la transcription et la traduction coordonnées des protéines mitochondriales et nucléaires pour la mise en place correcte des processus moléculaires et morphologiques adaptatifs. De même, le remodelage morphologique mitochondrial nécessite le fonctionnement correct de la machinerie de fusion-fission des mitochondries.

Dans notre modèle murin, les voies de signalisation impliquées dans l'induction de la biogenèse mitochondriale (protéines mitochondriale, métabolisme des acides gras) sont stimulées de façon similaire dans le muscle squelettique rapide (gastrocnémien) des deux génotypes en réponse à l'entraînement physique. Le déficit en OPA1 n'a donc aucun impact sur la transcription des protéines impliquées dans la plasticité mitochondriale. Le travail effectué par les souris au cours des huit semaines (*Opa1*$^{+/+}$ n=19; 25,0±3,2 KJ et *Opa1*$^{+/-}$ n=17 ; 30,4 ± 4,0 KJ) ayant été similaire, les observations faites au niveau de la réponse cellulaire (transcription) sont en accord avec le stimulus reçu (entraînement). De même, l'expression accrue des protéines de la dynamique mitochondriale dans nos deux groupes d'animaux suite à un entraînement, montre bien que l'expression des protéines de la dynamique

est stimulée par un entraînement physique (Garnier *et al.*, 2005), et est liée à celle de la biogenèse mitochondriale.

Toutefois, les observations faites au niveau transcriptionnel ne sont pas confirmées au niveau des activités enzymatiques. En effet, l'entraînement physique induit chez les souris *Opa1*$^{+/+}$ une augmentation de plus de 50 % des activités enzymatiques de la CS et de la COX dans les muscles rapides, contrairement aux muscles lents comme attendu (Li *et al.*, 2011; Momken *et al.*, 2005), mais ces effets sont largement atténués chez souris *Opa1*$^{+/-}$. Cela suggère qu'en dépit d'une augmentation similaire des transcrits de la biogenèse mitochondriale, une étape post-transcriptionnelle se trouve être altérée chez les souris *Opa1*$^{+/-}$. Il serait donc intéressant de déterminer à quel niveau du processus protéique le déficit en OPA1 provoque ce blocage.

Plusieurs pistes sont à envisager. Le déficit en protéine de la dynamique mitochondriale pourrait avoir pour origine un défaut au niveau de la traduction, de la maturation, de la stabilité ou bien encore de l'import des protéines. OPA1 joue un rôle important dans le remodelage morphologique des mitochondries, et son altération peut conduire à des défauts de structure mitochondriale (Agier *et al.*, 2012; Olichon *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2009), ce que nous avons confirmé par les examens réalisés au microscope électronique dans le gastrocnémien de nos animaux entraînés. Les mitochondries étant de taille irrégulière et d'aspect endommagé, elles pourraient être incapables d'insérer correctement les protéines nouvellement synthétisés, ce qui induirait du même coup leur dégradation. Un défaut d'OPA1 et des altérations de la morphologie mitochondriale pourraient donc conduire à une diminution des protéines mitochondriales. Cela pourra être rapidement vérifié au laboratoire par la technique de western-blot.

Il est difficile de savoir si cette diminution possible des protéines mitochondriales proviendrait de l'augmentation de la dégradation protéique ou d'un défaut d'import des protéines. De même, le transport des protéines est un processus qui nécessite une conformation spatiale des membranes très précise, la moindre altération de l'organisation interne des mitochondries pourrait donc perturber l'import des protéines dans la mitochondrie (pour revue (Reichert & Neupert, 2002)). Les

protocoles actuellement mis en place au laboratoire ne permettent pas de répondre clairement à ces interrogations.

Enfin, une altération de la biogenèse mitochondriale au stade de fission pourrait induire des altérations morphologiques et des fuites de protéines qui seraient ensuite dégradées. De telles altérations ont en effet été observées en microscopie électronique.

Globalement, les observations faites chez les souris *Opa1*$^{+/-}$ suggèrent donc que leurs capacités d'adaptation à l'entraînement via les processus de biogenèse mitochondriale sont réduites, mais que ces animaux ont été capables de s'adapter grâce à une réponse spécifique impliquant notamment un remodelage métabolique.

1.3-OPA1, performance physique et remodelage métabolique

Comme nous l'avons rappelé, les capacités d'endurance sont liées à l'utilisation des acides gras. Il a été montré récemment que l'altération du transport des acides gras chez les souris KO CD36 était suffisante pour diminuer le temps d'endurance des souris, indépendamment de la biogenèse mitochondriale et du contenu mitochondrial (McFarlan *et al.*, 2012). En outre, on sait que l'activité chronique active le métabolisme oxydatif des fibres musculaires chez la souris, comme chez l'homme (pour revue, voir (Hood *et al.*, 2006, Smekal *et al.*, 2003; Tunstall *et al.,* 2002). Enfin, en fonction de l'intensité de l'activité, le taux d'oxydation des acides gras est favorisé au dépend de celui des hydrates de carbone.

Dans notre modèle murin, nous avons observé que l'entraînement modéré n'était pas suffisant pour induire une modification des capacités oxydatives (hydrates de carbone ou acides gras) du muscle squelettique rapide des souris *Opa1*$^{+/+}$, mais induisait une augmentation des capacités à oxyder les acides gras dans le muscle squelettique rapide des souris *Opa1*$^{+/-}$. Cette meilleure utilisation des acides gras est en accord avec notre observation précédente d'une augmentation du temps d'endurance des souris *Opa1*$^{+/-}$.

Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat : soit la protéine OPA1 intervient directement dans la régulation des acides gras, soit ce sont les conséquences de sa délétion qui sont responsables de ce remodelage. L'éventuelle

intervention directe de la protéine OPA1 semble être mise à mal par deux articles (Pidoux *et al.*, 2011; Quiros *et al.*, 2012) qui montrent que la protéine OPA1 favoriserait plutôt l'oxydation des acides gras. Ces observations vont donc à l'encontre de nos résultats sur les cellules musculaires. L'idée d'une modification de la régulation des transporteurs mitochondriaux des acides gras par exemple, de par leur localisation voisine de celle d'OPA1, apparait donc peu probable. Une autre possibilité serait que l'adaptation métabolique observée soit liée aux altérations de la morphologie des mitochondries. Mais cette idée est contre-intuitive, car en général, on considère plutôt qu'une mitochondrie à la morphologie altérée fonctionne moins efficacement au niveau énergétique (Benard *et al.*, 2007).

Le lien reliant la protéine OPA1 et le métabolisme est donc encore complexe et mal compris. Nous pouvons seulement suggérer que la déficience de la biogenèse mitochondriale chez nos souris *Opa1*$^{+/-}$ a été compensée par une meilleure utilisation des acides gras, et donc à une augmentation des performances d'endurance. Le groupe de Arend Bonen a montré l'importance du transporteur des acides gras CD36 et de sa localisation membranaire ou mitochondriale pour la détermination des capacités d'endurance chez la souris (McFarlan *et al.*, 2012). Nous avons observé une très forte induction transcriptionnelle de ce transporteur en réponse à l'entraînement dans les deux souches de souris. Il est possible que OPA1 puisse influencer la localisation mitochondriale de ce transporteur et ainsi modifier l'utilisation mitochondriale des acides gras et les capacités d'endurance. Il serait intéressant de mesurer la quantité de protéine CD36 et de déterminer sa localisation.

Une autre possibilité non explorée dans notre étude serait une activation plus importante de l'AMPK à l'exercice dans les souris OPA1+/- permettant une meilleure activation de l'utilisation des acides gras par l'inhibition de l'ACC.

De façon complémentaire, la capacité à l'endurance peut être influencée par la gestion musculaire du lactate, source de fatigue musculaire lors d'un exercice. L'entrainement physique permet en effet de diminuer le taux de lactate produit au cours de l'exercice, mais aussi d'améliorer son utilisation / élimination par l'organisme (Donovan & Pagliassotti, 2000; Holloszy & Coyle, 1984; Stallknecht *et al.*, 1998). Comme nos souris disposent de capacités à l'endurance différentes suite

à un entraînement, il serait intéressant de vérifier s'il existe une corrélation entre les capacités à l'endurance et le taux de lactate circulant chez nos deux souches de souris. Le lien entre le déficit en OPA1 et le taux de lactate circulant étant peu évident, la première vérification possible serait de déterminer l'activité des enzymes à l'origine de sa production, à savoir les différentes isoformes de la LDH. Dans le muscle squelettique, la répartition des isoenzymes apparaît différente selon le type de fibres, et les effets de l'entraînement apparaissent contradictoires et dépendent en particulier de la nature et de l'intensité des protocoles. Il semble que l'activité totale de la LDH diminue dans le muscle squelettique et augmente dans le cœur après un entraînement d'endurance. La répartition des isoenzymes est également affectée (élévation de H_4 dans le muscle et de M_4 dans le cœur) (Fréminet & Megas, 1993), une observation non confirmée chez les animaux C57/Bl6 ayant été entraînés dans l'étude de (Momken *et al.*, 2004), dans laquelle l'entraînement volontaire induit seulement une légère diminution de la proportion de l'isoforme LDH-M dans le gastrocnémien.

Il serait donc intéressant de déterminer comment la proportion des isoformes de LDH évolue dans notre modèle de souris entraîné, et ainsi déterminer si l'amélioration des capacités d'endurance provient également d'une utilisation complémentaire du lactate par les muscles squelettiques. Dans ce cas, ce processus de modification du métabolisme du lactate ne serait qu'une compensation complémentaire due à la déficience en OPA1.

2. Adaptation lors d'un stress pathologique

2.1-OPA1 et capacité d'adaptation

La réalisation de la sténose de l'aorte de nos animaux nous a permis de mieux comprendre le lien entre OPA1 et les capacités d'adaptation musculaire de nos animaux. En effet, nous avons montré dans notre première étude que lors de ce stress pathologique, nos souris *Opa1*$^{+/-}$ présentaient une sensibilité cardiaque augmentée à ce stress mécanique. Les animaux développaient une hypertrophie

cardiaque et pulmonaire plus sévère, ainsi qu'une fonction cardiaque (fraction de raccourcissement, volume de remplissage) plus fortement altérée.

Nous avons émis l'hypothèse que ce défaut d'adaptation cardiaque chez les souris *Opa1*$^{+/-}$ pouvait avoir de multiples causes, et en premier lieu être une conséquence de la modification de la morphologie et de l'organisation des mitochondries. En effet, ces altérations peuvent diminuer l'efficacité des transferts énergétiques, et ainsi avoir des conséquences néfastes sur les capacités d'adaptation à un stimulus chronique. Cette interprétation va dans le sens de résultats obtenus dans le passé au laboratoire (Joubert *et al.*, 2008; Wilding *et al.*, 2006) qui démontrent qu'en condition de stress chronique, les défauts de transferts énergétiques peuvent conduire à des effets délétères sur la fonction cardiaque. Cependant, même si nous avons observé ces altérations des transferts énergétiques dans notre modèle de souris suite à la TAC, nous n'avons par contre pas observé d'altérations plus importantes chez les souris *Opa1*$^{+/-}$ (résultats non montrés). Cette hypothèse n'est donc pas suffisante pour expliquer nos résultats.

Une altération plus importante des capacités oxydatives du cœur des souris *Opa1*$^{+/-}$ après la TAC pourrait aussi expliquer nos résultats. Cependant, là encore, nous n'avons pas observé de différence entre les deux groupes d'animaux (résultats non montrés).

Nous avons aussi proposé que la modification du fonctionnement du PTP et l'augmentation des capacités de rétention du calcium par les mitochondries pourraient à long terme être délétères comme cela a été suggéré par le groupe de Molkentin (Elrod *et al.*, 2010). Des expériences complémentaires de réponses à un stress chronique et/ou aigu en modulant le taux de calcium intramitochondrial seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

2.2-OPA1 et biogénèse mitochondriale

Une dernière hypothèse serait que les processus impliqués dans la biogénèse mitochondriale, qui doivent se mettre en place lors de l'hypertrophie cardiaque, seraient altérés du fait du manque d'OPA1, et donc conduiraient à une hypertrophie maladaptative plus rapidement. L'importance de cette biogénèse mitochondriale et son altération dans l'insuffisance cardiaque ont été démontrées par nous et d'autres laboratoires (pour revue, voir (Rimbaud *et al.*, 2009)). Dans nos souris, nous avons

observé une diminution des différents transcrits impliqués dans la biogénèse mitochondriale (PGC-1α, NRFs, DRP1, MFNs), comme cela a été montré dans le passé (Garnier *et al.*, 2003). Cependant, là encore, les diminutions sont les mêmes chez les souris contrôles et les souris *Opa1*$^{+/-}$. Mais comme les résultats sur les muscles squelettiques le suggèrent, cela ne signifie pas que l'ensemble du processus de biogénèse ne soit pas altéré, comme l'insertion et l'import des protéines ou que le processus ne soit retardé par les altérations de la fission des mitochondries. L'altération de la morphologie mitochondriale pourrait donc aussi perturber les processus de biogénèse et les capacités d'adaptation du cœur à un stress chronique.

Pour démontrer cette dernière hypothèse, il serait intéressant de suivre l'activation de la biogénèse mitochondriale lors du processus hypertrophique, par exemple en microscopie électronique. En effet, quelques jours après la sténose aortique, le processus de biogénèse mitochondriale est activé, notamment au niveau des mitochondries sous-sarcolemmales. Si notre hypothèse est correcte, on peut donc s'attendre à une altération de ces processus chez les souris *Opa1*$^{+/-}$, ce qui nous permettrait de montrer le lien entre dynamique mitochondriale, OPA1 et biogénèse mitochondriale.

Une autre façon de montrer ce lien serait de suivre, lors du développement postnatal, la mise en place du réseau mitochondrial chez le souris *Opa1*$^{+/-}$. On sait en effet que dans cette période, et en particulier entre 3 et 7 jours, un remodelage architectural important se produit (Piquereau *et al.*, 2010), ainsi qu'une biogénèse mitochondriale importante. La diminution des processus de fusion/fission due au manque d'OPA1 durant cette phase devrait modifier la cinétique de cette mise en place et des processus de biogénèse mitochondriale. Cependant, il nous est difficile de mettre en place un protocole réalisable pour étudier le cœur de ces animaux, la quantité de matériel à étudier par animal et la nécessité de génotyper les animaux très tôt étant les facteurs les plus limitants pour ce type d'analyse.

2.3-OPA1 et capacité d'adaptation à un stress aigu

Si les processus de fusion-fission mitochondriaux semblent impliqués dans l'adaptation à un stress pathologique chronique dans le cœur, des études récentes ont également suggéré qu'ils pourraient également jouer un rôle dans l'adaptation à

un stress pathologique aigu. En effet, l'équipe d'Hausenloy (Hausenloy *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2010) a montré que l'inhibition de la fission mitochondriale et l'inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité protégeaient le cœur contre l'ischémie. Comme les mitochondries des cardiomyocytes des souris *Opa1*$^{+/-}$ présentent une taille supérieure à la normal et que l'ouverture du pore de transition est ralentie, on pourrait s'attendre à ce que le déficit en protéine OPA1 soit protecteur lors de l'ischémie/reperfusion cardiaque. Les résultats obtenus suite à notre collaboration avec Michel Ovize (Lyon) ont malheureusement infirmé cette hypothèse, le cœur des souris *Opa1*$^{+/-}$ et *Opa1*$^{+/-}$ répondant de la même manière à ce stress aigu. La morphologie mitochondriale et la sensibilité du PTP au calcium ne semblent donc pas les seuls éléments nécessaires pour protéger le tissu cardiaque contre un stress ischémique.

En conclusion, à l'aide de notre modèle reproduisant l'une des mutations retrouvées chez les patients ADOA-1, nous avons pu confirmer que la déficience en OPA1 était liée à des perturbations de l'architecture du réseau mitochondrial dans le muscle cardiaque et squelettique. Ces mitochondries à la morphologie altérée ont certaines de leurs fonctions altérées (transfert énergétique avec les myofilaments, ouverture du PTP...), mais des capacités oxydatives intègres. Nos résultats se démarquent d'autre modèle animaux, mais sont en accord avec certaines observations effectuées chez les patients.

Au niveau fonctionnel, l'impact de la délétion d'OPA1 se trouve être compensé à l'état basal, mais dépassé lors du vieillissement (apparition de cécité et surdité précoce) ou lorsque les animaux sont soumis à un stress chronique (physiologique ou pathologique), mais pas aigu. Les observations faîtes sur le muscle cardiaque nécessitent donc d'être complétées pour mieux comprendre le rôle que pourrait avoir OPA1 dans ce tissu à l'organisation si particulière.

L'une des fonctions de la protéine OPA1 est le maintien de l'intégrité de l'ADN$_{mt}$. Or, l'entraînement physique permet une amélioration des capacités oxydatives des patients souffrant de déficit en ADNmt (Clark et al., 1997). Il serait donc envisageable, pour améliorer la qualité de vie des patients ADOA-1^{+}

avec myopathie, de les soumettre à un protocole d'entraînement, visant à lutter contre les effets secondaires de la perte de la protéine OPA1. N'ayant pas de recul sur les effets à long terme de l'entraînement sur nos animaux, nous ne pouvons anticiper les effets sur les patients.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

A

1. Agier V, Oliviero P, Laine J, L'Hermitte-Stead C, Girard S, Fillaut S, Jardel C, Bouillaud F, Bulteau AL & Lombes A (2012). Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1570-80.

2. Aijaz S, Erskine L, Jeffery G, Bhattacharya SS & Votruba M (2004). Developmental expression profile of the optic atrophy gene product: OPA1 is not localized exclusively in the mammalian retinal ganglion cell layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1667-73.

3. Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M & Alexander C (2008). Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* **106**, 372-83.

4. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS & Yan Z (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* **280**, 19587-93.

5. Akimoto T, Sorg BS & Yan Z (2004). Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C790-6.

6. Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J & Wissinger B (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* **130**, 1029-42.

7. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS & Wissinger B (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* **26**, 211-5.

8. Alirol E, James D, Huber D, Marchetto A, Vergani L, Martinou JC & Scorrano L (2006). The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* **17**, 4593-605.

9. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC & Leinwand LA (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* **90**, 1900-8.

10. Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, Ayuso C, Odent S, Arrouet C, Verny C, Calmels MN, Simard G, Belenguer P, Wang J, Puel JL, Hamel C, Malthiery Y, Bonneau D, Lenaers G & Reynier P (2005). OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* **58**, 958-63.

11. Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferre M, Guillet V, Gueguen N, Loiseau D, de Crescenzo MA, Verny C, Procaccio V, Lenaers G & Reynier P (2009). OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1855-65.

12. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martin MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D & Carelli V (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338-51.

13. Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH & Shaw JM (2008). Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol* **211**, 115-27.

14. Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J & Blackstone C (2005). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* **280**, 35742-50.

15. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ & Wackerhage H (2005). Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* **19**, 786-8.

16. Aure K, Fayet G, Leroy JP, Lacene E, Romero NB & Lombes A (2006). Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* **129**, 1249-59.

B

17. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP & Holloszy JO (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* **16**, 1879-86.

18. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M & Zorzano A (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* **278**, 17190-7.

19. Bader M (2010). Rat models of cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol* **597**, 403-14.

20. Bahi L, Koulmann N, Sanchez H, Momken I, Veksler V, Bigard AX & Ventura-Clapier R (2004). Does ACE inhibition enhance endurance performance and muscle energy metabolism in rats? *J Appl Physiol* **96**, 59-64.

21. Balaban RS (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* **258**, C377-89.

22. Ban T, Heymann JA, Song Z, Hinshaw JE & Chan DC (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* **19**, 2113-22.

23. Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitas K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC & Labeit S (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol* **153**, 413-27.

24. Barni S, Sciola L, Spano A & Pippia P (1996). Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* **71**, 66-70.

25. Belenguer P & Pellegrini L (2012). The dynamin GTPase OPA1: More than mitochondria? *Biochim Biophys Acta*

25. Bellance N, Lestienne P & Rossignol R (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci* **14**, 4015-34.

27. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T & Rossignol R (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* **120**, 838-48.

28. Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y & Saks V (2009). Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating Hl-1 cells. *J Bioenerg Biomembr* **41** , 195-214.

29. Bereiter-Hahn J (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* **122**, 1-63.

30. Bereiter-Hahn J & Voth M (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**, 198-219.

31. Berger J & Moller DE (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53**, 409-35.

32. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF & Shulman GI (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1340-6.

33. Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205.

34. Bo H, Zhang Y & Ji LL (2010). Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 121-8.

35. Bottinelli R & Reggiani C (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* **73**, 195-262.

36. Brooks C, Wei Q, Feng L, Dong G, Tao Y, Mei L, Xie ZJ & Dong Z (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11649-54.

37. Brooks GA (2002). Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans* **30**, 258-64.

38. Brown GC (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* **284 (Pt 1)**, 1-13.

39. Bruton A (2002). Muscle Plasticity : Response to training and detraining. *Physiotherapy* **88**, 398–408.

40. Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ & Kelly DP (2007). Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* **117**, 3930-9.

C

41. Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, Stevenson SC & Rangwala SM (2008). Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* **104**, 1304-12.

42. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA & Mootha VK (2006). Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* **38**, 576-82.

43. Carlsten A, Hallgren B, Jagenburg R, Svanborg A & Werko L (1961). Myocardial metabolism of glucose, lactic acid, amino acids and fatty acids in healthy human individuals at rest and at different work loads. *Scand J Clin Lab Invest* **13**, 418-28.

44. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A & Russell AP (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* **567**, 349-58.

45. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P & Scorrano L (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15803-8.

46. Chan DC (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 79-99.

47. Chen H, Chomyn A & Chan DC (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* **280**, 26185-92.

48. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE & Chan DC (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.

49. Chen H, McCaffery JM & Chan DC (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**, 548-62.

50. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM & Chan DC (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* **141**, 280-9.

51. Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, Li P, Qiu X, Wen S, Xiao RP & Tang J (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol* **6**, 872-83.

52. Chen L, Gong Q, Stice JP & Knowlton AA (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* **84**, 91-9.

53. Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, Cortopassi G, Chiamvimonvat N, Bers DM, Votruba M & Knowlton AA (2012). OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy: Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability. *J Am Heart Assoc.* **1**,

54. Chen Y, Liu Y & Dorn GW 2nd (2011). Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res* **109**, 1327-31.

55. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA, Verny C, Ferre M, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D & Reynier P (2008). Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* **63**, 794-8.

56. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z & Lipton SA (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* **324**, 102-5.

57. Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J & Frohman MA (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1255-62.

58. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15927-32.

59. Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L & De Strooper B (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163-75.

60. Clark KM, Bindoff LA, Lightowlers RN, Andrews RM, Griffiths PG, Johnson MA, Brierley EJ & Turnbull DM (1997). Reversal of a mitochondrial DNA defect in human skeletal muscle. *Nat Genet* **16**, 222-4.

61. Coleman R, Weiss A, Finkelbrand S & Silbermann M (1988). Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochem* **83**, 81-90.

62. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P & Bootman MD (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* **21**, 1616-27.

63. Cook SA, Matsui T, Li L & Rosenzweig A (2002). Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart. *J Biol Chem* **277**, 22528-33.

64. Cribbs JT & Strack S (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* **8**, 939-44.

D

65. Danson EJ, Mankia KS, Golding S, Dawson T, Everatt L, Cai S, Channon KM & Paterson DJ (2004). Impaired regulation of neuronal nitric oxide synthase and heart rate during exercise in mice lacking one nNOS allele. *J Physiol* **558**, 963-74.

66. Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME & Votruba M (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* **16**, 1307-18.

67. de Brito OM & Scorrano L (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-10.

68. De Sousa E, Lechene P, Fortin D, N'Guessan B, Belmadani S, Bigard X, Veksler V & Ventura-Clapier R (2002). Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc Res* **56**, 260-8.

69. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B & Ventura-Clapier R (1999). Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* **85**, 68-76 .

70. deAlmeida AC, van Oort RJ & Wehrens XH (2010). Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*

71. Degens H, de Brouwer KF, Gilde AJ, Lindhout M, Willemsen PH, Janssen BJ, van der Vusse GJ & van Bilsen M (2006). Cardiac fatty acid metabolism is preserved in the compensated hypertrophic rat heart. *Basic Res Cardiol* **101**, 17-26.

72. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P & Hamel CP (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* **109**, 584-91.

73. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J & Hamel CP (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-10.

74. Desagher S & Martinou JC (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-77.

75. DiMauro S, Bonilla E, Davidson M, Hirano M & Schon EA (1998). Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 199-210.

76. Donovan CM & Pagliassotti MJ (2000). Quantitative assessment of pathways for lactate disposal in skeletal muscle fiber types. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 772-7.

77. Duchen MR (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* **516 (Pt 1)**, 1-17.

78. Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B & Hen R (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1321-30.

79. Dulhunty AF, Haarmann CS, Green D, Laver DR, Board PG & Casarotto MG (2002). Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog Biophys Mol Biol* **79**, 45-75.

80. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W & Reichert AS (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* **281**, 37972-9.

81. Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T & Reichert AS (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* **18**, 3582-90.

82. Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC & Terzic A (2000). Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep* **2**, 212-7.

83. Dzeja PP & Terzic A (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* **206**, 2039-47.

84. Dzeja PP, Terzic A & Wieringa B (2004). Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 13-27.

E

85. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI & Langer T (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* **187**, 1023-36.

86. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C, Olichon A, Loiseau D, Reynier P, Chinnery PF, Rotig A, Carelli V, Hamel CP, Rugolo M & Lenaers G (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* **21**, 12-20.

87. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthievel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E & Molkentin JD (2010). Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* **120**, 3680-7.

88. Elvir-Mairena JR, Jovanovic A, Gomez LA, Alekseev AE & Terzic A (1996). Reversal of the ATP-liganded state of ATP-sensitive K+ channels by adenylate kinase activity. *J Biol Chem* **271**, 31903-8.

89. Eura Y, Ishihara N, Oka T & Mihara K (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* **119**, 4913-25.

F

90. Fabiato A (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**, C1-14.

91. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG & Gustafsson CM (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* **31**, 289-94.

92. Finck BN (2007). The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res* **73**, 269-77.

93. Fleischer S & Inui M (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling . *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**, 333-64.

94. Fluck M & Hoppeler H (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **146**, 159-216.

95. Forbes MS & Sperelakis N (1985). Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell* **17**, 605-48.

96. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL & Youle RJ (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515-25.

97. Fransson S, Ruusala A & Aspenstrom P (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 500-10.

98. Frey TG & Mannella CA (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**, 319-24.

99. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B & Scorrano L (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-89.

100. Fritz S, Rapaport D, Klanner E, Neupert W & Westermann B (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* **152**, 683-92.

101. Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T & Kabsch W (1996). Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* **381**, 341-5.

102. Frosig C, Jorgensen SB, Hardie DG, Richter EA & Wojtaszewski JF (2004). 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E411-7.

103. Fréminet A & Megas P (1993). Le métabolisme du lactate: données élémentaires et variations sur le thčme. *Science & Sports* **8**, 137–162.

104. Fukushima NH, Brisch E, Keegan BR, Bleazard W & Shaw JM (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* **12**, 2756-66.

G

105. Gandre-Babbe S & van der Bliek AM (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **19**, 2402-12.

106. Garedew A, Andreassi C & Moncada S (2012). Mitochondrial dynamics, biogenesis, and function are coordinated with the cell cycle by APC/C CDH1. *Cell Metab* **15**, 466-79.

107. Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V & Ventura-Clapier R (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **551**, 491-501.

108. Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B, Lampert E, Veksler V & Ventura-Clapier R (2005). Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J* **19**, 43-52.

109. Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, Geny B, Mettauer B, Veksler V & Ventura-Clapier R (2009). Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail* **2**, 342-50.

110. Gatenby RA & Gillies RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**, 891-9.

111. Germain M, Mathai JP, McBride HM & Shore GC (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* **24**, 1546-56.

112. Gincel D, Zaid H & Shoshan-Barmatz V (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* **358**, 147-55.

113. Gleyzer N, Vercauteren K & Scarpulla RC (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* **25**, 1354-66.

114. Goldenthal MJ, Weiss HR & Marin-Garcia J (2004). Bioenergetic remodeling of heart mitochondria by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem* **265**, 97-106.

115. Gomes AV, Potter JD & Szczesna-Cordary D (2002). The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* **54**, 323-33.

116. GORNALL AG, BARDAWILL CJ & DAVID MM (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**, 751-66.

117. Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I & Shimokawa T (2000). cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 350-4.

118. Gregorio CC, Weber A, Bondad M, Pennise CR & Fowler VM (1995). Requirement of pointed-end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. *Nature* **377**, 83-6.

119. Griparic L, Kanazawa T & van der Bliek AM (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* **178**, 757-64.

120. Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ & van der Bliek AM (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 18792-8.

121. Gros DB & Jongsma HJ (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* **18**, 719-30.

122. Guan K, Farh L, Marshall TK & Deschenes RJ (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet* **24**, 141-8.

123. Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, Belenguer P, Arnoult D & Rojo M (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* **100**, 315-25.

124. Guo X, Macleod GT, Wellington A, Hu F, Panchumarthi S, Schoenfield M, Marin L, Charlton MP, Atwood HL & Zinsmaier KE (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses. *Neuron* **47**, 379-93.

125. Guo YH, Chen K, Gao W, Li Q, Chen L, Wang GS & Tang J (2007). Overexpression of Mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoprotein induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 411-7.

H

126. Hackenbrock CR (1968). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol* **37**, 345-69.

127. Hales KG & Fuller MT (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121-9.

128. Halestrap AP & Price NT (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343 Pt 2**, 281-99.

129. Hansen MS & Barklis E (1995). Structural interactions between retroviral Gag proteins examined by cysteine cross-linking. *J Virol* **69**, 1150-9.

130. Hausenloy DJ, Duchen MR & Yellon DM (2003). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **60**, 617-25.

131. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S & van der Bliek AM (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* **187**, 959-66.

132. Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J & Shaw JM (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* **143**, 359-73.

133. Hock MB & Kralli A (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* **71**, 177-203.

134. Holloszy JO & Coyle EF (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* **56**, 831-8.

135. Holzer N, Ziltener JL & Menetrey J (2006). [Plasticity of striated skeletal muscle: training effect and perspectives]. *Rev Med Suisse* **2**, 1798-804.

136. Hom J & Sheu SS (2009a). Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 811-20.

137. Hom J & Sheu SS (2009b). Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 811-20.

138. Hood DA (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **90**, 1137-57.

139. Hood DA (2009). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 465-72.

140. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V & Joseph AM (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* **209**, 2265-75.

141. Hoppins S, Lackner L & Nunnari J (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 751-80.

142. Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF & Taylor RW (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* **131**, 329-37.

143. Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V & Kelly DP (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **24**, 9079-91.

I

144. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M & Yamaguchi I (2003). Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* **26**, 829-37.

145. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE & Nunnari J (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 1021-7.

146. Ingwall JS & Weiss RG (2004). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* **95**, 135-45.

147. Irrcher I, Adhihetty PJ, Sheehan T, Joseph AM & Hood DA (2003). PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C1669-77.

148. Ishihara N, Eura Y & Mihara K (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* **117**, 6535-46.

149. Ishihara N, Fujita Y, Oka T & Mihara K (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* **25**, 2966-77.

J

150. Jager S, Handschin C, St-Pierre J & Spiegelman BM (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12017-22.

151. James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373-9.

152. Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L & Karmazyn M (2005). NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 135-43.

153. Jazbutyte V (2010). Mitochondrial dynamics: molecular mechanisms and the role in the heart. *Minerva Cardioangiol* **58**, 231-9.

154. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, Chang CR & Tsai YS (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **32**, 309-19.

155. Jofuku A, Ishihara N & Mihara K (2005). Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* **333** , 650-9.

156. Jones BA & Fangman WL (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* **6**, 380-9.

157. Jorgensen SB, Jensen TE & Richter EA (2007). Role of AMPK in skeletal muscle gene adaptation in relation to exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 904-11.

158. Joubert F, Mazet JL, Mateo P & Hoerter JA (2002). 31P NMR detection of subcellular creatine kinase fluxes in the perfused rat heart: contractility modifies energy transfer pathways. *J Biol Chem* **277**, 18469-76.

159. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R & Veksler V (2008). Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* **586**, 5181-92.

160. Jullig M, Hickey AJ, Chai CC, Skea GL, Middleditch MJ, Costa S, Choong SY, Philips AR & Cooper GJ (2008). Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* **8**, 2556-72.

K

161. Kaasik A, Joubert F, Ventura-Clapier R & Veksler V (2004). A novel mechanism of regulation of cardiac contractility by mitochondrial functional state. *FASEB J* **18**, 1219-27.

162. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A & Ventura-Clapier R (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* **89**, 153-9.

163. Kamei S, Chen-Kuo-Chang M, Cazevieille C, Lenaers G, Olichon A, Belenguer P, Roussignol G, Renard N, Eybalin M, Michelin A, Delettre C, Brabet P & Hamel CP (2005). Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4288-94.

164. Kanazawa T, Zappaterra MD, Hasegawa A, Wright AP, Newman-Smith ED, Buttle KF, McDonald K, Mannella CA & van der Bliek AM (2008). The C. elegans Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* **4**, e1000022.

165. Kar R, Mishra N, Singha PK, Venkatachalam MA & Saikumar P (2010). Mitochondrial remodeling following fission inhibition by 15d-PGJ2 involves molecular changes in mitochondrial fusion protein OPA1. *Biochem Biophys Res Commun* **399**, 548-54.

166. Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F & Tian R (2010). Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res* **106**, 1541-8.

167. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL & Youle RJ (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* **159**, 931-8.

168. Karbowski M & Youle RJ (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 870-80.

169. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T & Shioi T (2010). Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ Heart Fail* **3**, 420-30.

170. Kelly DP & Scarpulla RC (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**, 357-68.

171. Kemi OJ, Hoydal MA, Haram PM, Garnier A, Fortin D, Ventura-Clapier R & Ellingsen O (2007). Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. *Cardiovasc Res* **76**, 91-9.

172. Kim JY, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ & Park SS (2005). Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* **64**, 966-72.

173. Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA & Schrader M (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **16**, 5077-86.

174. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM & Chan DC (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858-62.

175. Koulmann N & Bigard AX (2006). Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch* **452**, 125-39.

176. Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM & Cortright RN (2005). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1074-82.

177. Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**, 99-163.

178. Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P & Margreiter R (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1928-39.

179. Kuznetsov AV, Schneeberger S, Renz O, Meusburger H, Saks V, Usson Y & Margreiter R (2004). Functional heterogeneity of mitochondria after cardiac cold ischemia and reperfusion revealed by confocal imaging. *Transplantation* **77**, 754-6.

180. Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E & Saks VA (1996). Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* **241**, 909-15.

181. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965-76.

L

182. Landes T, Emorine LJ, Courilleau D, Rojo M, Belenguer P & Arnaune-Pelloquin L (2010a). The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep* **11**, 459-65.

183. Landes T, Leroy I, Bertholet A, Diot A, Khosrobakhsh F, Daloyau M, Davezac N, Miquel MC, Courilleau D, Guillou E, Olichon A, Lenaers G, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ & Belenguer P (2010b). OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 593-8.

184. Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ & Cho H (2007). Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* **282**, 22977-83.

185. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL & Youle RJ (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001-11.

186. Legros F, Lombes A, Frachon P & Rojo M (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* **13**, 4343-54.

187. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombes A & Rojo M (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* **117**, 2653-62.

188. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM & Kelly DP (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106**, 847-56.

189. Letellier T, Malgat M & Mazat JP (1993). Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta* **1141**, 58-64.

190. Leterrier JF, Rusakov DA, Nelson BD & Linden M (1994). Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microsc Res Tech* **27**, 233-61.

191. Leu M, Ehler E & Perriard JC (2001). Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl)* **204**, 217-24.

192. Li L, Muhlfeld C, Niemann B, Pan R, Li R, Hilfiker-Kleiner D, Chen Y & Rohrbach S (2011). Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol* **106**, 1221-34.

193. Liesa M, Palacin M & Zorzano A (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* **89**, 799-845.

194. Lin J, Handschin C & Spiegelman BM (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361-70.

19. Lin JD (2009). Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol* **23**, 2-10.

196. Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R & Gingrich JA (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry* **54**, 960-71.

197. Liu X, Weaver D, Shirihai O & Hajnoczky G (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* **28**, 3074-89.

198. Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Iotti S, Clementi V, Malucelli E, Barboni P, Longanesi L, Schimpf S, Wissinger B, Baruzzi A, Barbiroli B & Carelli V (2004). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* **56**, 719-23.

199. Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Manners D, Testa C, Malucelli E, La Morgia C, Barboni P, Carbonelli M, Schimpf S, Wissinger B, Zeviani M, Baruzzi A, Liguori R, Barbiroli B & Carelli V (2011). Defective mitochondrial adenosine triphosphate production in skeletal muscle from patients with dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Arch Neurol* **68**, 67-73.

200. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D & Reynier P (2007). Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* **61**, 315-23.

201. Lorell BH & Carabello BA (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* **102**, 470-9.

M

202. Makino A, Suarez J, Gawlowski T, Han W, Wang H, Scott BT & Dillmann WH (2011). Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1296-302.

203. Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A & Rojo M (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* **6**, 853-9.

204. Mannella CA (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 542-8.

205. Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru II, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh CE, Buttle K & Marko M (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* **52**, 93-100.

206. Marchbank NJ, Craig JE, Leek JP, Toohey M, Churchill AJ, Markham AF, Mackey DA, Toomes C & Inglehearn CF (2002). Deletion of the OPA1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *J Med Genet* **39**, e47.

207. Margineantu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM & Capaldi RA (2002). Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* **1**, 425-35.

208. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ & Moe GW (2001). Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* **52**, 103-10.

209. Martinou JC & Youle RJ (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* **13**, 1291-5.

210. Maruyama Y, Saito T & Maehara K (1997). Coronary circulation in the failing heart. *Jpn Heart J* **38**, 755-67.

211. Mayorga AJ & Lucki I (2001). Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 110-2.

212. Mayorov VI, Lowrey AJ, Biousse V, Newman NJ, Cline SD & Brown MD (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* **9**, 22.

213. McBride HM, Neuspiel M & Wasiak S (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* **16**, R551-60.

214. McElhinny AS, Kolmerer B, Fowler VM, Labeit S & Gregorio CC (2001). The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *J Biol Chem* **276**, 583-92.

215. McFarlan JT, Yoshida Y, Jain SS, Han XX, Snook LA, Lally J, Smith BK, Glatz JF, Luiken JJ, Sayer RA, Tupling AR, Chabowski A, Holloway GP & Bonen A (2012). In vivo, fatty acid translocase (CD36) critically regulates skeletal muscle fuel selection, exercise performance, and training-induced adaptation of fatty acid oxidation. *J Biol Chem* **287**, 23502-16.

216. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C & Vidal-Puig AJ (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J* **373**, 155-65.

217. Mercadier JJ, Lompe AM, de la Bastie D, Wisnewsky C & Schwartz K (1987). [Accumulation of messenger RNA of the atrial natriuretic factor in the rat left ventricle at the compensatory hypertrophy stage in pressure overload]. *C R Acad Sci III* **305**, 79-82.

218. Merkwirth C & Langer T (2008). Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* **135**, 1165-7.

219. Merkwirth C & Langer T (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 27-32.

220. Mettauer B, Zoll J, Garnier A & Ventura-Clapier R (2006). Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch* **452**, 653-66.

221. Minajeva A, Ventura-Clapier R & Veksler V (1996). Ca2+ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* **432**, 904-12.

222. Minasyan A, Keisala T, Zou J, Zhang Y, Toppila E, Syvala H, Lou YR, Kalueff AV, Pyykko I & Tuohimaa P (2009). Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* **114**, 161-6.

223. Momken I, Lechene P, Koulmann N, Fortin D, Mateo P, Doan BT, Hoerter J, Bigard X, Veksler V & Ventura-Clapier R (2005). Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice. *J Physiol* **565**, 951-64.

224. Momken I, Lechene P, Ventura-Clapier R & Veksler V (2004). Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H914-20.

225. Moncman CL & Wang K (1995). Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* **32**, 205-25.

226. Moore RL (1998). Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Ann Med* **30 Suppl 1**, 46-53.

227. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES & Spiegelman BM (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** , 6570-5.

228. Mouli PK, Twig G & Shirihai OS (2009). Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophys J* **96**, 3509-18.

229. Mozdy AD & Shaw JM (2003). A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 468-78.

230. Murakami T, Shimomura Y, Fujitsuka N & Sugiyama S (1995). Differential adaptation to endurance training between heart and gastrocnemius muscle mitochondria in rats. *Biochem Mol Biol Int* **36**, 285-90.

N

231. Nakai J, Sekiguchi N, Rando TA, Allen PD & Beam KG (1998). Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca2+ channels. *J Biol Chem* **273**, 13403-6.

232. Nisoli E & Carruba MO (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* **119**, 2855-62.

O

233. Ogata T & Yamasaki Y (1985). Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res* **241**, 251-6.

234. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-6.

235. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G & Belenguer P (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* **523**, 171-6.

236. Olichon A, Guillou E, Delettre C, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Daloyau M, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G & Belenguer P (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 500-9.

237. Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, Delettre C, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G & Belenguer P (2007). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell*

Physiol **211**, 423-30.

238. Ong SB & Hausenloy DJ (2010). Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **88**, 16-29.

239. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM & Hausenloy DJ (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **121**, 2012-22.

240. Ow YP, Green DR, Hao Z & Mak TW (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 532-42.

P

241. Palmer JW, Tandler B & Hoppel CL (1977). Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* **252**, 8731-9.

242. Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM, Riley DD, Lugus JJ, Colucci WS, Lederer WJ, Stanley WC & Walsh K (2011). Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* **31**, 1309-28.

243. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF Jr, Stanley WC & Walsh K (2012). Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**, H167-79.

244. Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F & Martinou JC (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* **3**, e3257.

245. Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donze O, Barja F & Martinou JC (2006). Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**, 7397-408.

246. Payne RM & Strauss AW (1994). Expression of the mitochondrial creatine kinase genes. *Mol Cell Biochem* **133-134**, 235-43.

247. Pellow S & File SE (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **24**, 525-9.

248. Perfettini JL, Roumier T & Kroemer G (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* **15**, 179-83.

249. Perkins G, Bossy-Wetzel E & Ellisman MH (2009). New insights into mitochondrial structure during cell death. *Exp Neurol* **218**, 183-92.

250. Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklies B, Kellner U, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Alexander C & Wissinger B (2001). OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* **10**, 1359-68.

251. Pette D & Staron RS (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **116**, 1-76.

252. Pette D & Staron RS (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* **170**, 143-223.

253. Pham AH, McCaffery JM & Chan DC (2012). Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics. *Genesis*

254. Philippi M & Sillau AH (1994). Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. *J Exp Biol* **189**, 1-11.

255. Picard M, White K & Turnbull DM (2012). Mitochondrial morphology, topology and membrane interactions in skeletal muscle: A quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol*

256. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M & Zorzano A (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* **14**, 1405-15.

257. Pidoux G, Witczak O, Jarnaess E, Myrvold L, Urlaub H, Stokka AJ, Kuntziger T & Tasken K (2011). Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J* **30**, 4371-86.

258. Pilegaard H, Saltin B & Neufer PD (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* **546**, 851-8.

259. Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Prola A, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh le H, Nicolas V, Alavi MV, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V & Joubert F (2012). Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc Res* **94**, 408-17.

260. Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V & Joubert F (2010). Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* **588**, 2443-54.

261. Pitts KR, McNiven MA & Yoon Y (2004). Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. *J Biol Chem* **279**, 50286-94.

262. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T & Sonveaux P (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* **2**, 49.

263. Praefcke GJ & McMahon HT (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 133-47.

264. Protasi F (2002). Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* **7**, d650-8.

265. Prut L & Belzung C (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33.

266. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-39.

Q

267. Quiros PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernandez-Vizarra E, Rodriguez F, Peinado JR, Fernandez-Garcia MS, Vega JA, Enriquez JA, Zorzano A & Lopez-Otin C (2012). Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J* **31**, 2117-33.

R

268. Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, Song BD & Schmid SL (2007). The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J* **26**, 559-66.

269. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D & Hen R (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14476-81.

270. Rappaport L, Oliviero P & Samuel JL (1998). Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol Cell Biochem* **184**, 101-5.

271. Reichert AS & Neupert W (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 41-9.

272. Rimbaud S, Garnier A & Ventura-Clapier R (2009). Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* **61**, 131-8 .

273. Rojo M, Legros F, Chateau D & Lombes A (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* **115**, 1663-74.

274. Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R & Wallimann T (1990). Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca2+ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem* **265**, 5258-66.

275. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ & Capaldi RA (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* **64**, 985-93.

276. Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C & Mazat JP (2000). Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* **347 Pt 1**, 45-53.

277. Rytinki MM & Palvimo JJ (2009). SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. *J Biol Chem* **284**, 26184-93.

S

278. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A & Wallimann T (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* **571**, 253-73.

279. Saks V, Kuznetsov AV, Gonzalez-Granillo M, Tepp K, Timohhina N, Karu-Varikmaa M, Kaambre T, Dos Santos P, Boucher F & Guzun R (2012). Intracellular Energetic Units regulate metabolism in cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 419-36.

280. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OYu & Kuznetsov AV (1994). Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* **133-134**, 155-92.

281. Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F & Kunz WS (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* **184**, 81-100.

282. Saks VA, Ventura-Clapier R & Aliev MK (1996). Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* **1274**, 81-8.

283. Santel A & Fuller MT (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-74.

284. Saotome M, Safiulina D, Szabadkai G, Das S, Fransson A, Aspenstrom P, Rizzuto R & Hajnoczky G (2008). Bidirectional Ca2+-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20728-33.

285. Sato S, Murata A, Orihara T, Shirakawa T, Suenaga K, Kigoshi H & Uesugi M (2011). Marine natural product aurilide activates the OPA1-mediated apoptosis by binding to prohibitin. *Chem Biol* **18**, 131-9.

286. Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y & Endo H (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **300** , 482-93.

287. Savabi F (1994). Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Mol Cell Biochem* **133-134**, 145-52.

288. Scarpulla RC (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* **1147**, 321-34.

289. Schaeffer PJ, Wende AR, Magee CJ, Neilson JR, Leone TC, Chen F & Kelly DP (2004). Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J Biol Chem* **279**, 39593-603.

290. Schiaffino S & Reggiani C (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* **76**, 371-423.

291. Scorrano L (2009). Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1875-83.

292. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchi E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW & d'Amati G (2007). Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* **50**, 1362-9.

293. Semenzato M, Cogliati S & Scorrano L (2011). Prohibitin(g) cancer: aurilide and killing by Opa1-dependent cristae remodeling. *Chem Biol* **18**, 8-9.

294. Shadel GS & Clayton DA (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* **66**, 409-35.

295. Shahrestani P, Leung HT, Le PK, Pak WL, Tse S, Ocorr K & Huang T (2009). Heterozygous mutation of Drosophila Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* **4**, e6867.

296. Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S & Sabbah HN (1998). Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 1757-62.

297. Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S & Sabbah HN (2000). Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 2361-7.

298. Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, Cheng H, Chen KH & Xiao RP (2007). Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem* **282**, 23354-61.

299. Sheridan C, Delivani P, Cullen SP & Martin SJ (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* **31**, 570-85.

300. Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC & Lehman JJ (2009). PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 201-12.

301. Siu PM, Donley DA, Bryner RW & Alway SE (2003). Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* **94**, 555-60.

302. Skulachev VP (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* **26**, 23-9.

303. Smekal G, von Duvillard SP, Pokan R, Tschan H, Baron R, Hofmann P, Wonisch M & Bachl N (2003). Effect of endurance training on muscle fat metabolism during prolonged exercise: agreements and disagreements. *Nutrition* **19**, 891-900.

304. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245-56.

305. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN & van der Bliek AM (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351-8.

306. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan DC (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749-55.

307. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG & Chan DC (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* **20**, 3525-32.

308. Soubannier V & McBride HM (2009). Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 154-70.

309. Spinazzi M, Cazzola S, Bortolozzi M, Baracca A, Loro E, Casarin A, Solaini G, Sgarbi G, Casalena G, Cenacchi G, Malena A, Frezza C, Carrara F, Angelini C, Scorrano L, Salviati L & Vergani L (2008). A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. *Hum Mol Genet* **17**, 3291-302.

310. Stallknecht B, Vissing J & Galbo H (1998). Lactate production and clearance in exercise. Effects of training. A mini-review. *Scand J Med Sci Sports* **8**, 127-31.

311. Stemmelin J, Cohen C, Terranova JP, Lopez-Grancha M, Pichat P, Bergis O, Decobert M, Santucci V, Francon D, Alonso R, Stahl SM, Keane P, Avenet P, Scatton B, le Fur G & Griebel G (2008). Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**, 574-87.

312. Steru L, Chermat R, Thierry B & Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **85**, 367-70.

313. Strom CC, Aplin M, Ploug T, Christoffersen TE, Langfort J, Viese M, Galbo H, Haunso S & Sheikh SP (2005). Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. *FEBS J* **272**, 2684-95.

314. Stuewe SR, Gwirtz PA, Agarwal N & Mallet RT (2000). Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 903-13.

315. Sugioka R, Shimizu S & Tsujimoto Y (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 52726-34.

316. Suzuki M, Jeong SY, Karbowski M, Youle RJ & Tjandra N (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* **334**, 445-58.

317. Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ & Rizzuto R (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca2+ waves and protects against Ca2+-mediated apoptosis. *Mol Cell* **16**, 59-68.

T

318. Talmadge RJ (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* **23**, 661-79.

319. Tanabe T, Yamada M, Noma T, Kajii T & Nakazawa A (1993). Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J Biochem* **113**, 200-7.

320. Tang S, Le PK, Tse S, Wallace DC & Huang T (2009). Heterozygous mutation of Opa1 in Drosophila shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* **4**, e4492.

321. Terblanche SE, Gohil K, Packer L, Henderson S & Brooks GA (2001). The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (Rattus norvegicus). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **128**, 889-96.

322. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A & Stallcup MR (2005). Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* **19**, 1466-73.

323. Tomanek RJ & Torry RJ (1994). Growth of the coronary vasculature in hypertrophy: mechanisms and model dependence. *Cell Mol Biol Res* **40**, 129-36.

324. Tondera D, Czauderna F, Paulick K, Schwarzer R, Kaufmann J & Santel A (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* **118**, 3049-59.

325. Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M & Cameron-Smith D (2002). Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E66-72.

326. Twig G, Hyde B & Shirihai OS (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1092-7.

V

327. Van Bergen NJ, Crowston JG, Kearns LS, Staffieri SE, Hewitt AW, Cohn AC, Mackey DA & Trounce IA (2011). Mitochondrial oxidative phosphorylation compensation may preserve vision in patients with OPA1-linked autosomal dominant optic atrophy. *PLoS One* **6**, e21347.

328. Van Hall G (2000). Lactate as a fuel for mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand* **168**, 643-56.

329. Vatner DE & Ingwall JS (1984). Effects of moderate pressure overload cardiac hypertrophy on the distribution of creatine kinase isozymes. *Proc Soc Exp Biol Med* **175**, 5-9.

330. Vega RB, Huss JM & Kelly DP (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* **20**, 1868-76.

331. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B & Ventura-Clapier R (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* **270**, 19921-9.

332. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI & Saks VA (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* **892**, 191-6.

333. Vendelin M, Beraud N, Guerrero K, Andrienko T, Kuznetsov AV, Olivares J, Kay L & Saks VA (2005). Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C757-67.

334. Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V (2004). Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* **555**, 1-13.

335. Ventura-Clapier R, Garnier A & Veksler V (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* **79**, 208-17.

336. Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E & Anflous K (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* **184**, 231-47.

337. Ventura-Clapier R, Mettauer B & Bigard X (2007). Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure. *Cardiovasc Res* **73**, 10-8.

338. Ventura-Clapier R & Veksler V (2006). Métabolisme énergétique cardiaque. *Cardiologie et maladies vasculaires* 37-41.

339. Villena JA & Kralli A (2008). ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 269-76.

W

340. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K & Eppenberger HM (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281 (Pt 1)**, 21-40.

341. Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith MA & Zhu X (2009). The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **109 Suppl 1**, 153-9.

342. Wasiak S, Zunino R & McBride HM (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* **177**, 439-50.

343. Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ & Leonard JV (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* **356**, 1736-41.

344. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH & Yan Z (2004). Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1342-8.

345. Watson PA, Reusch JE, McCune SA, Leinwand LA, Luckey SW, Konhilas JP, Brown DA, Chicco AJ, Sparagna GC, Long CS & Moore RL (2007). Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H246-59.

346. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC & Kitsis RN (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* **111**, 1497-504.

347. Westermann B (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 872-84.

348. Wilding JR, Joubert F, de Araujo C, Fortin D, Novotova M, Veksler V & Ventura-Clapier R (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* **575**, 191-200.

349. Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M & Holloszy JO (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **88**, 2219-26.

350. Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Davidson MM, Ruiz Noppinger P, Grohe C & Regitz-Zagrosek V (2008). Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)* **86**, 1013-24.

351. Wood IS & Trayhurn P (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**, 3-9.

352. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-24.

X

353. Xu X, Decker W, Sampson MJ, Craigen WJ & Colombini M (1999). Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol* **170**, 89-102.

Y

354. Yamaguchi R & Perkins G (2009). Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 963-72.

355. Yan Z, Lira VA & Greene NP (2012). Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev* **40**, 159-64.

356. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB & Spiegelman BM (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-8.

357. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ & McNiven MA (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409-20.

358. Yoon Y, Pitts KR, Dahan S & McNiven MA (1998). A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* **140**, 779-93.

359. Younes A, Schneider JM, Bercovici J & Swynghedauw B (1985). Redistribution of creatine kinase isoenzymes in chronically overloaded myocardium. *Cardiovasc Res* **19**, 15-9.

360. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, Toscano A, Musumeci O, Valentino ML, Caporali L, Lamperti C, Tallaksen CM, Duffey P, Miller J, Whittaker RG, Baker MR, Jackson MJ, Clarke MP, Dhillon B, Czermin B, Stewart JD, Hudson G, Reynier P, Bonneau D, Marques W Jr, Lenaers G, McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM, Votruba M, Zeviani M, Carelli V, Bindoff LA, Horvath R, Amati-Bonneau P & Chinnery PF (2010). Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* **133**, 771-86.

361. Yu-Wai-Man P, Trenell MI, Hollingsworth KG, Griffiths PG & Chinnery PF (2011). OPA1 mutations impair mitochondrial function in both pure and complicated dominant optic atrophy . *Brain* **134**, e164.

Z

362. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M & Carelli V (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* **131**, 352-67.

363. Zhu PP, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M & Blackstone C (2004). Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem* **279**, 35967-74.

364. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ & Shulman GI (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15983-7.

365. Zoratti M & Szabo I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-76.

366. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM & Vance JM (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* **36**, 449-51.

Annexes

ANNEXES

1. Publications scientifiques internationales

Caffin F, Prola A, Novotova M, David D.J, Garnier A, Fortin D, Alavi M, Veksler V, Ventura-Clapier R, Joubert F

« Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice »

(En cours de soumission, 2012 Dec)

Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Prola A, Garnier A, Mateo P, Fortin D, Huynh L, Nicolas V, Alavi M, Brenner C, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F

« Downregulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. »

(Cardiovasc Res. 2012 Jun 1;94(3):408-17)

Izem-Meziane M, Djerdjouri B, Rimbaud S, Caffin F, Fortin D, Garnier A, Veksler V, Joubert F, Ventura-Clapier R

« Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: Protective effect of curcumin. »

(Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 Feb;302(3):H665-74)

Hangen E, De Zio D, Bordi M, Zhu C, Dessen P, Caffin F, Lachkar S, Perfettini JL, Lazar V, Benard J, Fimia GM, Piacentini M, Harper F, Pierron G, Vicencio JM, Bénit P, de Andrade A, Höglinger G, Culmsee C, Rustin P, Blomgren K, Cecconi F, Kroemer G, Modjtahedi N

« A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. »

(Cell Death Differ. 2010 Jul;17(7):1155-66)

Bikard D, Képès F; L'Equipe iGEM Paris.

« First French team success during iGEM synthetic biology competition. »

(Med Sci (Paris). 2008 May;24(5):541-4.)

Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zylicz M
« High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. »
(PLoS Biol. 2006 Jun;4(6):e180)

2. Participation à des événements scientifiques

2.1-Aux congrès

Sept. 2012 : 6ème colloque Meetochondrie ; Soustons, France
Présentation d'un poster: «OPA1 deficiency impairs exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle».

Juin 2012 : 10ème congrès annuel du SHVM; Oxford, UK
Présentation d'un poster: «OPA1 deficiency impairs exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle».

Mai 2012 : 12ème journée de l'Ecole Doctorale 425; Chatenay-Malabry, France
Présentation d'une communication : «Rôle d'OPA1 dans l'adaptation du muscle squelettique à un exercice chronique ».

Sept. 2011 : 3ème congrès annuel du CODDIM ; Paris, France
Présentation d'un poster : « Un déficit d'OPA1 altère-t-il les capacités physiques des souris ? ».

Mai 2011 : 11ème journée de l'Ecole Doctorale 425; Chatenay-Malabry, France
Présentation d'un poster : « Un déficit d'OPA1 altère-t-il les capacités physiques des souris ? ».

Mai 2011 : 5ème colloque Meetochondrie ; La Colle-sur-Loup, France
Présentation d'un poster « Un déficit d'OPA1 altère-t-il les capacités physiques des souris ? ».

Avr. 2011 : Laboratoire de l'Université de Tartu; Tartu, Estonie
Présentation d'une communication : « Phenotypic characterization of OPA1 ».

Oct. 2010 : EUGeneHeart PhD Student Exchange Meeting; Londres, UK
Présentation d'une communication : « Study of OPA1 role on morphology and function of cardiac mitochondria ».

Sept. 2010 : 2nd congrès annuel du CODDIM; Paris, France
Présentation d'un poster : « Impact d'une délétion partielle du gène d'OPA1 sur l'organisation, la structure et la fonction des mitochondries cardiaques».

Mai 2010 : 4ème colloque Meetochondrie; Aussois; France
Présentation d'un poster :« Impact d'une délétion partielle du gène d'OPA1 sur l'organisation, la structure et la fonction des mitochondries cardiaques. »

2.2-Aux formations

Mars 2012 :
Projet Professionnel : Next Step Doctorant, Paris

Juin 2012 :
Certificat Ethique de la recherche biomédicale, Espace Ethique, Paris

Mars 2011 :
Formation Sauveteur Secouriste du Travail (recyclage); Faculté de Pharmacie

Oct. 2010 :
Biostatistiques & Epidémiologie; IFSBM ; Villejuif

Sept. 2010 :
Atelier Meetochondrie (Exposés théoriques & pratiques); Bordeaux

Mai 2010 :
« Espace des Savoirs » Ethiques & technologies, Espace Ethique, Paris

Mai 2010 :
Découverte et conception du médicament; Faculté de Pharmacie

Avr 2010 :
Formation Sauveteur Secouriste du Travail (initiation); Faculté de Pharmacie

Fevr 2010 :
Physiopathologie cardiovasculaire; à l'IFSBM, Villejuif

Janv 2010 :
Initiation à la prévention des risques professionnels; Faculté de Pharmacie

Am J Physiol Heart Circ Physiol 302: H665–H674, 2012.
First published November 18, 2011; doi:10.1152/ajpheart.00467.2011.

Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin

Malika Izem-Meziane,[1] Bahia Djerdjouri,[1] Stephanie Rimbaud,[2,3] Fanny Caffin,[2,3] Dominique Fortin,[2,3] Anne Garnier,[2,3] Vladimir Veksler,[2,3] Frederic Joubert,[2,3] and Renee Ventura-Clapier[2,3]

[1]*Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene Bab Ezzouar, El Alia, Alger, Algérie;* [2]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U-769, Châtenay-Malabry; and* [3]*University Paris-Sud, IFR141, UMR-S769, Châtenay-Malabry, France*

Submitted 9 May 2011; accepted in final form 11 November 2011

Izem-Meziane M, Djerdjouri B, Rimbaud S, Caffin F, Fortin D, Garnier A, Veksler V, Joubert F, Ventura-Clapier R. Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H665–H674, 2012. First published November 18, 2011; doi:10.1152/ajpheart.00467.2011.—The present study was designed to characterize the mitochondrial dysfunction induced by catecholamines and to investigate whether curcumin, a natural antioxidant, induces cardioprotective effects against catecholamine-induced cardiotoxicity by preserving mitochondrial function. Because mitochondria play a central role in ischemia and oxidative stress, we hypothesized that mitochondrial dysfunction is involved in catecholamine toxicity and in the potential protective effects of curcumin. Male Wistar rats received subcutaneous injection of 150 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ isoprenaline (ISO) for two consecutive days with or without pretreatment with 60 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ curcumin. Twenty four hours after, cardiac tissues were examined for apoptosis and oxidative stress. Expression of proteins involved in mitochondrial biogenesis and function were measured by real-time RT-PCR. Isolated mitochondria and permeabilized cardiac fibers were used for swelling and mitochondrial function experiments, respectively. Mitochondrial morphology and permeability transition pore (mPTP) opening were assessed by fluorescence in isolated cardiomyocytes. ISO treatment induced cell damage, oxidative stress, and apoptosis that were prevented by curcumin. Moreover, mitochondria seem to play an important role in these effects as respiration and mitochondrial swelling were increased following ISO treatment, these effects being again prevented by curcumin. Importantly, curcumin completely prevented the ISO-induced increase in mPTP calcium susceptibility in isolated cardiomyocytes without affecting mitochondrial biogenesis and mitochondrial network dynamic. The results unravel the importance of mitochondrial dysfunction in isoprenaline-induced cardiotoxicity as well as a new cardioprotective effect of curcumin through prevention of mitochondrial damage and mPTP opening.

curcumin; isoprenaline; cardiac injury; mitochondria function; mitochondrial morphology and permeability transition pore

CIRCULATING CATECHOLAMINES closely correlate with the severity and poor prognosis in heart failure and are thus considered to play a critical role in the development of cardiovascular diseases (11). Excessive release of catecholamines induces myocardial hypertrophy, myocyte damage, and contractile dysfunction, resulting in infarct-like necrosis of the heart muscle.

Oxidative stress due to increased generation of reactive oxygen species (ROS) plays a recognized role in the catecholamine-induced cardiotoxicity (24, 41). Indeed, catecholamines can easily undergo oxidation with production of unstable catecholamines-O-quinones, giving rise to a subsequent production of superoxide radicals that was proposed to be responsible for catecholamine-induced cardiotoxicity. The superoxide radicals can be reduced by superoxide dismutase to hydrogen peroxide, which damages the membrane integrity. Imbalance between ROS production and cellular antioxidant defenses initiates subcellular alterations leading to cell death, cardiomyopathy, and heart failure (12, 37, 41).

Mitochondrial dysfunction is widely acknowledged as a seminal event in necrotic and apoptotic cell death and is emerging as a key mediator of ischemia-reperfusion (I/R) injury and catecholamine toxicity in the heart. Alterations in Ca^{2+} handling and ROS clearly contribute to mitochondrial dysfunction and to opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), a high-conductance pore of the mitochondrial membranes. Opening of mPTP causes uncoupling of the mitochondria and swelling of the matrix, leading to rupture of the mitochondrial membranes, release of reduced equivalents and proapoptotic factors, and ultimately cell death (2). Increased vulnerability of the mPTP is an early event in pathological processes leading to heart failure (25). In recent years, mPTP has been considered a therapeutic target for cardioprotection during cardiac diseases, especially those associated with I/R (35).

Curcumin (CUR), a polyphenol responsible for the yellow color of the spice turmeric, at relatively low concentrations, is an effective anti-inflammatory agent and exhibits cardioprotective effects (49). The antioxidant properties of curcumin seem to be essential for its pleiotropic biological activities. Curcumin inhibits lipid peroxidation and effectively scavenges superoxide anion and hydroxyl radicals. It was also shown to interact with the mPTP (28). The cardioprotective effect of curcumin against catecholamine-induced cardiotoxicity has been established for a long time (32) and involves its antioxidant properties (24). Moreover, curcumin inhibits nuclear factor-κB activation, protects cardiac cells against I/R injury (14), and stabilizes the cytoskeleton through the increased expression of the heat shock protein Hsp27 (39). However, no study has been performed yet to demonstrate the implication of mitochondria as a possible target of the cardioprotective effect of curcumin.

Because mitochondria play a major role in cardiac dysfunction and cell death, the aim of the present study was *1*) to characterize the mitochondrial dysfunction induced by catecholamines and *2*) to investigate whether curcumin induces cardioprotective effects against catecholamine-induced cardiotoxicity by preserving mitochondrial function. To this aim, we

Address for reprint requests and other correspondence: R. Ventura-Clapier, U-769 INSERM, Univ Paris Sud, 5 rue J-B Clément, F-92296 Châtenay-Malabry, France (e-mail: renee.ventura@u-psud.fr).

 0363-6135/12 Copyright © 2012 the American Physiological Society

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

investigated whether curcumin could protect the heart against isoprenaline-induced cell death, alteration of mitochondrial respiration, dynamics, and biogenesis, and prevent opening of mPTP and cell death.

MATERIALS AND METHODS

Animal treatments. Male Wistar rats weighing 230–280 g were used. All experiments were approved by the Université Paris-Sud Institutional Care Committee and conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament.) Authorizations to conduct animal experiments were obtained from the French Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (no. 92–284, June 27, 2007). Rats were randomly divided into three groups of five animals each and treated as follows: *1*) the control group was given normal saline subcutaneously one time a day for two consecutive days; *2*) isoprenaline (ISO) group: 150 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ ISO was administered subcutaneously for 2 days to induce cardiac damage; and *3*) CUR + ISO group: curcumin (CUR; 60 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) was administrered intraperitonealy for 2 days, 30 min before ISO injection. In additional studies, CUR (60 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) was administered alone intraperitonealy for 2 days (CUR group). Twenty four hours after the last treatment period, all rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg) before death.

A supraphysiological dose of catecholamine was used to induce rapid infarct-like damages to the myocardium. The relatively low dose of curcumin was chosen in the range of the cardioprotective effects described in the literature (27, 39).

After death, hearts were quickly harvested. After left ventricle isolation, part was immediately used for mitochondrial respiration measurements, and other parts were rapidly frozen and kept at −80°C for biochemical analysis or fixed in 10% phosphate-buffered formalin for light microscopic studies.

Preparation of tissue homogenate. Hearts were homogenized in 10 volumes (wt/vol) of ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) using a Polytron homogenizer (Ultra-turrax T25). The homogenates were then centrifuged at 10,000 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatant was used for biochemical assays. Protein content was determined using BSA as standard (4).

Histological examinations. Formalin-fixed left ventricular tissues were dehydrated in ascending grades of alcohol and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with hematoxylin and eosin and examined under light microscopy (Carl Zeiss). Other serial 5-μm sections were stained with 1 g/ml Hoechst 33258 for 30 min at room temperature and visualized under fluorescence microscopy (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Apoptotic morphological cells were counted in 10 visual fields of 5 different areas.

Markers of cardiac stress and metabolic enzymes. Creatine kinase activity was assayed using a Teco commercial kit according to the manufacturer's instructions (CK-NAC reagents; Teco Diagnostics). Lactate dehydrogenase (LDH) activity was assayed by the method of Wahlefeld (45). The malondialdehyde (MDA) level was assessed according to Ohkawa et al. (34). Myeloperoxidase (MPO), a marker of neutrophil infiltration, was measured in the heart according to Krawisz et al. (22). Catalase activity was determined by measuring the rate of decomposition of H_2O_2 according to Aebi (1). Glutathione (GSH) content in supernatant of heart homogenate was evaluated by the method of Boyne and Ellman (3). Frozen tissue samples were weighed and homogenized in ice-cold buffer, and enzyme activities were determined as described previously (10). Complex I activity was measured in heart homogenized in ice-cold buffer containing 10 mmol/l Tris base (pH 7.2), 75 mmol/l sucrose, 225 mmol/l mannitol, 100 μmol/l EDTA, and 0.1% Triton X-100. To measure NADH-coenzyme Q reductase activity with decylubiquinone as electron acceptor, samples were incubated in 25 mmol/l phosphate buffer (pH 7.5), 2.5 mg/ml BSA, and 100 μmol/l decylubiquinone at 30°C. Activity was reported as a rotenone-insensitive decrease in NADH absorbance at 340 nm. Citrate synthase activity was measured in the presence of acetyl-CoA, oxaloacetic acid, and DTNB according to Ref. 38. Cytochrome c oxidase (COX) activity was determined by measuring the disappearance of reduced cytochrome *c* at 550 nm according to Ref. 48.

Real-time quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from rat left ventricle (50–100 mg) using the Trizol reagent technique (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Oligo(dT) first-strand cDNA was synthesized from 5 μg total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using the SYBR Green technology on a Light Cycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics) as previously described (15). Forward and reverse primers were each designed in a different exon of the target sequence, eliminating the possibility of amplifying genomic DNA as described previously (15, 16). Amplification was allowed to proceed from 30 to 40 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C nuclear respiratory factor 2, mitochondrial transcription factor A, COX subunits I and IV, and mitofusin 1 (Mfn1) and 2 (Mfn2), or 58°C peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α (PGC-1α), optic atrophy protein 1 (OPA1), and dynamin-related protein 1 (Drp1) from 5 to 9 s and extension at 72°C from 5 to 19 s depending on the target gene. Cyclophilin A and acidic ribosomal protein were used for normalization with Genorm software.

Western blot analysis. Hearts of control, ISO, and CUR + ISO were homogenized in a lysate buffer containing (in mM): 50 HEPES, 20 KCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 5 α-glycerolphosphate, 1 orthovanadate, 1 dithiothreitol (DTT), 5 NaPPi, 2 phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich Chimie), cocktail of protease inhibitors (Calbiochem Set V EDTA free), and 0.1% Triton X-100. Protein extracts (50 μg) were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Blots were first incubated with a primary antibody for rat total or phospho-Drp1 (dilution 1:1,000; Chemicon International) and then with an anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked antibody (dilution 1:2,500; Cell Signaling). Drp1 protein was revealed with an enhanced chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura; Pierce Biotechnology).

In situ study of mitochondrial respiration. Mitochondrial respiration was studied in situ in freshly saponin-skinned fibers as previously described (23, 42). Briefly, fibers were separated from the endocardial surface of the left ventricle under a binocular microscope in skinning solution (see below) at 4°C and permeabilized in the same solution with 50 μg/ml of saponin for 30 min. After being placed in respiration solution (see below) for 10 min to wash out adenine nucleotides and creatine phosphate, permeabilized separated fibers were transferred to a 3-ml water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK) equipped with a Clark electrode under continuous stirring. The respiration and skinning solutions contained the following (in mM): 2.77 CaK_2EGTA, 7.23 K_2EGTA (100 nM free Ca^{2+}), 1 free Mg^{2+}, 20 taurine, 0.5 DTT, and 20 imidazole (pH 7.1). The skinning solution also contained (in mM) 50 potassium methanesulfonate (160 mM ionic strength), 5.7 Na_2ATP, and 15 phosphocreatine while the respiration solution contained 10 glutamate, 4 malate, 3 phosphate, 90 potassium methanesulfonate, 10 sodium methanesulfonate (ionic strength 160 mM), and 2 mg/ml fatty acid-free BSA. Experiments were performed at 22°C. ADP-stimulated respiration (V_{ADP}) above basal oxygen consumption (V_0) was measured by stepwise addition of ADP. Maximal respiration rate (V_{max}) was $V_{ADP} + V_O$. Oxidation-phosphorylation coupling was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR) as V_{max}/V_0. Respiratory chain complexes were successively investigated with specific substrates and inhibitors [10 mM succinate and 2 mM amytal (for complex II), 0.5 mM *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyl-*p*-phenylenediamine + 0.5 mM ascorbate (for complex IV), and 4 mM azide (to inhibit complex IV)]. Respiration rates are given in $\mu mol\ O_2 \cdot min^{-1} \cdot g$ dry wt^{-1}. Two or three determinations were performed for each heart and each protocol.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

Table 1. *Anatomic data from control, ISO and CUR + ISO groups*

Group	Control	ISO	CUR + ISO	CUR
n	20	19	15	5
Body wt before treatment, g	241 ± 6	242 ± 8	251 ± 9	232 ± 14
Body wt after treatment, g	251 ± 6	229 ± 8*	243 ± 7	243 ± 14
Control, %	100	91	97	97
Heart wt, g	0.83 ± 0.03	1.05 ± 0.05**	0.99 ± 0.05*	0.99 ± 0.05
Control, %	100	127	119	119
Heart wt/body wt, mg/g	3.3 ± 0.12	4.58 ± 0.14***	4.07 ± 0.21**#	3.62 ± 0.13##
Control, %	100	139	123	110
Protein/wet wt, %	18.1 ± 0.46	17.44 ± 3.43	16.44 ± 2.05	ND

Values are means ± SE; *n*, no. of rats. ISO, isoprenaline; CUR, curcumin. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$ vs. the control group. #$P < 0.05$ and ##$P < 0.01$ vs. the ISO group. ND, not determined.

Isolation of mitochondria and measurement of mitochondrial swelling. Mitochondria were isolated from all experimental groups by differential centrifugation as previously described (19). Isolated cardiac mitochondria were resuspended in swelling buffer containing (in mM): 120 KCl, 5 KH_2PO_4, 20 MOPS, and 10 Tris·HCl, pH 7.4 to a final protein concentration of 0.25 mg/ml. Mitochondrial swelling was followed by changes in absorbance at 520 nm, after addition of 20 μM Ca^{2+} (46). The protein yield for isolated mitochondria was (mg protein/g heart tissue) 6.94 ± 0.32 for control, 6.55 ± 0.48 for ISO, and 6.12 ± 0.41 for CUR + ISO (not significant).

Preparation of adult rat ventricular myocytes. Adult rat ventricular myocytes were dissociated by retrograde perfusion of healthy isolated heart with collagenase as previously described (44) with slight modifications. Freshly isolated cells were plated on laminin-coated culture dishes at a density of 5×10^5 cells/dish and switched to serum-free medium for 2 h. Cells were then incubated for 48 h with ISO (5×10^{-7} M) and with or without curcumin (5×10^{-6} M) or their vehicle (control). Five independent cultures were used for each condition.

Mitochondrial network analysis and mPTP experiments. Fluorescence experiments were performed with a Carl Zeiss LSM-510 confocal microscope using a ×63 1.4 plan Apochromat objective lens. For mitochondrial network analysis, fresh cardiomyocytes were infected 48 h with an adenovirus containing green fluorescent protein and a sequence targeted to COX IV subunit (36) (gift from Dr. G. Szabadkai). Fluorescence was excited with the 488-nm line, and images were collected through a 505- to 550-nm band pass filter. To reconstruct three-dimensional images of the cells, serial images of individual cardiomyocytes were collected in the *z*-axis. Next, data were imported, and images were deconvoluted using Autoquant X software (Media Cybernetics, Bethesda, MD). Volumes of cardiomyocytes and individual mitochondrion were obtained with IMARIS software (Bitplane, Zurich, Switzerland) using the Imaris MeasurementPro module. Fluorescence emitted from mitochondria was analyzed by the software, which allows, by surface segmentation methods, to identify individual objects corresponding to individual mitochondria. Characteristics of individ-

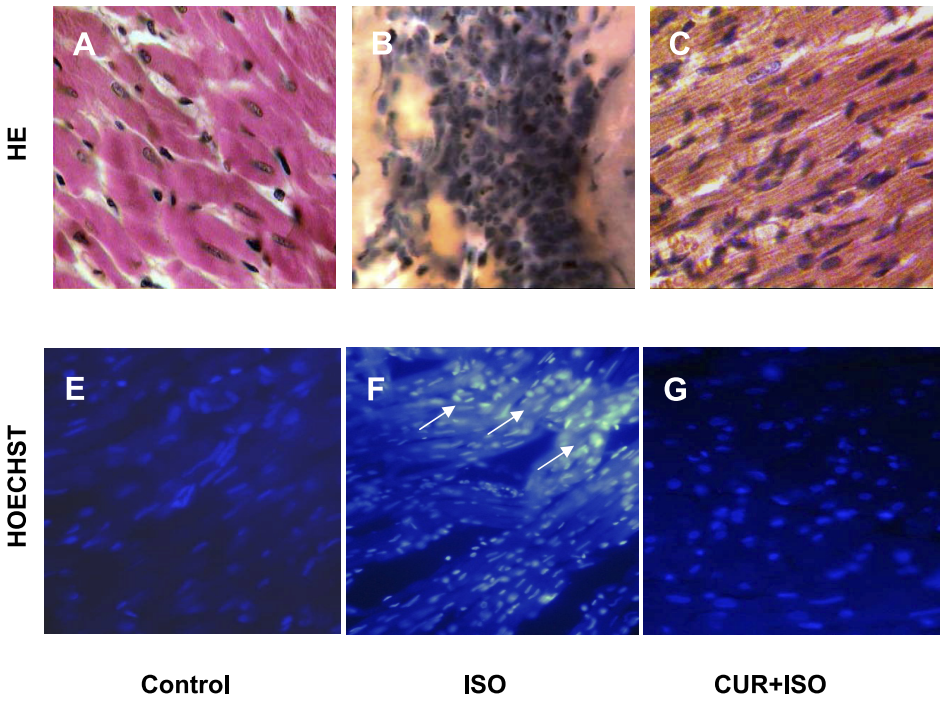


Fig. 1. Curcumin (CUR) protects the heart against apoptosis and oxidative stress. Heart tissues were processed for hematoxylin and eosin (HE) staining. *A*: normal aspect of myocardial tissue in control rat. *B*: acute extensive myofibrillar degeneration, with infiltration of neutrophil granulocytes and interstitial edema in isoprenaline (ISO)-treated hearts. *C*: mild degenerative changes of myocardial tissue in rats pretreated with CUR + ISO. *D*: effect of curcumin on myeloperoxidase activity in ISO-treated hearts ($n = 5$). Cell apoptosis was assessed by Hoechst staining for control (*E*), ISO (*F*)-, and CUR + ISO-treated (*G*) rats. *H*: summary data showing Hoechst-positive cells (%total counted cells) from 10 visual fields of 5 different areas. Values are means ± SE. **$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$ vs. the control group. #$P < 0.05$ and ###$P < 0.001$ vs. the ISO group ($n = 3$). Original magnification ×1,000 for *A–C* and ×400 for *E–G*.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

Table 2. *Effect of curcumin on metabolic enzymes and oxidative stress*

Group	Control	ISO	CUR + ISO	CUR
LDH, IU/mg protein	2.99 ± 0.20	1.26 ± 0.10***	2.31 ± 0.19*###	ND
CK, IU/mg protein	4.69 ± 17	2.91 ± 0.14***	4.17 ± 0.11*###	ND
MDA, nmol/mg protein	0.95 ± 0.06	2.2 ± 0.2***	0.98 ± 0.08###	0.87 ± 0.08##
GSH, nmol/mg protein	24.7 ± 1.1	15.5 ± 0.3***	22.6 ± 1.4##	20.8 ± 1.3##
Catalase, IU/mg protein	22.0 ± 0.9	10.3 ± 0.7***	15.5 ± 1.6**##	19.7 ± 2.1##
CxI, IU/g protein	255 ± 48	215 ± 25	258 ± 35	ND
COX, IU/g protein	2,765 ± 260	2,462 ± 133	2,284 ± 150	ND
CS, IU/g protein	587 ± 12	480 ± 43	556 ± 29	ND

Values are means ± SE; $n = 5$ rats in each group. Cardiac data: lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), complex I (CxI), citrate synthase (CS), and cytochrome oxidase (COX). Levels of lipid peroxidation [malondialdehyde (MDA)], antioxidant defenses measured as reduced glutathione (GSH) or catalase activity. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ vs. the control group. $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs. the ISO group. ND, not determined.

ual objects are obtained (surface, volume, etc.). By this approach, it is possible to calculate the distribution and average volume of individual mitochondria, as well as global mitochondrial network and cell volume.

For mPTP experiments, fresh cardiomyocytes were coloaded in culture medium with 5 μM rhodamine (Rhod-2) and 1 μM calcein (Invitrogen) for 45 min at room temperature and then washed with culture medium. Cardiomyocytes were then permeabilized with sapo-

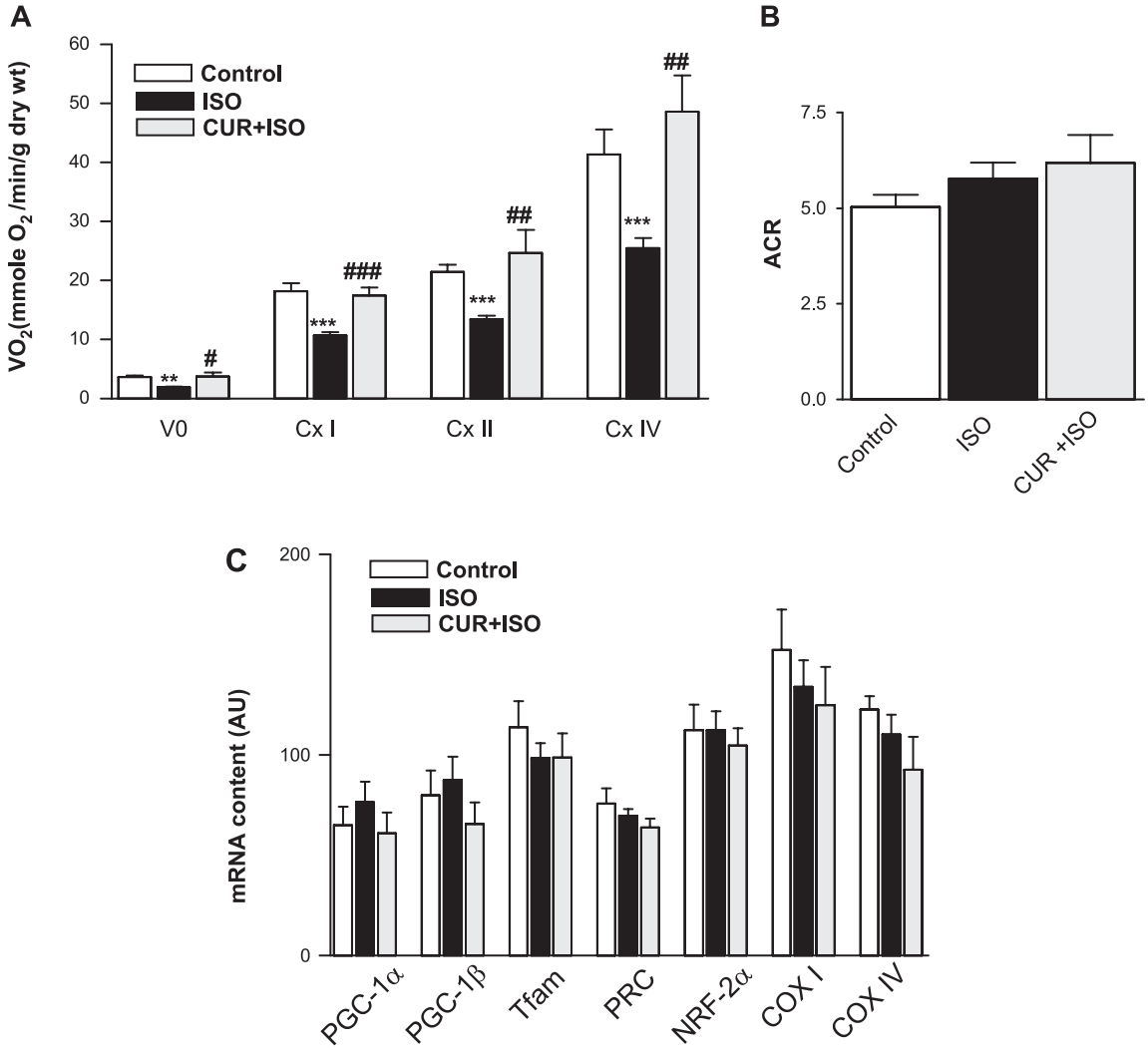


Fig. 2. Effect of curcumin on mitochondrial function and biogenesis in the heart of ISO-treated rats. *A*: basal respiration rate without ADP ($\dot{V}O_2$) and respiration rates with glutamate + malate (complex I), succinate + amytal (complex II), and *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyl-*p*-phenylenediamine + ascorbate (complex IV); values are expressed in μmol of oxygen consumed per mg dry weight per minute. *B*: acceptor control ratio (ACR). *C*: effect of curcumin on mitochondrial biogenesis in ISO-treated rats. Real-time quantitative RT-PCR analysis of mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α and 1β (PGC-1α and -1β, respectively), mitochondrial transcription factor A (Tfam), PGC-1-related coactivator (PRC), nuclear respiratory factor 2 DNA binding subunit α (NRF-2α), and cytochrome oxidase I and IV (COXI and COXIV, respectively). AU, arbitrary units. $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs. the control group. $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs. the ISO group. Values are means ± SE of 5 rats in each group.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

nin (50 μg/ml) for 3 min and then washed in respiration solution (see above) for 5 min to eliminate cytosolic constituents and dyes before experiments. Rhod-2 was excited with the 568-nm line of an argon/krypton laser, and images were collected through a 560-nm long pass emission filter. Calcein fluorescence was excited simultaneously with the 488-nm line of the same laser, and images were collected through a 505- to 550-nm band pass filter. Rhod-2 and calcein signals were monitored after addition of 2 μM Ca^{2+} in the different conditions (control, ISO, and CUR + ISO) until mPTP opening was observed. In additional plates, cells were superfused with 1 μM cyclosporin A (CsA) to check for specificity of the mPTP opening.

All of the data were analyzed by fitting both Rhod-2 and calcein curves with the following equation: $y = y_\infty + (y_0 - y_\infty)/[1 + (t/t_{max})^{p_{max}}]$, where y_∞ is the value of the fluorescence for time $(t) = \infty$ and y_0 the value at $t = 0$ (after Ca^{2+} addition), and t_{max} and p_{max} are the time and the slope for fluorescence decrease, respectively, when maximal mPTP opening occurs (where 50% of the signal has decreased). The initial slope of signal decrease was defined as p_{init}. Thus t_{max} and p_{init} give an index of the Ca^{2+} sensitivity of mPTP.

Statistical analysis. All data were expressed as means ± SE and were subjected to one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls's test. All results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Curcumin attenuated ISO-induced cardiac hypertrophy, apoptosis, and oxidative stress. ISO-treated rats showed a significant increase in heart weight by 27% and heart-to-body weight ratio by 39% compared with the control group that was partially prevented by curcumin (Table 1). No significant difference was observed for protein content, showing that edema was not responsible for increased heart weight. As expected, histological evaluation of ISO-treated hearts showed extensive granulomas with necrotic fibers and infiltrated inflammatory cells compared with control (Fig. 1, *A* and *B*). Curcumin pretreatment resulted in marked structural improvement of myonecrosis and edema compared with ISO-treated rats (Fig. 1*C*) and a decrease of neutrophil infiltration as reflected by myocardial MPO activity (Fig. 1*D*). The nuclear morphology was also analyzed using Hoechst 33258 staining assay to check for apoptosis. As shown in Fig. 1, *E* and *F*, ISO increased the number of apoptotic nuclei by 20% ($P < 0.001$) compared with control. Curcumin reduced nucleus abnormalities associated with cell death (Fig. 1, *G* and *H*). No differences were detected between the control group and the curcumin-pretreated group. Isoprenaline significantly decreased cardiac LDH and CK levels ($P < 0.001$, Table 2). ISO induced an increase in tissue MDA content ($P < 0.001$) and a decrease in GSH and catalase activities ($P < 0.001$) compared with control (Table 2). Pretreatment with curcumin prevented all of the deleterious effects of ISO. Curcumin alone had no effect on anatomical parameters and oxidative stress (Tables 1 and 2). All of these data confirm the antioxidant and protective effects of curcumin on ISO-induced cardiac injury.

Curcumin preserved cardiac mitochondrial respiration under ISO treatment and had no effect on mitochondrial biogenesis. To investigate the involvement of mitochondria in ISO-induced cardiotoxicity and in curcumin-induced cardioprotection, the oxygen consumption of permeabilized cardiac fibers was measured (Fig. 2). In ISO treated-rats, basal ($P < 0.01$) and maximal ($P < 0.001$) respiration rates on complex I were significantly reduced by 47 and 41%, respectively, compared with control fibers. Similarly, a significant decrease ($P < 0.05$) in the respiration on complex II (37%) or IV (38%) was observed (Fig. 2*A*), whereas the ACR was not altered (Fig. 2*B*). Addition of cytochrome *c* did not rescue maximal respiration rates, showing the intactness of the outer mitochondrial membrane in functioning mitochondria [V_{cytc}/V_{max}: 1.10 ± 0.03 (n = 11) in control vs. 1.10 ± 0.02 (n = 14) in ISO]. Pretreatment with curcumin preserved basal as well as complex I, complex II, and complex IV respiration rates.

mRNA levels of proteins involved in mitochondrial biogenesis (PGC-1α and its downstream targets) did not differ between groups, showing that the beneficial effects of curcumin were not related to changes in mitochondrial biogenesis (Fig. 2*C*). These results prompted us to investigate other mitochondrial targets such as mitochondrial remodeling, fusion and fission, and mPTP opening.

Curcumin reduced mPTP opening induced by ISO. Mitochondrial swelling following calcium addition, measured as changes in absorbance in isolated mitochondria, reflects the opening of the mPTP (Fig. 3*A*). Isoprenaline induced a large increase in the swelling rate of mitochondria by 268% compared with the control group ($P < 0.001$), and pretreatment with curcumin markedly reduced the rate of mitochondrial swelling (Fig. 3*B*).

To decipher whether the beneficial effects of curcumin on mPTP opening were due to systemic or local effects, adult rat ventricular myocytes were incubated for 48 h with ISO and with or without curcumin. Opening of the mPTP was determined in saponin-permeabilized cardiomyocytes, using calcein probe to follow mPTP opening and Rhod-2 fluorophore to monitor mitochondrial calcium. Increased Rhod-2 fluorescence indicated uptake of calcium in mitochondria after addition of 2

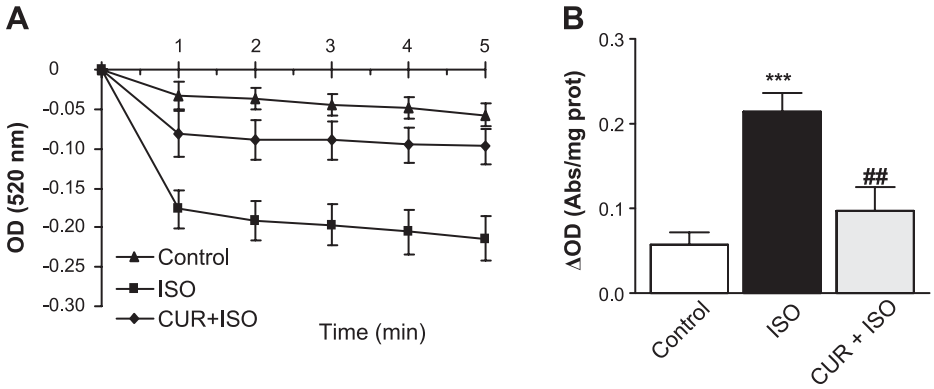


Fig. 3. Effect of curcumin on swelling of heart mitochondria. A: mean changes in absorbance at 520 nm following calcium addition for mitochondria from control, ISO-, and CUR + ISO-treated rats. OD, optical density. *B*: mean values at 5 min. ***$P<0.001$, versus control group; ## $P<0.01$, versus ISO group.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

μM calcium and progressive mitochondrial calcium loss correlated with calcein leakage and indicated mPTP opening (Fig. 4, *A–C*). Involvement of the mPTP was confirmed by the addition of CsA, the known inhibitor of the mPTP, which delayed these decreases. After treatment with ISO, the maximal time of mPTP opening (t_{max}) appeared significantly earlier for Rhod-2 (628 ± 29 s, n = 37 vs. 870 ± 62 s, n = 26 in control, $P < 0.01$) and for calcein (574 ± 32 s, n = 37 vs. 818 ± 67 s, n = 26, $P < 0.01$) (Fig. 4, *D* and *E*), indicative of an increase in mPTP Ca^{2+} sensitivity. Isoprenaline also induced a significant increase of the slope at opening (p_{init}) by 75% ($P < 0.001$) and 30% ($P < 0.05$) for Rhod-2 and calcein, respectively, compared with control cardiomyocytes (Fig. 4, *F* and *G*). Pretreatment with curcumin significantly delayed mPTP opening and fully restored the slope to control values ($P < 0.05$). Acute addition of curcumin alone (5 μM) had no direct effect on mPTP opening (results not shown). Taken together, these results show that curcumin exerts a protective effect on mPTP opening in the heart by a cellular rather than systemic effect.

Curcumin did not modify proteins involved in mitochondrial dynamic and mitochondrial network. mPTP opening properties can also be influenced by mitochondrial morphology (33), and ISO can modify mitochondrial morphology through Drp1 phosphorylation (9). To assess whether changes in the mPTP properties could be due to changes in mitochondrial dynamics,

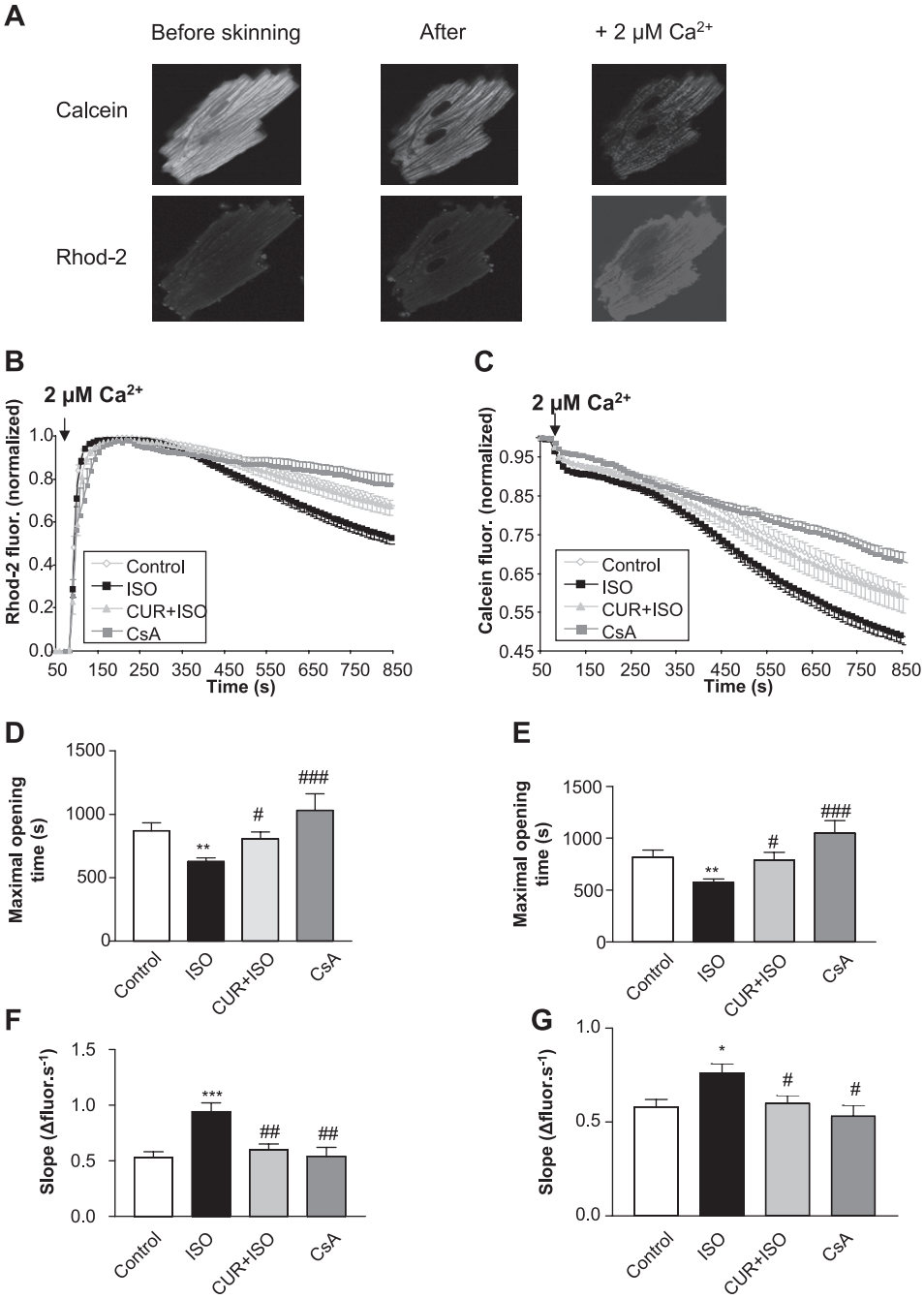


Fig. 4. Effect of curcumin on mitochondrial permeability transition pore (mPTP) of ISO-treated cardiomyocytes. *A*: representative images of calcein and rhodamine (Rhod-2) fluorescence before and after skinning and after 2 μM calcium. *B*: mitochondrial Rhod-2 fluorescence intensities reflecting mitochondrial Ca^{2+} uptake in saponin-permeabilized cardiomyocytes. *C*: mitochondrial calcein fluorescence in permeabilized cardiomyocytes reflecting the opening of the mPTP. Maximal opening time for Rhod-2 (*D*) and calcein (*E*) probes and slopes at initial mPTP opening for Rhod-2 (*F*) and calcein (*G*). Values are means ± SE of 5 rats in each group. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ vs. control. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, and $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs. ISO-treated cardiomyocytes.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

we next assessed the expression of the mitochondrial fusion/fission regulatory proteins Opa1, Drp1, and Mfns-1 and -2. Their expression was not significantly changed in the heart of ISO-treated rats (Fig. 5*A*). Protein kinase A (PKA)-mediated phosphorylation of Drp1 induces sequestration of DRP1 in the cytosol, decreases the fission rate of mitochondria, and may play a protective role upon apoptotic stress (6, 9). As expected, ISO treatment significantly ($P < 0.05$) increased the phosphorylation of Drp1, which was, however, maintained in curcumin-pretreated rats (Fig. 5*B*).

Using fluorescence imaging and three-dimensional reconstruction, we examined whether ISO treatment could alter the mitochondrial network morphology (Fig. 6*A*). ISO induced an increase in the total mitochondrial volume ($P < 0.05$, Fig. 6*B*) and in the volume of individual mitochondria ($P < 0.05$, Fig. 6*C*). The population of small mitochondria decreased compared with control, whereas larger mitochondria were increased ($P < 0.05$, Fig. 6*D*). Pretreatment of cardiomyocytes with curcumin was without effect, in line with Drp1 phosphorylation results. ISO tended to increase individual cell volume (*t*-test, $P < 0.05$), whereas addition of curcumin had no significant effect (Fig. 6*E*).

DISCUSSION

The present results show that, in addition to inflammation, apoptosis, cell damage, and oxidative stress, ISO treatment also induces mitochondrial dysfunction, mitochondrial swelling, and opening of the mPTP. These deleterious effects were prevented by pretreatment with curcumin. Beneficial effects of curcumin on mitochondrial function occurred without changes in mitochondrial dynamic proteins, network morphology, and mitochondrial biogenesis. Altogether, these results evidence that mitochondria and mPTP are involved in catecholamine cardiotoxicity and are an additional target for the cardioprotective effects of curcumin.

The present study shows that curcumin prevented ISO-induced cardiac hypertrophy, oxidative stress, inflammatory events, necrosis, and neutrophil infiltration and protected cardiomyocytes from cellular injury. Several studies have shown cardioprotective effects of curcumin in different models of catecholamine-induced oxidative stress (14, 31, 39) at doses close to the one used in this study, whereas higher doses (400 $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) were less effective (39). Most of these protective effects are usually attributed to the ability of curcumin to enhance antioxidant defenses and to scavenge ROS, which can protect cells from necrosis and apoptosis (32).

Mitochondria are the primary source of ROS production in cardiomyocytes as well as their primary target. Previous studies have shown that isoprenaline impairs cardiomyocyte structure through oxidative stress and induction of cell apoptosis (17), and mitochondrial respiratory dysfunction is one of the important features of oxidative stress-mediated cell death (47). We thus investigated mitochondrial function in situ with the advantage over isolated mitochondria to explore the whole mitochondrial population within its cellular environment. Previous study provides evidence that impairment of respiratory capacity of isolated mitochondria by isoprenaline-mediated oxidative stress selectively affects NADH oxidation (47). We show here using permeabilized fibers that basal respiration and respiration rates not only under complex I, but also under complexes II and IV, are affected in ISO-treated rat. Decreased respiration rates were not due to decreased oxidative phosphorylation or disruption of the outer mitochondrial membrane in functioning mitochondria because the ACR was not altered and cytochrome *c* addition did not rescue O_2 consumption. Moreover, tissue activities of CxI, CxIV, and citrate synthase were

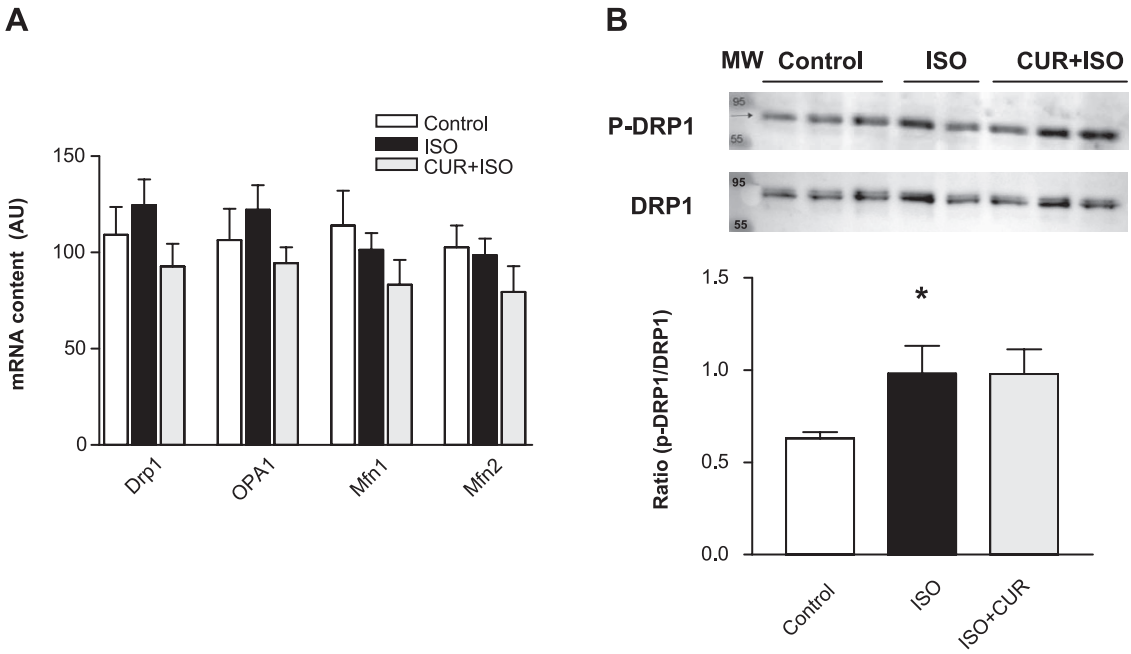


Fig. 5. Effect of curcumin on mitochondrial dynamics in the heart of control ISO- or CUR + ISO-treated rats. *A*: real-time quantitative RT-PCR analysis of mRNA expression of dynamin-related protein 1 (Drp1), optic atrophy protein 1 (OPA1), and mitofusins (Mfn1 and -2). *B*: phosphorylation (P) of DRP1 determined by Western blot analysis and densitometry. $*P < 0.05$ vs. the control group. Values are means ± SE of 5 rats in each group.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

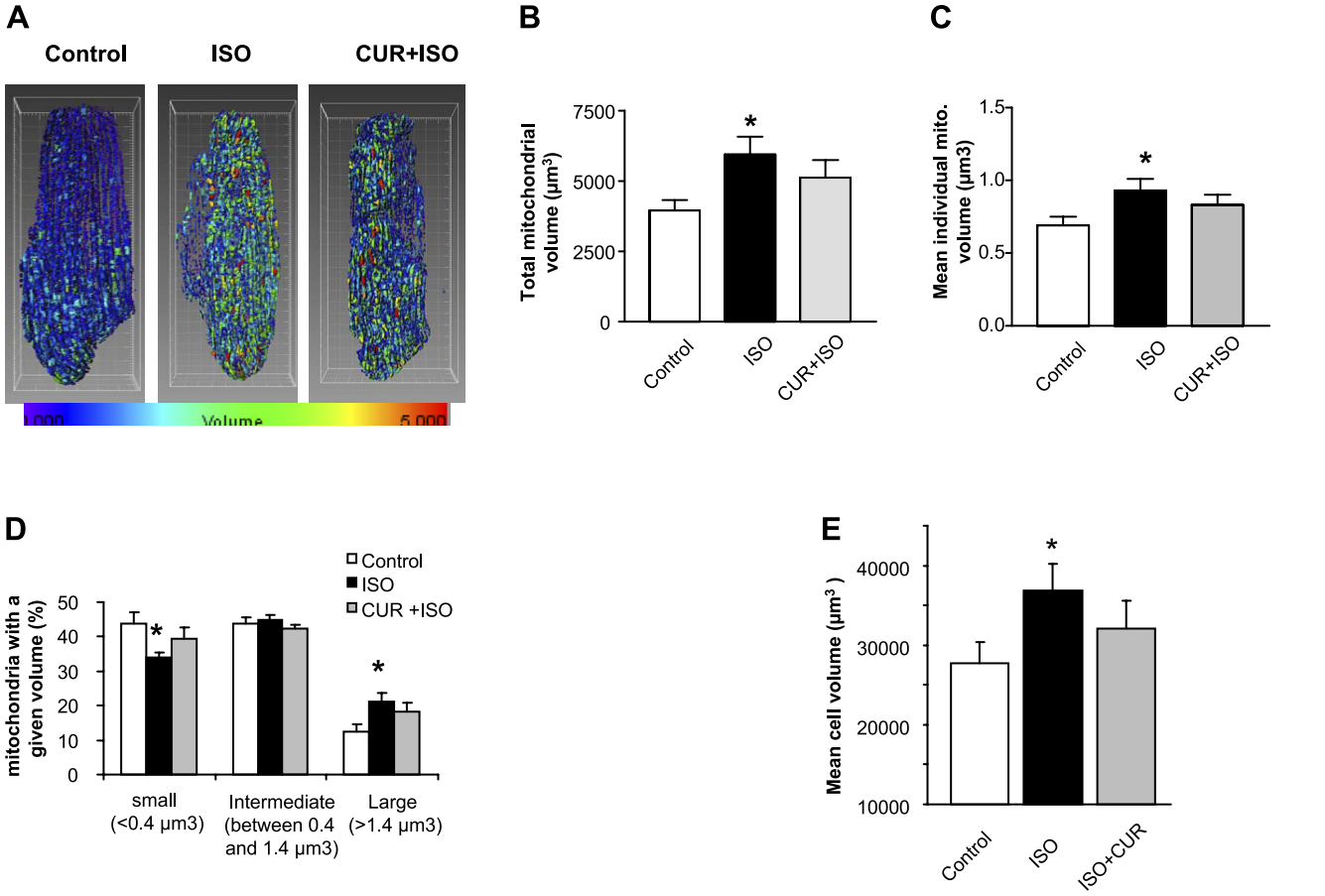


Fig. 6. Effect of curcumin on morphology of the mitochondrial network in rat cardiomyocytes revealed by confocal fluorescent microscopy. *A*: 3-dimensional reconstruction of adult rat cardiomyocytes infected with an adenovirus encoding green fluorescent protein (GFP) targeted to mitochondria. *B*: total mitochondrial volume. *C*: mean individual mitochondrial volume. *D*: mitochondrial volume distribution. *E*: mean cell volumes. $*P < 0.05$ vs. the control group.

not significantly decreased. Taken together, this suggests that decreased respiration rates per milligram of tissue are due to a proportion of defective mitochondria that have lost their inner and outer membrane integrity, leading, for example, to release of reducing equivalents that prevents rescue by cytochrome *c* addition (13). These defective mitochondria are most probably predominantly localized in severely injured or dead cardiomyocytes. The lack of effect of cytochrome *c* addition on respiration does not preclude that cytochrome *c* was released from nonrespiring mitochondria. Although we did not measure, it is an early event in the process of apoptosis. Pretreatment with curcumin completely restored mitochondrial respiration by preserving cell and mitochondrial integrity, in line with their preserved ultrastructure previously described in a similar model (24).

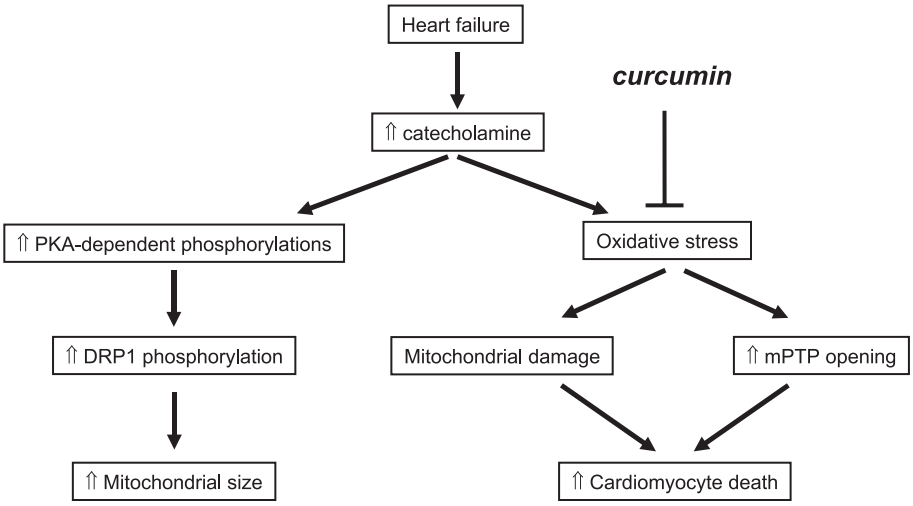


Fig. 7. Proposed mechanism for the beneficial effect of curcumin on catecholamine-induced cardiac injury. PKA, protein kinase A.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

Several mechanisms have been implicated in the regulation of PGC-1α expression and mitochondrial biogenesis, including increased production of reactive nitrogen species and catecholamines (43). We thus explored whether catecholamine cardiotoxicity was associated with alteration of mitochondrial biogenesis by measuring the mRNA expression of PGC-1α, the major transcriptional regulator of the mitochondrial biogenesis, and of its downstream targets. Neither ISO nor CUR + ISO significantly affected PGC-1α or -β or their downstream targets, suggesting that alterations in mitochondrial biogenesis are not involved.

It has been shown that a change in mitochondrial shape can contribute to mitochondrial defects and mitochondrial mPTP opening (33). Mitochondrial network morphology is the result of fusion and fission events that allow the cell to maintain homogeneous mitochondrial population (7) by exchanging mitochondrial components and eliminating nonfunctional mitochondria (40). Mitofusins and OPA1 are involved in fusion of outer and inner mitochondrial membranes, respectively, whereas Drp1 is involved in mitochondrial fission, an early apoptotic event (20, 26). Catecholamine activates the PKA, and PKA-induced phosphorylation of Drp1 induces its sequestration in the cytosol thus inhibiting mitochondrial fission, a mechanism thought to be protective against apoptosis (6, 9). Whereas in ISO-treated hearts we found no change in the expression of proteins of the mitochondrial dynamics, we observed an increase in the number of large mitochondria and in the mean mitochondrial volume in relation with the increase in Drp1 phosphorylation. Changes in mitochondrial morphology were not prevented by curcumin, suggesting that the beneficial effects of curcumin do not involve mitochondrial network remodeling. Moreover, maintained Drp1 phosphorylation suggests that curcumin does not interfere with the phosphorylation process induced by PKA.

Alternatively, loss of functioning mitochondria can be due to mitochondrial swelling, opening of the permeability transition pore, and depletion of reducing equivalents. Increased mPTP sensitivity to calcium can even precede changes in respiration and can play an important role in cell death (5). mPTP opening causes release of reducing equivalent, cytochrome *c*, and other proapoptotic proteins and loss of membrane potential that may lead to apoptotic cell death (13, 18). ISO treatment accelerated mPTP opening assessed either in mitochondria from treated animals or in ISO-treated isolated cardiomyocytes. Pretreatment with curcumin largely delayed and prevented ISO-induced opening of the mPTP and mitochondrial swelling. Thus, either in vivo or in vitro, curcumin was able to blunt the deleterious effects of ISO on mPTP opening, suggesting a direct beneficial effect on cardiomyocytes. ISO-induced cardiotoxicity has also been associated with alterations in Ca^{2+} handling, itself being tightly related to the generation of ROS (8, 21). Oxidative stress and Ca^{2+} mishandling induced by ISO can favor mPTP opening. It was shown recently that heart failure can be precipitated by Ca^{2+} overload and mitochondria-dependent increase in myocyte necrosis and could be prevented by loss of cyclophilin D, the mitochondrial target of CsA that prevents mPTP opening (30). The increased opening susceptibility of the mPTP observed in the present study may be responsible for impairment in respiration and increased apoptosis involved in the cardiotoxicity of catecholamine. The cardioprotective effect of curcumin on mitochondrial respiration and apoptosis could thus be mediated at least in part by its beneficial effect on inflammation, oxidative stress, and mPTP opening. There are limitations to the present investigation that need to be further addressed. For example, whether mPTP plays a major role in the cardioprotective effect of curcumin could be studied by evaluating the effects of an mPTP inhibitor or using, for example, cyclophilin D knockout mice (29). Moreover, whether curcumin can reverse the catecholamine-induced injury remains to be established.

In summary, ISO-induced cardiotoxicity involves inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, alteration of mitochondria integrity, increase in mPTP opening, and cell damage. The cardioprotective effect of curcumin involves decreased oxidative stress and inflammation, and improved resistance to mPTP opening, leading to preservation of mitochondrial function and prevention of apoptosis (Fig. 7). Interestingly, increased circulating catecholamines, deregulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis, unbalance between pro-oxidant reactions and antioxidant defenses, and modification of the redox state are important events involved in hypertrophied and failing myocardium (8). Curcumin was shown to prevent heart failure in rats by inhibiting p300 histone acetyltransferase activity (27). Alternatively, it was shown that heart failure can be prevented by decreasing the open probability of mPTP (30). The present results show that curcumin may also protect the heart by preserving mitochondrial function and mPTP opening. Inhibition of the mPTP may thus be a new mechanism by which curcumin exerts its cardioprotective effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Transcriptomic/proteomic (Valérie Nicolas) and the Animal Care (Valérie Domergue-Dupont) platforms of IFR141 for access to instruments and technical advice.

GRANTS

This work was supported, in part, by the "Comité National d'Evaluation et de Programmation de la Recherche Universitaire-CNEPRU," F00220100048, Algiers, Algeria. R. Ventura-Clapier and F. Joubert are scientists at Centre National de la Recherche Scientifique.

DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the authors.

REFERENCES

1. **Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121–126, 1984.
2. **Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P.** The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett* 584: 2504–2509, 2010.
3. **Boyne AF, Ellman GL.** A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem* 46: 639–653, 1972.
4. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
5. **Burelle Y, Khairallah M, Ascah A, Allen BG, Deschepper CF, Petrof BJ, Des Rosiers C.** Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J Mol Cell Cardiol* 48: 310–21, 2010.
6. **Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L.** Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15803–15808, 2008.
7. **Chan DC.** Mitochondrial dynamics in disease. *N Engl J Med* 356: 1707–1709, 2007.
8. **Choudhary G, Dudley SC Jr.** Heart failure, oxidative stress, and ion channel modulation. *Congest Heart Fail* 8: 148–155, 2002.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

9. **Cribbs JT, Strack S.** Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8: 939–944, 2007.
10. **De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B, Ventura-Clapier R.** Subcellular creatine kinase alterations Implications in heart failure. *Circ Res* 85: 68–76, 1999.
11. **Dhalla NS, Dent MR, Arneja AS.** Pathogenesis of catecholamine-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 200: 207–262, 2008.
12. **Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Giorgio M.** Mitochondria and vascular pathology. *Pharmacol Rep* 61: 123–130, 2009.
13. **Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276: 2571–2575, 2001.
14. **Fiorillo C, Becatti M, Pensalfini A, Cecchi C, Lanzilao L, Donzelli G, Nassi N, Giannini L, Borchi E, Nassi P.** Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF-kappaB, and JNK pathways. *Free Radic Biol Med* 45: 839–846, 2008.
15. **Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R.** Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491–501, 2003.
16. **Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B, Lampert E, Veksler V, Ventura-Clapier R.** Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J* 19: 43–52, 2005.
17. **Goto K, Takemura G, Maruyama R, Nakagawa M, Tsujimoto A, Kanamori H, Li L, Kawamura I, Kawaguchi T, Takeyama T, Fujiwara H, Minatoguchi S.** Unique mode of cell death in freshly isolated adult rat ventricular cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Med Mol Morphol* 42: 92–101, 2009.
18. **Green DR, Kroemer G.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629, 2004.
19. **Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT, Gottlieb RA.** Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem* 279: 21233–21238, 2004.
20. **Heath-Engel HM, Shore GC.** Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1763: 549–560, 2006.
21. **Kaplan P, Babusikova E, Lehotsky J, Dobrota D.** Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca2+-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem* 248: 41–47, 2003.
22. **Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF.** Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87: 1344–1350, 1984.
23. **Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965–976, 2008.
24. **Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R.** Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1967–1980, 2004.
25. **Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, Burelle Y.** Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol* 41: 998–1009, 2006.
26. **Martinou JC, Youle RJ.** Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13: 1291–1295, 2006.
27. **Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K.** The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest* 118: 868–878, 2008.
28. **Morin D, Barthelemy S, Zini R, Labidalle S, Tillement JP.** Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett* 495: 131–136, 2001.
29. **Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y.** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652–658, 2005.
30. **Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkentin JD.** Ca2+- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* 117: 2431–2444, 2007.
31. **Nazam Ansari M, Bhandari U, Pillai KK.** Protective role of curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats. *Hum Exp Toxicol* 26: 933–938, 2007.
32. **Nirmala C, Puvanakrishnan R.** Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 159: 85–93, 1996.
33. **Nogueira V, Devin A, Walter L, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E.** Effects of decreasing mitochondrial volume on the regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 37: 25–33, 2005.
34. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358, 1979.
35. **Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M.** Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359: 473–481, 2008.
36. **Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T.** Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca2+ responses. *Science* 280: 1763–1766, 1998.
37. **Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D.** The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 40: 426–432, 1998.
38. **Srere PA.** Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3–11, 1969.
39. **Tanwar V, Sachdeva J, Golechha M, Kumari S, Arya DS.** Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of Hsp27 along with strengthening antioxidant defense system. *J Cardiovasc Pharmacol* 55: 377–384, 2010.
40. **Twig G, Hyde B, Shirihai OS.** Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1092–1097, 2008.
41. **Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P.** Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 221–229, 2005.
42. **Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA.** Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892: 191–196, 1987.
43. **Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V.** Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79: 208–217, 2008.
44. **Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R.** Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca2+ current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 127: 65–74, 1999.
45. **Wahlefeld Lactate Dehydrogenase AW.** UV-method with L-Lactate and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer HU. New York, NY: Plenum, 1983, p. 126–132.
46. **Wang G, Liem DA, Vondriska TM, Honda HM, Korge P, Pantaleon DM, Qiao X, Wang Y, Weiss JN, Ping P.** Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1290–H1295, 2005.
47. **Wang SB, Tian S, Yang F, Yang HG, Yang XY, Du GH.** Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol* 615: 125–132, 2009.
48. **Wharton DC, Tzagoloff A.** Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* 10: 245–250, 2000.
49. **Wongcharoen W, Phrommintikul A.** The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* 133: 145–151, 2009.

Downloaded from http://ajpheart.physiology.org/ at INSERM on November 16, 2012

◆ Résumé :

L'ADOA-1 (*Autosomal dominant optic atrophy*) est une maladie neurologique pouvant être causée par la mutation de la protéine mitochondriale OPA1 (*Optic atrophy type 1*) et pouvant conduire à une cécité. Certains patients peuvent présenter un dysfonctionnement mitochondrial plus généralisé, et développer d'autres complications neuromusculaires (ADOA-1^{+}). La protéine OPA1 est une dynamine GTPasique impliquée dans la dynamique mitochondriale en modulant la fusion des membranes internes, et plus largement dans le maintien des fonctions mitochondriales. Le rôle de cette protéine a été étudié dans beaucoup de types cellulaires, mais peu d'études se sont intéressées à la cellule cardiaque qui pourtant possède de nombreuses mitochondries.

La 1ère question soulevée par cette thèse était de déterminer l'implication de la protéine OPA1 dans l'organisation du réseau mitochondrial et dans le fonctionnement de la cellule cardiaque en condition physiologique ou pathologique. Pour répondre à cela, nous avons utilisé un modèle murin hétérozygote pour *Opa1* (*Opa1*$^{+/-}$). Nous avons montré que dans le cardiomyocyte adulte, la diminution d'expression d'OPA1 induisait un déséquilibre de la balance fusion/fission, qui se traduisait par une désorganisation du réseau mitochondrial, ainsi qu'une altération de la morphologie des mitochondries. Cependant, ces modifications n'engendraient pas d'altération des capacités oxydatives des mitochondries, mais conduisaient à une perturbation des propriétés d'ouverture du PTP. En outre, la déficience en OPA1 n'influençait pas la fonction cardiaque en condition physiologique, mais était associée à son altération plus sévère en condition pathologique.

La 2nde question de cette thèse était de savoir l'implication d'OPA1 dans la réponse à un stress physiologique des cellules musculaires squelettiques, et ainsi étudier le lien éventuel entre OPA1 et la mise en place de la biogénèse mitochondriale. Nous avons donc soumis nos souris *Opa1*$^{+/-}$ à un exercice d'endurance. Nos résultats ont révélé que nos deux groupes d'animaux disposaient des mêmes capacités physiques à l'entraînement. L'adaptation des souris *Opa1*$^{+/-}$ à l'entrainement s'effectuait par un remodelage métabolique, vraisemblablement pour contrer un défaut d'adaptation de la biogénèse mitochondriale.

En conclusion, nos résultats ont permis de mieux définir le rôle de la protéine OPA1 dans les muscles striés et son implication dans l'adaptation à un stress. Ce travail nous ouvre des perspectives sur le rôle de la dynamique mitochondriale dans l'adaptation à un stress.

◆ Mots clés :

OPA1, Mitochondrie, Morphologie, Dynamique mitochondriale, Biogénèse mitochondriale, Adaptation, Stress chronique, Entraînement, Métabolisme énergétique, Cellules musculaires squelettique et cardiaque.

◆ Laboratoire :

Signalisation et physiopathologie cardiaque, INSERM - U769
Equipe 1 : Signalisation énergétique et physiopathologie cardiaque et musculaire
Faculté de Pharmacie
5, rue Jean Baptiste Clément
92.290 CHÂTENAY-MALABRY

◆ PÔLE :

Physiopathologie Moléculaire et Cellulaire

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex